

Thaís Alves da Costa Silva

**Análise da resposta celular e humoral de camundongos A/Sn imunizados
com proteínas excretadas/secretadas (ESA) de *Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Pereira - Chioccola

Co-orientadora: Profa. Dra. Monamaris Marques Borges

São Paulo
2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Thaís Alves da Costa

Análise da resposta celular e humoral de camundongos A/Sn imunizados com proteínas excretadas/secretadas (ESA) de *Toxoplasma gondii* / Thaís Alves da Costa Silva – São Paulo, 2012.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccola

Co-orientadora: Monamaris Marques Borges

1. Toxoplasma
2. Antígenos
3. Imunização
4. Imunidade humoral
5. Imunidade celular

SES/CCD/CD-257/12

*Dedico este trabalho à minha
família, que me apoia e confia em
meu potencial e em memória de
meus avós, em especial Maria do
Rosário Mendes Veiga, tenho
certeza que ela está feliz com
minha conquista e que não
imaginava aonde eu iria chegar*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à **Deus**, pela vida... por ter me dado força em todos os momentos difíceis que passei durante esses anos de doutorado, tanta na vida pessoal quanto profissional.

À meus pais, **Paulo Fernando e Maria Elizabeth** pelo incentivo, amor e carinho, por participarem de cada instante de minha vida ativamente e por me ajudarem a me tornar o que sou. Espero que tenha dado certo...rsrsrsrs.

À meus irmãos "**Teco**" e **Patrícia**, a minha cunhada **Midori** e a minha sobrinha **Sophia** pelos momentos de descontração, amizade, carinho e companheirismo, por terem me ajudado mesmo quando não sabiam.

À meu noivo **Fernando Simone** por respeitar minhas escolhas, pela força, pela paciência, amor e companheirismo. Vejo em você o que não tenho em mim...

À minha orientadora **Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola**, que me aguenta há 7 anos, que me apoiou em todas as minhas decisões, que é companheira na minha vida pessoal e profissional e que ajudou em minha formação profissional, fazendo abrir muitas portas.

À minha co-orientadora **Profa. Dra. Monamaris Marques Borgues** do setor de Bacteriologia do Instituto Butantan fundamental para a concretização deste trabalho.

À mestranda **Cynthia** do Instituto Butantan, amiga, professora e companheira. Sem você não conseguiria ter feito a metade do que fiz.

À **Profa. Dra. Neuza Frazatti Galina** do Setor de Raiva do Instituto Butantan pelas dicas técnicas e por ter cedido as culturas celulares utilizadas neste trabalho.

Aos meus queridos amigos de laboratório de Bio Mol, em especial: **Cristina, Isabelle, Gabriela e Fábio**, "heróis da resistência", pelo companheirismo, confidências, amizade sincera (até demais), risadas, por tudo que passei com vocês. Tenho certeza que

somos uma família e que sempre vamos poder contar uns com os outros. Desejo, sorte e sucesso pra todos nós.

Aos amigos de laboratório *Ana Paula, Érika*, as *Julianas (Reimão e Tonini)*, *Ricardinho, Lázaro, Cryptococcus girl, Jefferson e Alexandre* que muitas vezes me ajudaram com uma simples conversa nos momentos de crise existencial.

À pesquisadora “*Cida de Sorocaba*” pelos toques, incentivo, carinho e companheirismo.

À *Crisinha*, pelos cafés, de todo “Santo” dia, pela amizade, conselhos e amor que sempre me tratou.

À pesquisadora *Marilena* da micologia, pelo convívio sempre agradável e por sempre se mostrar pró-ativa nos apuros do Laboratório.

Aos funcionários do laboratório de Bio mol: *Cida, Margarete e Ricardo*, obrigada por terem me ajudado quando possível.

À Banca de qualificação: *Prof. Dra. Adriana Pardini Vicentini Moreira* - IAL-PPG-CCD, *Prof. Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr.* - IMT– Universidade de São Paulo. *Profa. Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman*- IMT– Universidade de São Paulo, pelas sugestões que enriqueceram este trabalho

À todos os funcionários do Centro de Parasitologia que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação, desde a FUNDAP até o doutorado. Em especial a *Prof. Dr. Pedro Luiz da Silva Pinto*, obrigada por ter confiado em meu potencial, pelos ensinamentos e pela oportunidade.

"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã." Psicografia de Francisco C. Xavier. Livro:- Indicações Do Caminho.

RESUMO

A toxoplasmose, em suas várias formas clínicas, é um problema de saúde pública e o estudo de antígenos (Ags) com potencial uso em diagnóstico e composição de vacinas, um desafio. Culturas de células vêm sendo usadas em substituição a animais na produção destes antígenos. O presente estudo buscou primeiramente avaliar e otimizar a produção de dois antígenos provenientes de taquizoítos: antígeno lisado de taquizoítos (ALT) e antígeno excretado/secretado (ESA) obtidos em células VERO sem adição de soro fetal bovino (SFB). Foram analisadas condições ideais de cultura, infectividade, presença de mutações genômicas e imunogenicidade em material obtido durante 30 passagens em cultura. Para tanto foram usadas técnicas de inoculação *in vivo* e *in vitro*, biologia molecular (PCR e sequenciamento) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados obtidos mostraram mesma eficiência da cultura celular em relação a animais e culturas com adição de SFB para a produção destes Ags. Ainda, não houve alteração na composição antigênica comprovada pela ausência de mutações durante as passagens em cultura. Para avaliar a capacidade de ESA em induzir resposta imune humoral e celular e proteger os animais de desafio com cepa virulenta de *T. gondii*, foram utilizados camundongos A/Sn divididos em três grupos (5 animais cada): **A**: imunizado com 4 doses de ESA (20µg com ALUM), **B** infectado com a cepa ME-49 (controle positivo) e **C**, inoculado com ALUM (controle negativo). Usando ELISA, foram dosados nos soros desses animais anticorpos das diferentes classes de imunoglobulinas e com células de baço estimuladas com Ags e mitógenos, dosadas citocinas em sobrenadante de cultura. Os resultados obtidos mostraram uma produção aumentada de anticorpos da classe IgG1 e de citocinas IFN- γ e TNF- α e baixa produção de IgM e IgG2a, IL10 e IL4 em animais imunizados com ESA em relação ao grupo controle positivo. Este mostrou maior produção de anticorpos da classe IgG2a, IL -4 e IL-10. Estes resultados indicam que ESA induziu resposta Th1 e Th2. Houve diminuição de parasitemia e retardo na mortalidade de animais que foram desafiados com taquizoítos opsonizados com anticorpos anti-ESA, mostrando um papel protetor desses anticorpos. Os resultados ressaltam a importância de ESA na composição de kits diagnóstico e como imunógeno.

ABSTRACT

Toxoplasmosis, in its various clinical forms, is a public health problem. The study of antigens (Ags) with potential use in diagnosis and vaccine composition, a challenge. Cell cultures have been used to replace the animals in the antigens production. The present study first evaluated and optimized two antigens production from tachyzoites: tachyzoite lysate antigen (TLA) and antigen excreted/secreted (ESA) in VERO cells obtained without addition of fetal bovine serum (FBS). We analyzed ideal culture conditions, infectivity, genomic mutations presence and immunogenicity of parasites obtained during 30 passages in culture. For both inoculation techniques were used *in vivo* and *in vitro*, molecular biology techniques (PCR and sequencing) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The results obtained showed the same efficiency in cell culture in relation to animals and cultures by adding FBS to produce such Ags. Furthermore, no change in antigenic composition was evidenced by the absence of mutations in the passages in culture. To assess ESA capacity to induce humoral and cellular immune response and protect animals from challenge with virulent strain of *T. gondii* were used A/Sn mice divided into three groups (5 animals): A: immunized with 4 doses of ESA (20µg ESA plus ALUM), B infected with the strain ME-49 (positive control) and C, received only ALUM (negative control). Using ELISA were measured in serum of these animals antibodies of different classes of immunoglobulins and spleen cells stimulated with mitogens and Ags, cytokines assayed in culture supernatant of these spleen cells. The results showed an increased production of IgG1 antibodies and cytokines IFN- γ and TNF- α and low production of IgM and IgG2a, IL10 and IL4 in animals immunized with ESA in relation to the control group. It showed increased production of antibodies of class IgG2a, IL -4, IL-10. These results indicate that ESA induce Th1 and Th2. There was a parasitemia decrease and delayed mortality of animals that were challenged with opsonized tachyzoites with anti-ESA, showing a protective role of these antibodies. The results underscore the ESA importance in the composition of diagnostic kits like as immunogen.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS - “Acquired Immunodeficiency Syndrome” (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

ALT- Antígeno Lisado de Taquizoítos

CDC - “Centers for Disease Control and Prevention” (Centro para controle e prevenção de doenças)

CD4+ - “Cluster of Differentiation 4” (Grupamento de diferenciação 4)

CD8+ - “Cluster of Differentiation 8” (Grupamento de diferenciação 8)

CTL – Cytotoxic T lymphocytes

NK – Células “*Natural Killer*”

VERO - Células de rim de macaco verde africano

COBEA - Cólégio brasileiro de Experimentação Animal

DNA - “Deoxyribonucleic Acid” (Ácido desoxirribonucléico)

D.O. - Densidade ótica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra - acético

ELISA - “Enzyme-linked immunosorbent assay” (Teste Imunoenzimático)

ESA- Excreted/secreted Antigens (Antígenos Excretados/secretados)

g - Aceleração da gravidade

Glicosilfosfatidilinositol - GPI

HAART - “Highly Active Antiretroviral Therapy” (Terapia anti-retroviral altamente eficaz)

HIV – Human immunodeficiency vírus (Vírus da imunodeficiência humana)

HCl - Ácido clorídrico

IL- Interleucina

IFN- γ – Interferon gamma

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgM - Imunoglobulina da classe M

IgA- Imunoglobulina da classe A

IgE- Imunoglobulina da classe E

LCR - Líquido cefalorraquidiano

MHC Major Histocompatibility complex (Complexo de Histocompatibilidade principal de classe)

MOI - multiplicidade de infecção

MIC – Micronemal proteins (Proteínas dos micronemas)

NaCl - Cloreto de Sódio

NaHCO₃– Bicarbonato de Sódio

OPD – Orto-fenilenodiamina

PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*

PBS – “*Phosphate Buffer Solution*” (solução fisiológica tamponada)

pb - Pares de base

PCR - “Polymerase Chain Reaction” (Reação em cadeia da polimerase)

PCR RFLP - “Restriction fragment length polymorphisms” (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de DNA gerados por enzima de restrição)

PV – Vacúolo Parasitóforo

qrtPCR - “Quantitative real-time PCR” (PCR quantitativa em tempo real)

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

ROP – Roptry proteins (proteínas das roptrias)

SAG – Surface antigen (antígeno de superfície)

SDS-PAGE – Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis (Eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio).

SFB - Soro Fetal Bovino

SNC - Sistema nervoso central

SRS – Sequências relacionadas à SAG

TH1 – resposta celular do tipo 1

TH2 – resposta celular do tipo 2

TLR- *Toll-like receptors*

TNF- α – fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Esquema representativo de taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Fonte: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_01/S1462399401002204sup013.gif.....19
- Figura 2:** Cisto proveniente de macerado de cérebro de camundongo. Fonte: Hill et al., 2005.....20
- Figura 3:** Oocisto esporulado (A) e não esporulado (B) de amostras de fezes de gato (Hill et al., 2005).....20
- Figura 4:** Ciclo de Vida de *T. gondii*: A – hospedeiro definitivo e B – hospedeiro indeterminado (Frenkel e Vidal, 2010)22
- Figura 5:** Experimentos de infectividade *in vivo*: Número de taquizoítos de *T. gondii* colhidos de lavado peritoneal de camundongos após 4 dias de infecção. **A.** Grupo 1A, barras pretas; e 1B, barras brancas receberam 1×10^5 e 1×10^6 taquizoítos/animal, respectivamente. Estes parasitas foram provenientes de sobrenadantes de culturas de células VERO previamente infectadas sem SFB. **B.**.....56
- Figura 6.** Cepa RH de *T. gondii*: Sequência de nucleotídeos localizada na região SAG2 próximo à extremidade 5' (A) e na extremidade oposta 3' (B). Análise do alinhamento das sequências dos produtos de PCR amplificados do DNA extraído de taquizoítos coletados a cada 5 passagens nas culturas celulares da (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a).....58
- Figura 7.** Reatividade imunológica determinada por ELISA utilizando como antígeno ALT (2 µg/mL) provenientes de taquizoítos coletados na 1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a passagens em cultura de células VERO.....59
- Figura 8:** Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de *T. gondii* e seus respectivos valores de C_T.....60

- Figura 9:** Índice de sobrevivência após desafio com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH dos grupos camundongos imunizados (verde), controle positivo (vermelho) e negativo (preto).....61
- Figura 10:** qrtPCR de amostras de sangue coletados via caudal do 4º ao 7º pós-desafio com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* dos grupos de camundongos imunizado (verde), controle negativo (branco) e controle positivo (vermelho).....62
- Figura 11.** Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com proliferador mitótico ConA para IFN- γ , IL-4 e IL-10 ou LPS para TNF- α . As citocinas foram dosadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura de linfócitos.....64
- Figura 12.** Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com ESA.....67
- Figura 13.** Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com ALT.....68
- Figura 14:** Determinação do título do soro para IgM (A), IgG1(B) e IgG2a(C) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA + ALUM) (verde), controle positivo (vermelho) e controle negativo (preto). Em placas sensibilizadas com o antígeno ESA.....69
- Figura 15:** Determinação do título do soro para IgM (A), IgG1(B) e IgG2a(C) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA +ALUM) (verde), controle positivo (vermelho) e controle negativo (preto). Em placas sensibilizadas com o antígeno ALT.....70
- Figura 16:** Comparação da produção das imunoglobulinas (IgM, 1:1000; IgG1, 1:2000 e IgG2a, 1:8000) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA + ALUM) verde,

controle positivo (vermelho) e controle negativo (branco) contra ESA (A) e ALT (B).....71

Figura 17: qrtPCR de amostras de sangue coletados via caudal do 4º ao 7º pós-transferência de parasitas opsonizados, 1000 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* incubados com IgG coletadas de camundongos imunizados (verde), controle negativo (branco) e controle positivo (vermelho).....72

Figura 18: Índice de sobrevivência pós-transferência de parasitas opsonizados (0,5µg de IgG/animal em grupos de 5 camundongos com anticorpos provenientes de grupo imunizado (verde), grupo controle negativo (preto) e grupo controle positivo (vermelho). Resultados expressos em porcentagem acumulativa.....72

Tabela 1- : Formação de monocamada celular em garrafas de 25cm² com diferentes concentrações por inóculo de células VERO (ATCC- CCL-81). * sem formação de monocamada.....53

Tabela 2: Quantidade de taquizoítos viáveis obtidos de sobrenadante de culturas de células VERO (ATCC- CCL-81) após infecção com a cepa RH de *T. gondii*^a. Os resultados foram expressos pela contagem de taquizoítos obtidos de 5 mL de meio das culturas infectadas durante 10 dias. (média de três culturas de 25-cm²). Os experimentos foram feitos em duas vezes para confirmar os resultados. * Parasitas inviáveis.....54

Tabela 3. Produção de ALT. Comparação entre o método convencional utilizando sonicação e com pérolas de vidro (SIGMA -150:212 microns). A metodologia foi ensaiada utilizando 1x10⁷ taquizoítos de cultura de células/mL e foi descrita em detalhes no item Materiais e métodos.59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Histórico	15
1.2. Epidemiologia.....	17
1.3. Morfologia.....	18
1.3.1. Taquizoítos	18
1.3.2. Cistos e bradizoítos.....	19
1.3.3. Oocistos	20
1.4. Ciclo biológico	21
1.5. Formas da doença	23
1.5.1. Toxoplasmose congênita	23
1.5.2. Toxoplasmose em imunodeprimidos.....	24
1.5.3. Toxoplasmose Ocular	24
1.6. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.....	25
1.7. Proteínas de superfície do parasito	27
1.8. Organelas secretórias e invasão celular	28
1.8.1. Micronemas	29
1.8.2. Roptrias.....	30
1.8.3. Grânulos Densos.....	31
1.9. Resposta imune humoral e celular.....	31
1.10. Estudos de imunizações.....	34
2. OBJETIVO GERAL.....	37
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Delineamento Experimental	38
3.2. Animais experimentais	39
3.3. Cultura de células	39
3.4. Manutenção e obtenção dos parasitos	40
3.4.1. Cepas de <i>T. gondii</i>	40
3.4.2. Cepa RH -taquizoítos peritoneais	40
3.4.3. Cepa ME-49 - cistos teciduais	40
3.5. Otimização da produção in vitro da cepa RH de <i>T. gondii</i> em células VERO....	41
3.5.1. Infectividade de <i>T. gondii</i> in vitro e in vivo.....	41

3.5.2. Purificação de DNA e PCR dos taquizoítos produzidos <i>in vitro</i>	42
3.5.2.1. Sequenciamento de DNA dos taquizoítos produzidos <i>in vitro</i>	43
3.5.3 Produção de antígenos e ensaios imunológicos.....	43
3.5.3.1. ALT	43
3.5.3.2. ESA.....	45
3.6. Experimentos de resposta imune - grupos experimentais	45
3.6.1. Grupos de animais imunizados.....	45
3.6.2. Grupos controles.....	45
3.6.2.1. Controle negativo	45
3.6.2.2. Controle positivo	46
3.6.3. Grupos de animais- experimentos de opsonização.....	46
3.7. Desafio dos camundongos imunizados com <i>T. gondii</i>	46
3.7.1. Determinação dos níveis de parasitemia por qrtPCR (Quantitative real-time PCR) dos animais desafiados	47
3.7.1. 2. Extração de DNA de taquizoítos da cepa RH para confecção de curva padrão	47
3.7.1.3. Extração de DNA de sangue e qrtPCR.....	47
3.8. Experimentos de resposta celular	48
3.8.1.Obtenção de linfócitos	48
3.8.2 Cultura de Linfócitos para dosagem das citocinas	49
3.9. Padronização e determinação dos níveis de IgM e subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a por ELISA	50
3.9.1. Purificação de anticorpos e experimentos de opsonização.....	50
3.10. Análise estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Otimização da produção <i>in vitro</i> da cepa RH de <i>T. gondii</i> em células VERO (ATCC- CCL-81)	52
4.2. Infectividade de <i>T. gondii in vitro e in vivo</i>	55
4.2.1 Características genéticas e antigênicas dos taquizoítos após várias passagens em culturas celulares	56
4.3. Padronização da PCR tempo real (qrt-PCR)	60
4.3.1. Determinação do limite de detecção.....	60
4.4. Desafio dos grupos imunizados e controles	61
4.5. Experimentos de Resposta Celular: detecção de citocinas.....	62

4.5.1 Testes de proliferação linfocitária, padronizações	62
4.5.1.2. IFN- γ	65
4.5.1.3. TNF- α	65
4.5.1.4. IL-4	66
4.5.1.5. IL-10	66
4.4.1. Padronizações	69
4.5. Produção de anticorpos.....	70
4.5.1. Experimentos de opsonização e análise de parasitemia pela qrt-PCR	71
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	81
7. BIBLIOGRAFIA	82
8. ANEXOS	109
8.1 Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio preto – Comissão de Ética na Experimentação Animal-CEEA	109
8.2 Anexo 2. Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chioccola VL. <i>Toxoplasma gondii</i> antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. Exp Parasitol. 2012 Apr;130(4):463-9.....	110
8.3 Anexo 3. Artigo submetido à revista Acta Tropica; Título: <i>Toxoplasma gondii</i> antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated Vero cell maintained in serum free medium. Título: Immunization with Excreted/Secreted Proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against <i>Toxoplasma gondii</i> infection.....	118

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e Família Sarcocystidae (Ravdin, 1995), capaz de infectar uma ampla variedade de animais de sangue quente (Dubey et al., 1998; Pereira-Chioccola et al., 2009). O nome *Toxoplasma* (toxon = arco, plasma = forma) refere-se a forma morfológica de meia lua encontrada no estágio de taquizoíto (Hill et al., 2005). Os integrantes do filo Apicomplexa são caracterizados por estágios diferenciados altamente invasivos e possuem uma estrutura subcelular chamada complexo apical com papel importante na invasão celular (Dubremetz, 1998).

O parasito foi descrito por Splendore em 1908 parasitando um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil. Simultaneamente, os pesquisadores Nicolle e Manceaux do Instituto Pasteur da Tunísia, descreveram um microorganismo similar ao descrito por Splendore em células mononucleares de baço e fígado de um roedor norte-africano denominado *Ctenodactylus gundi*.

A transmissão do parasita era um mistério desde a sua descoberta nos roedores. Chatton e Blanc (1917) constataram que o hospedeiro, *Ctenodactylus gundi*, não havia sido infectado naturalmente, mas que havia adquirido a infecção em cativeiro. Estes roedores vivem no sopé das montanhas do sul da Tunísia e foram usados em pesquisas sobre Leishmaniose no Instituto Pasteur da Tunísia. Este mesmos pesquisadores suspeitaram que *T. gondii* havia sido transmitido por artrópodes porque foi encontrado sangue no hospedeiro. Desta forma Chatton e Blanc (1917), bem como outros pesquisadores nos EUA investigaram a possível transmissão por várias espécies de artrópodes, porém com muitos insucessos (Frenkel et al., 1970, 1973).

No ano de 1923 foi descrito o primeiro caso de toxoplasmose em humanos pela observação de cistos na retina de uma criança com toxoplasmose congênita que apresentava hidrocefalia (Jankú, 1923). Em 1954, devido à observação da alta prevalência da infecção na população, sugeriu-se que a transmissão ocorria através da ingestão de carnes mal cozidas, o que foi confirmado por outros pesquisadores, os quais

demonstraram a resistência dos cistos teciduais às enzimas proteolíticas dos sucos digestivos (Jacobs, 1967).

A elucidação da importância do felino como hospedeiro definitivo do parasita no ciclo de transmissão só foi comprovada anos à frente, com a descoberta do ciclo sexuado culminando na formação dos oocistos eliminados nas fezes dos felinos (Dubey et al., 1970).

1.2. Epidemiologia

Toxoplasma gondii possui a capacidade de infectar diversas espécies de vertebrados como aves e morcegos, herbívoros, carnívoros, mamíferos marinhos e o homem (Carruthers, 2002; Montoya e Liesenfeld, 2004). Somente nos felinos observa-se a multiplicação parasitária por processo sexual, pois os mesmos são os únicos hospedeiros definitivos. Os demais animais, inclusive o homem, são considerados hospedeiros intermediários, onde ocorre somente a multiplicação parasitária assexuada (Bushrod, 2004).

A toxoplasmose é uma zoonose de ampla distribuição geográfica, afetando cerca de um terço da população mundial (Montoya e Liesenfeld, 2004; Pereira-Chiocola et al., 2009). Acomete aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo (Tenter et al., 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004; Pappas et al., 2009). A infecção humana geralmente é assintomática, e é adquirida pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais, pela água ou alimentos contaminados com oocistos eliminados nas fezes de felinos. Estas características biológicas, somadas aos hábitos de alimentação e higiene, padrões culturais da população, faixa etária e procedência urbana ou rural estão estritamente relacionados com a variabilidade da soroprevalência da doença nas diferentes regiões, assim como a rota de infecção oral que se constitui na maior forma de contaminação (Contreras et al., 1996; Tenter et al., 2001; Montoya e Liesenfeld, 2004; Santos et al., 2009; Pereira-Chiocola et al., 2009).

Essa grande dispersão do parasita pode ser determinada pela possibilidade deste apresentar vários mecanismos de transmissão, como ingestão de cistos presentes em carnes cruas ou mal cozidas, ingestão de oocistos presentes em fezes de felinos que contaminam alimentos e água, manipulação de terra contaminada com oocistos, entre outros (Frenkel e Dubey, 1972; Remington et al., 2001; Cenci-Goga et al., 2011). Estes fatores podem ser as causas das altas prevalências de anticorpos anti – *T. gondii* em grupos humanos com hábitos, costumes e etnias bem diferentes, sendo dependentes do grau e da frequência de exposição aos referidos fatores (Jamra, 1964). A soroprevalência estimada varia de 11% no EUA (Jones et al., 2007) à 70% no Brasil (Cantos et al., 2000; Pappas et. al, 2009). Dados de Pinon et al. (2001) mostram que na

Europa a soroprevalência varia de menos de 20% ao norte e mais de 60% ao sul. Em São Paulo 57,10% das mulheres atendidas na rede de saúde pública de São Paulo no período de 2001 a 2005 eram positivas para a toxoplasmose (Kawarabayashi et al. 2007).

A doença surge na ausência de resposta imune efetiva do hospedeiro e a forma ocular acomete pelo menos 2-3% dos pacientes sintomáticos (Roberts e Mcleod, 1999). A toxoplasmose devastadora do sistema nervoso central ocorre em fetos de mães com a infecção aguda, em pacientes com AIDS e os submetidos a transplantes. Os sinais e sintomas são tão graves, que se não tratados rapidamente, podem levar os pacientes a morte ou a seqüelas significantes (Remington et al., 1995). Segundo Ravel (1998) *T. gondii* nos indivíduos com AIDS infecta o sistema nervoso central em 12-31% dos pacientes, sendo responsável por 25-80% das infecções do sistema nervoso central na AIDS. A infecção por *T. gondii* é a maior causa de morbidade e mortalidade em crianças infectadas congenitamente e pacientes imunocomprometidos incluindo pacientes com AIDS (Luft e Remington, 1992; Hill e Dubey, 2002).

Nos animais, a toxoplasmose causa abortos, natimortos, perdas neonatais em todos os tipos de criação, especialmente em ovelhas e cabras, promovendo grandes perdas econômicas no mundo (Buxton, 1998).

1.3. Morfologia

1.3.1. Taquizoítos

Os taquizoítos possuem forma de lua crescente (Figura 1) com 2 a 6µm de comprimento, como uma célula sanguínea (Hill et al., 2005). Apresentam várias organelas tais como anéis apicais, anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, microporos, mitocôndrias, microtúbulos subpeliculares, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, núcleo, grânulos densos, grânulos de amilopectina (podem estar presentes ou não) e apicoplasto. Como integrantes do filo Apicomplexa, também apresentam uma camada pelicular tripla, formada pela plasmalema intimamente associada ao complexo interno de membrana (Soldati e Meissner, 2004).

O complexo apical é composto por elementos do citoesqueleto e pelas organelas secretórias especializadas chamadas roptrias, micronemas e grânulos densos (Baum et al., 2006), citadas acima. O anel polar serve como um centro microtúbulo-organizador para os microtúbulos subpeliculares (formato de cesta) conferindo a forma de lua crescente do parasita (Soldati e Meissner, 2004).

O conóide é uma estrutura em forma de cone, composta por um polímero de tubulina que é saliente durante a invasão. Esta estrutura se associa aos microtúbulos e ao citoesqueleto de actinmiosina promovendo a força necessária para a movimentação do parasita (Hu et al., 2002).

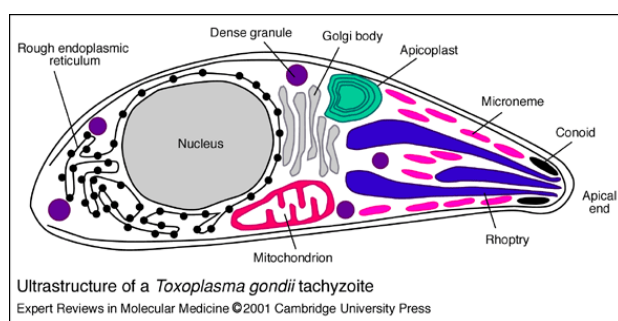


Figura 1: Esquema representativo de taquizoítio de *Toxoplasma gondii*.
Fonte: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM3_01/S1462399401002204sup013.gif

1.3.2. Cistos e bradizoítos

Os cistos teciduais (Figura 2) variam de 5 a 100 μ m e possuem poucos ou milhares de bradizoítos em seu interior (Dubey e Beattie, 1988; Dubey et al., 1998; Hill et al., 2005). São achados mais freqüentemente no cérebro, coração e músculo esquelético. Representam um estágio quiescente do parasita dentro do hospedeiro (Dubey e Beattie, 1988). O termo bradizoítio (brady = devagar em Grego) foi definido por Frenkel (1973) e descreve a forma de multiplicação lenta dentro do cisto.

Os bradizoítos se dividem como os taquizoítos por endodiogenia (Dubey et al., 1998), medem aproximadamente 7 μ m x 1.5 μ m. Diferem morfológicamente de taquizoítos por serem mais delgados, pela localização do núcleo na parte posterior do parasita e pelo seu alto índice de micronemas e grânulos de amilopectina (Hill et al.,

2005). Persistem dentro dos cistos por toda a vida do hospedeiro e são mais resistentes à tripsina ou a pepsina que os taquizoítos (Gross et al. ,1996; Montoya e Liesenfeld, 2004).

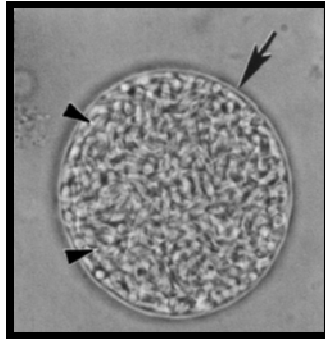


Figura 2: Cisto proveniente de macerado de cérebro de camundongo. Fonte: Hill et al., 2005

1.3.3. Oocistos

Durante a infecção aguda dos felídeos, alguns milhões de oocistos (Figura 3) ($10 \times 12 \mu\text{m}$) são encontrados nas fezes dos gatos por 7-21 dias (Montoya e Liesenfeld, 2004). Os oocistos se tornam infectantes dentro de 1-5 dias no meio ambiente dependendo da aeração e temperatura. Esporulado, contém dois esporocistos elipsoidais e, cada esporocisto possui quatro esporozoítos ($2 \mu\text{m} \times 8 \mu\text{m}$) em seu interior (Hill et al., 2005).

Menos de 50% dos gatos liberam oocistos nas fezes quando ingerem taquizoítos ou oocistos, mas todos os gatos liberam oocistos quando ingerem cistos teciduais (Dubey e Frenkel, 1976).

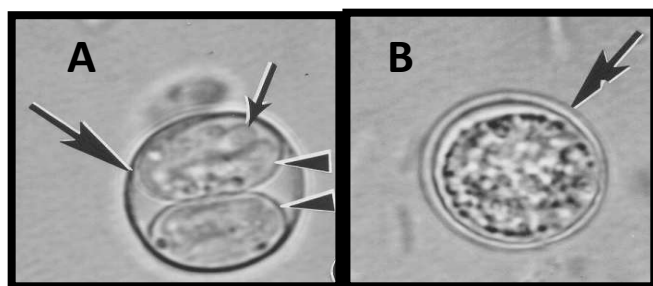


Figura 3: Oocisto esporulado (A) e não esporulado (B) de amostras de fezes de gato (Hill et al., 2005)

1.4. Ciclo biológico

No hospedeiro definitivo (Figura 4A): depois da ingestão dos cistos teciduais pelos felinos, as paredes císticas são dissolvidas por enzimas proteolíticas do estômago e do intestino delgado. Os bradizoítos são então liberados, penetram nas células intestinais (intestino delgado) e iniciam o desenvolvimento de numerosas gerações de ciclos assexuais e sexuais de *T. gondii* (Dubey e Frenkel, 1972). Neste estágio, as formas são conhecidas como esquizontes. Dos esquizontes são liberados os merozoítos, que após várias gerações transformam-se em gameta masculino (microgametócito) e feminino (macrogametócito). Após a fusão do gameta feminino e do gameta masculino ocorre a formação dos oocistos não esporulados que são eliminados nas fezes do gato contaminando o meio ambiente. Os oocistos levam de 1 à 5 dias para esporularem no meio ambiente e tornarem-se infectantes (Hill et al., 2005; Pereira-Chiocola et al., 2009).

No hospedeiro intermediário (Figura 4B): a entrada na célula é iniciada pelo contato entre o ápice e a superfície da célula hospedeira e, imediatamente seguida pela progressiva internalização do sítio apical (Dubremetz, 1998). Ao aderir na célula, através de receptores de superfície (SAG-1) (Huynh et al., 2003) e pelas proteínas adesivas da micronema (MICs), que depois da adesão e penetração migram para a região posterior final do parasita (Sutan et al., 1997), o agente orienta seu complexo apical de forma a criar uma junção intracelular e formar na célula um vacúolo confortável para o agente (Huynh et al., 2003). O vacúolo parasitóforo é envolto pelo retículo endoplasmático e mitocôndrias da célula hospedeira, acreditando-se que o parasita recruta seus metabólicos dessas organelas do hospedeiro (Sinai et al., 1997), e aí se multiplica por endodiogenia (duas células ‘filhas’ se formam dentro da célula ‘mãe’). A multiplicação continua até que ocorra a ruptura da célula quando os taquizoítos são liberados para parasitar outras células (Dubey e Beattie, 1988; Hill et al., 2005). Este processo continua até que o hospedeiro desenvolva imunidade ao parasita. Depois que a infecção é estabelecida e os parasitas são eliminados para o meio extracelular, a multiplicação intracelular diminui e os parasitas (agora em estágio de bradizoíto) acumulam-se em cistos teciduais (Dubey e Beattie, 1988).

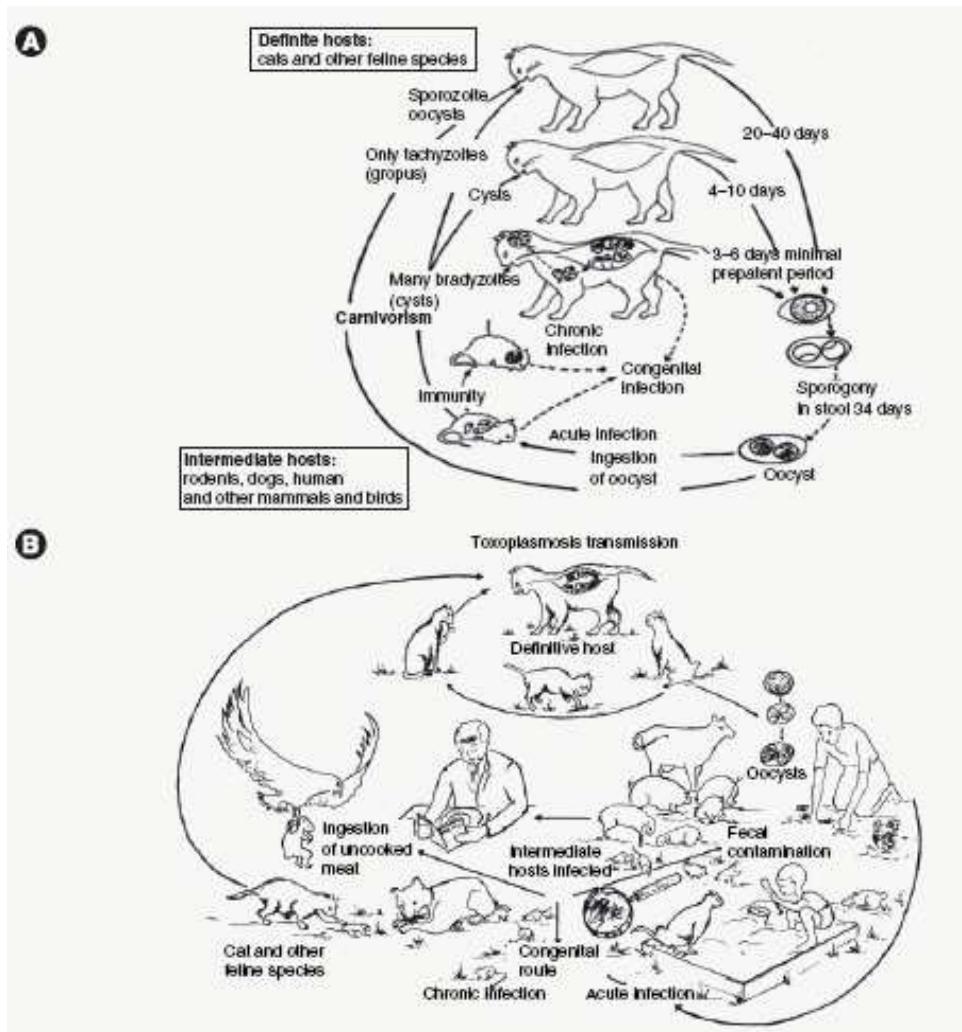


Figura 4: Ciclo de Vida de *T. gondii*: A – hospedeiro definitivo e B – hospedeiro indeterminado (Frenkel e Vidal, 2010)

1.5. Formas da doença

1.5.1. Toxoplasmose congênita

A infecção congênita se caracteriza pela transmissão do parasita ao feto via placenta. Esta forma de infecção ocorre somente quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação, que apesar da parasitemia temporária, raramente tem sintomas (Hill et al., 2005).

A gravidade da toxoplasmose congênita está relacionada com o período de infecção. Quando a infecção materna ocorre no primeiro ou segundo trimestre de gestação pode causar no feto a infecção congênita severa resultando em morte no útero ou aborto espontâneo. Cerca de 1% dos recém-nascidos que adquiriram toxoplasmose congênita morrem e 2% apresentam problemas neurológicos graves. Em contraste, quando a infecção materna tardia (terceiro trimestre) usualmente resulta em recém-nascidos aparentemente normais. A frequência absoluta de infecções subclínicas em recém-nascidos com toxoplasmose congênita é de 85% (Hohlfeld et al., 1994; Gilbert, 2004).

A presença da imunoglobulina materna G (IgG) em amostras de soros de recém-nascidos não garante infecção do feto. Porém, a infecção pode ser confirmada pela persistência dos anticorpos IgG por mais de 8 meses de idade (Remington et al., 2001). Em contraste, a detecção de anticorpos IgM, IgA e IgE no soro da criança, que normalmente não cruza a barreira placentária, confirma a infecção (Altcheh et al., 2006).

A detecção de anticorpos IgG na mulher antes da gestação indica infecção anterior e portanto elimina o risco de transferência congênita de taquizoítos (Kravetz e Federman, 2005). O teste de avidéz para anticorpos IgG foi introduzido para discriminar a infecção recente da infecção tardia e têm sido útil para o diagnóstico de gestantes. Normalmente, é utilizado como teste confirmatório, quando usado em associação com outros testes sorológicos (Hedman et al., 1989; Liesenfeld et al., 2001A).

1.5.2. Toxoplasmose em imunodeprimidos

Indivíduos com toxoplasmose albergam *T. gondii* em forma de cistos nos seus tecidos. Quando apresentam algum tipo de imunossupressão podem ter reativação da infecção causando doença neurológica grave. Normalmente, as imunossupressões são causadas pelo uso de drogas como em transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas ou, com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Burg et al., 1988; Ferreira, 2000).

Em pacientes com AIDS, a toxoplasmose do sistema nervoso central é a causa mais frequente de lesão cerebral focal (Vidal et al., 2005), principalmente quando a contagem de linfócitos T CD4⁺ é menor que 100 células/mm³ (Hoffmann et al., 2007), e a retinocoroidite toxoplásmica, uma das mais importantes inflamações oculares secundárias (Nusseblatt e Belfort Júnior, 1996; Silveira, 2001).

Os linfócitos T CD4⁺ CD8⁺ são as células mais importantes responsáveis pela imunidade protetora contra *T. gondii*. Secreta IFN- γ e desenvolve a atividade citotóxica contra as células parasitadas (Brown et al., 1990; Gazzinelli et al., 1991). Em camundongos H-2d linfócitos T CD8⁺ (CTL) medeiam à resistência à encefalite toxoplásmica (Brown et al., 1995).

1.5.3. Toxoplasmose Ocular

A doença ocular causada por *T. gondii* foi primeiramente descrita em 1923, em criança com infecção congênita (Jankú, 1923) e em 1939, a toxoplasmose congênita com envolvimento ocular foi amplamente aceita como uma doença humana (Wolf et al. 1939).

A toxoplasmose ocular é a causa mais comum de retinocoroidite em pacientes imunocompetentes, sendo responsável por 30% a 50% de todas as uveítes posteriores (Copeland e Phillipotts, 2006). Pode ser de origem congênita com manifestações clínicas precoces ou tardias, ou ainda ser adquirida após o nascimento como resultado da

infecção aguda ou reativação. A manifestação ocular mais comum é a retinocoroidite granulomatosa necrotizante que pode vir acompanhada de outras alterações oculares, pela ruptura de cistos latentes na retina que podem liberar parasitas que induzem necrose e inflamação. (Glasner et al, 1992; Montoya e Remington, 1996; Vallochi et al., 2008; Commodaro et al., 2009). Mais recentemente, têm sido discutido que a maior parte dos casos de toxoplasmose ocular são causados por infecções pós –natal (Holland 1999, 2003, 2004; Gilbert e Stanford 2000). O alto índice de envolvimento ocular em crianças recém-nascidas está relacionada à imaturidade do sistema imune. Em alguns pacientes com infecções documentadas ao nascimento, as lesões oculares podem aparecer anos após o nascimento (Koppe et al., 1986).

1.6. Diagnóstico laboratorial da toxoplasmose

A evidência do parasita no sangue ou em outros fluidos corporais é um indicativo de uma possível infecção aguda (Montoya e Liesenfeld, 2004). Técnicas de detecção direta do parasita são complexas de serem realizadas, além de apresentarem baixa sensibilidade (Wong e Remington, 1993). Por ser um parasita intracelular obrigatório, o isolamento em cultura *in vitro* é difícil de ser mantido, oneroso e por necessitar de muito tempo para se obter um resultado, apresenta efetividade em menos de 50% dos casos. O isolamento do parasita pode ser feito mediante a inoculação em camundongos, sendo mais sensível, porém exigindo de três a seis semanas e manutenção dos animais em biotérios (Lin et al., 2000; Kupferschmidt et al., 2001). A detecção de parasitos também pode ser obtida em cortes histológicos do cérebro, ou por esfregaços de líquidos corpóreos, porém a biópsia cerebral é um procedimento muito invasivo para uso em rotina (Dupouy-Camet et al., 1993; Montoya e Liesenfeld, 2004).

Em relação à testes sorológicos títulos baixos de IgM são detectados em muitos pacientes, após a fase aguda da infecção. Portanto, a determinação no soro destes anticorpos não é indicada como marcador de fase de infecção (Liesenfeld et al., 2001B). Da mesma forma anticorpos IgA não são marcadores específicos de fase aguda (Gutiérrez et al., 1997), porém os anticorpos IgG presentes no soro diferem em suas características de maturação, sendo portanto, importante ferramenta diagnóstica de infecção aguda (Villavedra et al, 1999; Marcolino et al, 2000).

Dentre os métodos imunológicos, os de detecção de anticorpos, geralmente das classes IgG e IgM destacam-se a RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta), considerada o teste padrão ouro, e o ELISA. Ambos apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos da classe IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos da classe IgG) (Montoya e Lisenfeld, 2004). A RIFI utiliza taquizoítos íntegros tratados com formalina (Shaapan et al., 2008). A sensibilidade e especificidade varia de acordo com a cepa de *T. gondii* empregada e a subjetividade da interpretação da fluorescência, torna o método de difícil comparação entre laboratórios. Por esta razão, inúmeros dados na literatura mostram extrema variabilidade em uma mesma região (Shaapan et al., 2008; Macrì et al., 2009). O teste de ELISA pode demonstrar o diagnóstico de infecção ativa com anticorpos IgG. Em 1989 Hedman et al., introduziram o teste ELISA-avidez de IgG com objetivo de diagnosticar uma infecção recentemente adquirida. Esta técnica baseia-se na força de interação entre o antígeno e o anticorpo (Hedman et al., 1989; Joynson et al., 1990; Cozon et al., 1998). Durante a resposta imune, o processo de maturação de anticorpos IgG é acompanhado pelo aumento de sua afinidade. Anticorpos de baixa avidez (30% ou menos) são produzidos em estágio precoce da infecção enquanto que anticorpos de alta avidez (60% ou mais) refletem infecção crônica. Apesar de uma baixa avidez nem sempre permitir a identificação de um caso recente de infecção, a alta avidez de IgG exclui infecções primárias com menos de 3 meses de duração (Joynson et al., 1990; Gutiérrez e Maroto, 1996). Para a avaliação da avidez verifica-se a maior ou menor facilidade com que os anticorpos são dissociados de complexos antigênicos específicos. Essa dissociação resulta da ação de agentes desnaturantes de proteínas ou desestabilizantes de ligações de pontes de hidrogênio. Estes agentes são utilizados para diluir o soro teste ou adicionadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo. O tratamento com uréia é considerado o mais simples e eficiente na medida da avidez dos anticorpos IgG (Holliman et al., 1994). É um método altamente sensível e específico na identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* durante a gravidez (Jenum et al., 1997).

Nas últimas décadas o surgimento de novas metodologias moleculares, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) permitiu a detecção com alta sensibilidade do DNA de *T. gondii* em amostras clínicas como líquido amniótico, líquido, sangue, humor aquoso e medula óssea (Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005;

Edvinsson et al, 2008; Pereira-Chiocola et al., 2009; Mesquita et al., 2010; Vidal et al., 2011).

Muitos pacientes apresentam reativação da infecção, com altos títulos de IgG e alta avidéz, após a queda da imunidade (Colombo et al., 2005; Vidal et al., 2005; Vidal et al., 2011). Neste contexto, os métodos moleculares têm se mostrado eficientes na detecção de *T. gondii* em pacientes com AIDS, já que estes métodos não são afetados pelo status imunológico do paciente. São rápidos, sensíveis e específicos, além de evitar o procedimento de biópsia cerebral que é extremamente invasivo (Dupon et al., 1995; Cingolani et al., 1998; Colombo et al., 2005). As seqüências mais utilizadas para a detecção do parasito têm como alvo o gene B1, que possui uma região repetitiva de 35 cópias no genoma de *T. gondii* (Burg et al., 1989; Brindley et al., 1993; Filisetti et al., 2003; Chabbert et al., 2004; Okay et al., 2009). Recentemente, com a descrição da seqüência de 529 pb (Homan et al., 2000), que apresenta-se repetida de 200 a 300 vezes no genoma do *T. gondii* gerou uma série de publicações afim de se comparar marcadores provenientes desta nova seqüência com os marcadores já em uso provenientes do gene B1. Os resultados encontrados por estes autores demonstram uma sensibilidade que varia de 10 a 100 vezes maior que o gene B1 (Hierl et al., 2004; Calderaro et al., 2006; Cassaing et al., 2006; Edvinsson et al., 2006; Mesquita et al., 2010).

1.7. Proteínas de superfície do parasito

A superfície celular externa dos taquizoítos é recoberta com proteínas de peso molecular variando de 22 a 43 kDa. Todas ancoradas na membrana por pontes de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) (Tomavo et al., 1993). Essas proteínas são estruturalmente relacionadas ao antígeno de superfície mais abundante e altamente imunogênico SAG1 (p30), fundamentalmente importante para o sucesso da invasão (Grimwood e Smith, 1992). São expressas em taquizoítos, mas não em bradizoítos ou esporozoítos (Lekutis et al., 2000).

Coletivamente estes antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (seqüências relacionadas à SAG1) (Jung et al., 2004). Este grupo de antígenos promove a interação entre a membrana do parasita e a célula hospedeira através de moléculas ligantes ou receptores celulares que auxiliam o parasita na entrada da célula

(Kasper e Mineo, 1994; Grimwood e Smith, 1995). O seqüenciamento dos genes da p30 a partir de três cepas diferentes de *T. gondii* mostra que ela é bastante conservada (Bülow e Boothroyd, 1991).

É importante salientar que a expressão de proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasita. As proteínas SAG1 e SAG3 (P43) são exclusivamente produzidas por taquizoítos (Gross et al., 1996), bem como a SAG2A. Em contraste, SAG2 (P22) é expressa tanto por taquizoítos quanto por bradizoítos, já SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontradas apenas em bradizoítos (Lekutis et al., 2000). As proteínas SAG4 e BSR4/p36 são proteínas de superfície ligadas à proteína do citosol BAG1, expressa especificamente em bradizoítos (Bohne et al., 1995). Em contrapartida, todos os membros da família SAG5 são transcritos em taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* (Spano et al., 2002).

1.8. Organelas secretórias e invasão celular

Os estágios invasivos da maioria dos apicomplexas são células polarizadas que usam seus sistemas de motilidade “gliding motility” ou “glideosomo” para passar por superfícies, migrar através de barreiras biológicas, invadir e deixar células hospedeiras. O processo central para a invasão é a desativação de receptores específicos que agem sobre a liberação regulada de proteínas apicais provenientes de organelas secretoras (micronemas, roptrias) (Carruthers e Tomley, 2008).

Pela ausência de qualquer organela locomotora como o flagelo, os apicomplexas são incapazes de “nadar”, mas exibem um modo único de deslocamento substrato-dependente, chamado *gliding motility* (Soldati e Meissner, 2004). *T. gondii* possui um citoesqueleto de actinmiosina (Dobrowolski e Sibley, 1996), que permite desenvolver o movimento em três formas: *gliding* circular, “rodopio vertical” e rotação em hélice (Hakansson et al., 1999). *Gliding motility* dirige a invasão ativa da célula hospedeira, o que é assessorado pelas proteínas secretórias que promovem a adesão e formação do vacúolo parasitóforo, onde se prossegue a replicação do parasita (Roiko e Carruthers, 2009). A invasão celular é um processo ativo que permite a inclusão de componentes da membrana plasmática do hospedeiro na formação deste vacúolo. Os parasitas secretam

uma variedade de proteínas que são cruciais durante a invasão e replicação intracelular (Carruthers e Sibley, 1997; Dubremetz, 1998).

A motilidade e invasão eficiente de *T. gondii* dependem da liberação de proteínas das organelas secretórias (micronemas, roptrias e grânulos densos) localizadas na proeminência apical do parasita. Tais características definem a estrutura do Filo Apicomplexa. Estas organelas secretam proteínas chaves que direcionam o contato dos parasitas com as células hospedeiras, a invasão e o estabelecimento do vacúolo parasitóforo (Baum et al., 2006). Estas proteínas são denominadas antígenos excretados/secretados (ESA) e possuem papel importante na estimulação do sistema imune. São expressos tanto por taquizoítos quanto por bradizoítos (Cesbron-Delauw e Capron, 1994; Prigione et al., 2000) e são apresentados na literatura, em sua maioria, pela abreviação das três primeiras letras da organela de origem. Estes antígenos serão mais detalhados nos itens a seguir.

1.8.1. Micronemas

Micronemas são as menores organelas localizadas na região apical dos parasitas (Carruthers e Tomley, 2008). Têm papel fundamental nos estágios precoces do processo de invasão celular ao promoverem a descarga de proteínas adesinas capazes de interagir com receptores da célula hospedeira, destacando-se entre elas a proteína MIC2 (Wan et al., 1997; Carruthers et al., 2000; Meissner et al., 2002; Huynh et al., 2003; Huynh e Carruthers, 2006), que parece ser a pivô na conexão do sistema motor de actina/miosina à superfície do parasita, bem como na superfície da célula hospedeira (Huynh et al., 2003; Huynh e Carruthers, 2006). O domínio citolítico localizado na porção C-terminal de MIC2 se liga à aldolase e serve como ponte aos filamentos curtos de actina (Jewett e Sibley, 2004) podendo interagir com miosina e ancorando ao complexo de membrana interna do parasita (Meissner et al., 2002).

As proteínas AMA1, MIC2, MIC6, MIC8 e MIC12 de *T. gondii* são clivadas durante a invasão no domínio transmembrana (DTM) pela atividade rombóide (Carruthers et al., 2000; Donahue et al., 2000; Howell et al., 2005) e liberadas na superfície do parasita. A invasão ativa é precedida pela ligação apical do parasita na

célula hospedeira, que coincide com a polarização e liberação de proteínas pelas micronemas. A secreção destas proteínas por estas organelas é regulada pela elevação dos níveis de Ca^{+} no parasita, que é estimulada pelo contato do parasita com a superfície da célula hospedeira. Este processo pode ser estimulado experimentalmente pela adição de etanol ou acetaldeído (Carruthers et al., 1999).

1.8.2. Roptrias

As roptrias são organelas secretórias em forma de garrafa, eletrodensas, delimitadas por membranas (Perkins, 1992) liberam suas proteínas durante a invasão celular. Produzem as proteínas excretadas/secretadas, com o tamanho variando de 42-68 kDa, e codificadas pelo gene da família da Roptria: ROP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 (Beckers et al., 1996) e ROP 9 (Park e Nam, 1999). O papel destas proteínas deve estar relacionado com à invasão, biogênese, manutenção do vacúolo parasitóforo e replicação (Sinai et al. 1997; Nakaar et al., 2003).

A secreção de proteínas das roptrias e dos micronemas se associam à superfície do parasita para formar o movimento de junção (MJ), que consta de círculos em forma de anel. Tal estrutura é composta pela aposição do parasita e a membrana plasmática do hospedeiro. O movimento é visível quando a membrana parasitária entra em contato com a célula hospedeira onde os parasitas deslizam pelo sistema actina-miosina. A formação do vacúolo parasitóforo (VP) é realizada com o movimento de junção. Assim ocorre uma invaginação e encapsulação do parasita no VP no citosol do hospedeiro (Martin et al., 2004; Sinai, 2008). AMA-1 (apical membrane antigen) é a proteína do micronema que contribue para o MJ (Marshall et al., 1989; Alexander et al., 2005). As proteínas secretadas das roptrias derivam do “pescoço” desta organela (Alexander et al., 2005; Lebrun et al., 2005), por este motivo são chamadas de RONS (Bradley et al., 2005).

1.8.3. Grânulos Densos

Os grânulos densos liberam suas proteínas depois da invasão, sendo que essa liberação continua dentro do hospedeiro (Carruthers e Sibley, 1997). Estas organelas são encontradas no interior do vacúolo parasitóforo (Dubremetz, 1998) e são relacionadas a sobrevivência intracelular e replicação (Carey et al., 2000; Neudeck et al., 2002). Foram descritas até agora 16 proteínas dos grânulos densos, GRA1-GRA10, GRA12, GRA14, 2 isoformas de nucleotídeo trifosfato hidrolase (NTPase I e II) (Johnson et al., 2003) e dois inibidores de protease (TgPI 1 e 2) (Morris et al., 2002; Pszenny et al., 2002). Estas proteínas (GRAs) ditam a conformação da rede de membranas tubular intravacuolar caracterizando a estrutura característica de roseta destes parasitas (Mercier et al., 2002; Magno et al., 2005).

1.9. Resposta imune humoral e celular

A resposta imune na toxoplasmose varia consideravelmente dependendo da apresentação clínica da doença. Respostas imunes locais e sistêmicas podem variar entre indivíduos, e dependem fortemente do *status* imune do hospedeiro (Suzuki e Remington, 1990). Taquizoítos podem estar presentes na circulação sanguínea durante toda a fase aguda da toxoplasmose, mesmo que já se tenha instalado a resposta imune protetora. Após duas a três semanas de infecção, a combinação de produção de citocinas, junto com a produção de anticorpos IgG, IgM, IgA e IgE contra as proteínas do parasito, levam os parasitos a se encistarem e se transformarem na forma intracelular de bradizoíto (Pereira-Chioccola et al., 2009; Costa-Silva e Pereira-Chioccola, 2010).

Entre 3 a 10 dias de infecção por *T. gondii* anticorpos IgM aparecem no soro, independentemente da cepa do parasito, espécie de hospedeiro, sexo ou idade. Inicialmente pensava-se que anticorpos IgM eram exclusivos da fase aguda, mas posteriormente foi observado que estes anticorpos eram achados meses ou até anos mais tarde, especialmente em gestantes envolvendo linfadenopatia (Del Bono et al., 1989; Gorgievski-Hrisoho et al., 1996). A reativação de cistos é uma hipótese que não pode ser excluída bem como a geração de reação cruzada com auto ou heteroanticorpos. A produção de IgM é seguida pela de IgA, que persiste de 6 a 7 meses, embora variando

consideravelmente no grau e duração tanto em adultos quanto em recém-nascidos congenitalmente infectados (Francis e Joynson, 1993; Gorgievski-Hrisoho et al., 1996; Sensini, 2006).

Os anticorpos IgA aparecem antes dos IgG, porém esta classe é regulada pelas citocinas interleucina 10 (IL-10) e o fator beta transformador de crescimento (TGF- β), citocinas da resposta Th3 (Defrance et al., 1992). Já os anticorpos IgE são induzidos por interleucina 4 (IL-4), porém são detectados durante a fase aguda. Estes anticorpos são produzidos por poucos recém-nascidos com infecção congênita não sendo úteis como marcadores diagnósticos (Foudrinier et al., 2003; Sensini, 2006). Ao contrário de humanos, camundongos não desenvolvem anticorpos IgE em resposta a infecção ou imunização com antígenos de *T. gondii* (Godard et al., 1990). Sendo assim, o modelo murino para regulação de isotipos têm se baseado nas subclasses de IgG, seguido de IgM e IgA. Durante a fase aguda, IgG2a e IgG2b, são produzidos principalmente pelo estímulo de IFN- γ enquanto que IgG1 é regulado por IL-4 e IL-13, sendo considerado um marcador de fase crônica (Godard et al., 1990; Nguyen et al., 1998). A relação entre o perfil de citocinas na indução da subclasse de IgG é mais complexa em humanos. Têm se observado que IgG1 e IgG3 são induzidas por IFN- γ e reforçada por IL-10 e TGF- β . IgG2 está ligado ao aumento de IL-2 e IL-6, enquanto que IgG4 é induzido por IL-4 e IL-13. Alguns estudos de cinética de subclasse de IgG mostram que IgG1 aparece primeiro e é dominante no soro, enquanto que as cinéticas observadas para IgG2, IgG3 e IgG4 são muito variáveis (Ee et al., 1989; Huskinson et al., 1989).

Em relação à resposta imune celular, durante a fase inicial da infecção, a resistência à *T. gondii* está relacionada com a produção inicial de interleucina 12 (IL-12) e IFN- γ por células natural killer (Buzoni-Gatel et al. 2006). Na infecção crônica, caracterizada pela presença de cistos teciduais, principalmente cerebrais, células T citotóxicas, CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais na produção da imunidade protetora Th1, mantendo os cistos quiescentes (Gazzinelli et al., 1992). O efeito protetor dessas células é explicado pela capacidade de produção de IFN- γ e atividade citotóxica contra taquizoítos ou células infectadas (Suzuki et al., 1989; Subauste et al., 1991). *Toxoplasma gondii* induz uma potente resposta imune. Taquizoítos estimulam os macrófagos a produzir interleucina 12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (Gazzinelli et al., 1996A; Sher e Souza, 1998). INF- γ e TNF- α agem sinergeticamente

para eliminar os taquizoítos pelos macrófagos (Gazzinelli et al., 1996A). A combinação destas duas citocinas resulta na produção de radicais livres e óxido nítrico (NO), que também atuam na morte do parasita (Sibley et al, 1991).

Nas últimas duas décadas foi estabelecida a importância da citocina IL-12 como direcionadora da imunidade polarizada à resposta Th1, para o controle da infecção (Gazzinelli et al., 1994; Aliberti et. al., 2004). Na ausência de IL-12 camundongos podem rapidamente sucumbir à infecção devido a alta replicação parasitária e a destruição tecidual. Esta citocina permite a extensão da sobrevivência até a fase crônica (Yap et al, 2000) e é produzida mais proeminentemente pelas células dendríticas, mas também por macrófagos e neutrófilos (Gazzinelli et al., 1994; Reis e Sousa et al., 1999; Bliss et al., 2000). Contudo a produção de IL-12 precisa ser controlada para prevenir uma patologia pró-inflamatória (Denkers, 2010).

A infecção primária por *T. gondii* conduz uma imunidade de longa duração, evitando re-infecções do hospedeiro (Filisetti e Candolfi, 2004). No entanto, foram relatados alguns casos de toxoplasmose congênita em mulheres imunocompetentes cronicamente infectadas, indicando a possibilidade de reinfecção em humanos (Dollfus et al., 1998; Silveira et al., 2003; Kodjikian et al., 2004; Elbez Rubinstein et al., 2009).

Células Th2 participam da regulação da resposta imune pela secreção de IL-4 e IL-10 que modula a síntese tanto de IL-12 quanto IFN- γ (Roberts et al., 1996). Assim, podem ser evitadas respostas imunes excessivas que predisõem a sérias inflamações e a lesões teciduais (Neyer et al., 1997). Camundongos *knockout* para IL-10 sucumbem à infecção com uma cinética notavelmente semelhante a animais com genes suprimidos para IL-12 e IFN- γ (Gazzinelli et al., 1996A). No entanto, a morte de animais deficientes em IL-10 está relacionada com baixo número de parasitas e aos altos níveis de IL-12, TNF- α e IFN- γ (Gazzinelli et al, 1996B; Suzuki et al., 2000). Por outro lado, TGF- β e IL-10, produzida também pelas células T regulatórias (Th3) e células dendríticas podem diminuir a atividade de macrófagos e células NK, levando a exacerbação da infecção (Hunter et al., 1995; Nguyen et al., 1998; Dawson et al., 2005).

1.10. Estudos de imunizações

A vacina ideal contra a toxoplasmose para humanos precisaria incluir antígenos que possam estimular uma resposta protetora Th1, caracterizada pela geração de IFN- γ produzido pelas células T CD4+ e CD8+ (Tan et al., 2010). Dentro deste contexto, a única vacina comercial é a “Toxovax” baseada em taquizoítos vivos atenuados da cepa mutante S48, usada na veterinária para limitar a incidência de aborto em ovelhas (Buxton e Innes, 1995).

Ao longo dos últimos 15 anos têm se observado um significativo progresso no desenvolvimento de vacinas contra a toxoplasmose devido aos avanços tecnológicos em biologia molecular (Kur et al., 2009). Um dos principais desafios no desenvolvimento de novas vacinas é a seleção de antígenos alvo de *T. gondii* e sua apresentação ao sistema imune do hospedeiro, de tal forma que induzam uma imunidade protetora e de longa duração.

Diversos estudos mostraram que ESA de *T. gondii* conferem alta imunogenicidade nos hospedeiros (Potasman et al., 1988; Decoster et al., 1988; Bessières et al., 1992; Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008) e que podem ser detectadas logo no início da infecção (Hughes e Vanknapen, 1982). As pesquisas têm se concentrado com antígenos de superfície (SAG) e com proteínas recombinantes provenientes das ESAs das roptrias, grânulos densos e micronemas, que agem como antígenos reconhecidos pelos linfócitos T de camundongos (Liu et al., 2006 A; Golkar et al., 2007; Costa-Silva 2008; Rosenberg et al., 2009; Dziadek et al., 2009). Dentre os antígenos candidatos a vacina para *T. gondii*, destacam-se antígeno de superfície SAG1, induzindo tanto resposta humoral quanto celular (Nielsen et al., 1999; Liu et al., 2006 A; Siachoque et al., 2006) e a proteína da MIC3 que é um antígeno particularmente promissor, visto que é uma proteína adesiva de *T. gondii* expressa nos 3 estágios infectantes do parasita estimulando uma boa resposta imune em camundongos (Ismael et al., 2003). Hiszczyńska-Sawicka et al., 2012 demonstrou que a imunização intramuscular de ovelhas com plamídeos contendo MIC3 induziu resposta significativa nestes animais com produção de IFN- γ , IgG2 e IgG1.

Recentemente, Eissa et al., 2012 mostraram que vacina com *Toxoplasma* autoclavado (ATV) quando combinado com BCG como adjuvante foi efetivo na estimulação da imunidade mediada por células com aumento de células T CD8+ esplênicas e retardando a mortalidade em nove dias quando comparado com o grupo controle e no estudo de Scorza et al., 2003 a imunização de camundongos C3H com plasmídeos expressando GRA1 atingiu uma proteção de 75-100% dos camundongos quando desafiados com cistos, o que também o torna um antígeno promissor.

Nos últimos anos têm aumentado o interesse em vacinas de DNA para induzir imunidade duradoura em animais e humanos. O principal atrativo desta tecnologia é a possibilidade de induzir uma ampla gama de resposta imune sem o uso de adjuvantes convencionais. Entretanto a maioria dos estudos têm se focado em camundongos e embora tenham tido êxito em induzir uma resposta imune protetora neste modelo, é menos eficaz na indução da imunidade em animais de grande porte e seres humanos (Babiuk et al., 1999). Um bom exemplo desse problema é a diferença entre as respostas de anticorpos em camundongos e macacos *Aotus* contra uma proteína da forma circunsporozoíta de *Plasmodium yoelli* (CSP). Após a imunização de DNA através da via intramuscular, os camundongos desenvolveram uma excelente resposta humoral enquanto macacos não têm uma resposta efetiva. Imunização com a mesma vacina de DNA por via intradérmica dá títulos de anticorpos muito elevados, tanto em camundongos e macacos (Gramzinski et al., 1997). Sendo assim, vários fatores podem influenciar no desempenho de um candidato a imunógeno, como modelo animal, rota de inoculação em conjunto com o “background” genético do camundongo (Munoz et al., 2011).

Neste contexto, em estudos anteriores de nosso grupo foi selecionado o modelo A/Sn para imunizações com ESA, o qual apresentou padrão de resposta parecido com C57BL/6 (Costa-Silva et al., 2008). Porém, durante o processo de obtenção deste antígeno necessário as imunizações, apesar de serem feitas lavagens nas culturas celulares com meio sem SFB, antes da infecção com taquizoítos, a análise eletroforética por SDS-PAGE sempre detectou traços do mesmo, já que este era necessário para o cultivo deste tipo celular (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008). Portanto, na concentração de cada lote de ESA sempre havia resquícios de SFB. Diante desta problemática, os experimentos do presente trabalho utilizaram células VERO que

crecem sem adição de SFB. Embora estudos prévios tenham demonstrado que a produção de parasitas neste sistema é ligeiramente reduzida na ausência de SFB (Diab e El Bahy, 2008), as vantagens do uso de *T. gondii* em linhagens celulares que crescem sem SFB não estão totalmente estabelecidas. O uso de soro nas culturas celulares apresenta certas desvantagens, como potencial para induzir a hipersensibilidade em vacinas, bem como a possibilidade de ter possíveis contaminantes (bactérias, fungos, mycoplasma, vírus bovinos, etc.) e o alto custo de um soro de boa qualidade (Fishbein et al., 1993; Froud, 1999; Frazatti-Gallina et al., 2004). Sendo assim, além do antígeno ESA produzido em culturas celulares na ausência de SFB também foi produzido antígeno lisado de taquizoítos (ALT), necessário a alguns experimentos. Normalmente a cepa RH utilizada para a produção de ALT é mantida em camundongos, e o ALT produzido *in house* apresenta alta especificidade e sensibilidade em relação à kits comerciais. No entanto, quando a demanda de exames e/ou experimentos é grande necessita-se de biotério e grande número de camundongos. Logo, a produção antigênica é trabalhosa exigindo sacrifício de elevado número de animais. Diante disto, a primeira parte deste trabalho foi dedicada à produção de antígenos, necessários aos ensaios de imunização e avaliação da resposta imune.

Como já destacado neste mesmo estudo de Costa-Silva 2008, foi verificado que os anticorpos anti-ESA são importantes no controle da infecção. Experimentos *in vitro* demonstraram que estes anticorpos reconhecem os taquizoítos e que participam da lise do parasito mediada pelo complemento. Sendo assim, com estes dados iniciais do trabalho anterior avaliamos a imunização de camundongos A/Sn com ESA através da observação da resposta imune celular através da dosagem de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-12 p70) e humoral comparando com a infecção natural e com animais livres de infecção. Visto que diante da alta complexidade de vários fatores envolvidos na resposta imune da toxoplasmose, o estudo mais aprofundado de antígenos alternativos de fácil produção pode ajudar no melhor entendimento da doença gerando novas perspectivas.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da ESA excretada/secretada por *T. gondii* na estimulação das respostas imune humoral e celular na toxoplasmose.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

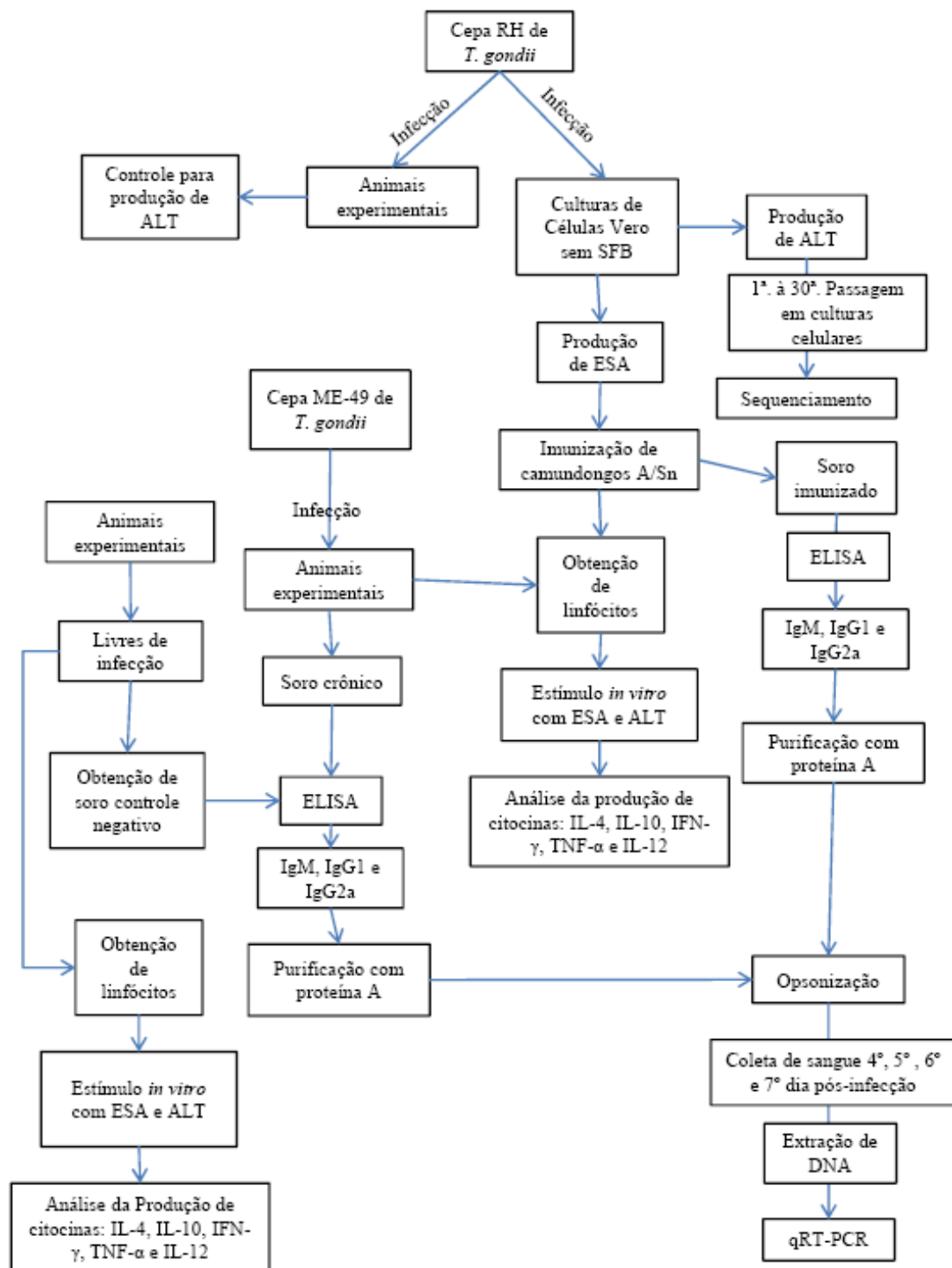
- Produzir antígeno lisado (ALT) a partir de taquizoítos adaptados às culturas após a otimização da produção dos parasitos
- Produzir antígeno excretado/secretado (ESA) a partir de taquizoítos adaptados às culturas celulares

Imunizar camundongos A/Sn com ESA e investigar:

- O desafio e mortalidade
- A produção das citocinas IFN γ , TNF α , IL10, e IL4 após estímulo de linfócitos de baço dos camundongos imunizados com os antígenos ESA e ALT
- A classe de imunoglobulina IgM e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) envolvidas na imunoproteção
- A opsonização de taquizoítos com anticorpos IgG anti-ESA e anti-*T.gondii*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento Experimental



3.2. Animais experimentais

Para a manutenção da cepa RH e ME-49 de *T. gondii* foram utilizados camundongos Swiss, de ambos os sexos, com idade entre 25 a 30 dias. Nos ensaios de imunização foram utilizados camundongos isogênicos, fêmeas com idade entre 25 e 30 dias da linhagem A/Sn conforme descrito previamente (Costa-Silva et al., 2008).

Todos os animais foram provenientes do Biotério de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

Este estudo foi realizado seguindo as recomendações da “Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/ Colégio brasileiro de Experimentação Animal” (SBCAO/COBEA) e foi aprovado no comitê de ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (anexo 1).

3.3. Cultura de células

Conforme a problemática apresentada no último item da introdução, as culturas celulares utilizadas neste estudo foram VERO (ATCC- CCL-81), obtidas da Seção de Raiva do Instituto Butantã. Foram mantidas no laboratório de cultura de células do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz em meio VPM SFM AGT contendo 4mM l-glutamina, 2.5 µg/ml gentamicina (Gibco-Invitrogen). As culturas mantidas neste meio foram lavadas uma vez com PBS, incubadas com 0.25% de tripsina (Invitrogen) por 5 min à temperatura ambiente. Posteriormente a tripsina foi aspirada e as células suavemente descoladas da parede da garrafa. Subsequentemente uma nova alíquota de meio foi adicionada as células e estas contadas em câmara de Neubauer. Os subcultivos foram feitos a cada 3-4 dias, sendo as culturas mantidas em estufa 5% de CO₂ à 37°C.

3.4. Manutenção e obtenção dos parasitos

3.4.1. Cepas de *T. gondii*

Foram utilizadas duas cepas de referência: cepa RH, do tipo I, altamente virulenta e de multiplicação rápida (Sabin e Feldman, 1948; Dubey, 1993; Howe e Sibley, 1995) e a cepa ME-49 do tipo III produtora de cistos teciduais (Howe e Sibley, 1995).

As duas cepas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo e mantidas no biotério de experimentação do Instituto Adolfo Lutz.

3.4.2. Cepa RH -taquizoítos peritoneais

Os parasitas da cepa RH foram mantidos por passagens sucessivas em camundongos da linhagem Swiss, por via intraperitoneal com cerca de 1×10^5 parasitas/animal. Após quatro dias de infecção os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e foram feitas lavagens intraperitoneais com 5 mL/animal de NaCl 0,85% estéril para a retirada dos taquizoítos. Posteriormente, foram feitas contagens dos parasitas em câmara de Neubauer e acertadas a concentrações desejadas. Os taquizoítos foram utilizados para a manutenção da cepa através de passagem para um novo grupo de animais, para a preparação dos antígenos e infecção das culturas de células.

3.4.3. Cepa ME-49 - cistos teciduais

Cistos da cepa ME-49 foram mantidos através de sucessivas passagens, com intervalos de 30 a 45 dias, em camundongos Swiss. Cada animal recebeu, por via oral, uma suspensão de 10 cistos/animal obtida de macerado de cérebro de camundongos previamente infectados em 3 mL de solução fisiológica tamponada 0,01M pH 7.2 (PBS) estéril. Para quantificação dos cistos, cerca de 10 µl da suspensão cerebral foi colocada entre lâmina e lamínula e observada ao microscópio de luz, sob objetiva de 40X. Esta infecção teve como objetivo a obtenção de soro positivo (anti-*T. gondii*) para uso nas

reações sorológicas, experimentos de opsonização e para obtenção de linfócitos para os experimentos de dosagem de citocinas.

3.5. Otimização da produção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii* em células VERO

Garrafas de cultura de 25-cm² foram incubadas com 1x10⁵, 5x10⁵, 1x10⁶ e 5x10⁶ células/garrafas. Cada grupo foi composto por 2 garrafas e incubado com 5 mL de meio à 37°C em estufa de CO₂ à 5%. As células foram observadas por 24, 48, 72, 96 e 120 horas, utilizando um microscópio invertido até a completa formação da monocamada celular. Os resultados foram expressos em porcentagem. O total de células escolhido para ser utilizado nas infecções foi de 1x10⁶, pois foi o que teve melhor desempenho para a formação da monocamada. A determinação do número de taquizoítos por célula foi realizada infectando-se garrafas em duplicata contendo 1x10⁶ células com 7x10⁵, 1.5x10⁶ e 3x10⁶ parasitos da cepa RH de *T. gondii* provenientes de lavado peritoneal de camundongos previamente infectados. As garrafas foram incubadas em estufa de CO₂ à 5%. A liberação dos taquizoítos nos sobrenadantes das culturas foi observada diariamente por 10 dias, contados em câmara de Neubauer. Após observação das garrafas foi definido que para todos os experimentos seria utilizada a proporção de 3 parasitas/célula. Os taquizoítos foram mantidos por 30 passagens nas culturas e a cada 5 passagens (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a), os parasitas foram coletados e utilizados para infectar mais 2 garrafas de cultura de células com a intenção de avaliar os experimentos de infectividade *in vitro* e *in vivo*, bem como, produção de antígeno.

3.5.1. Infectividade de *T. gondii* *in vitro* e *in vivo*

As primeiras infecções foram feitas a fim de determinar a multiplicidade de infecção (MOI), que é o número médio de parasitas, necessário para se obter uma boa infecção por célula hospedeira. O MOI é determinado dividindo-se o número de parasitas acrescentado pelo número de células utilizadas. Em seguida, foi testada se a infectividade do parasita em camundongos diminuía com o número de passagens do parasito nas culturas celulares.

Para comparar a infectividade dos parasitos liberados nas células VERO em meio VP SFM AGT, fontes diferentes de taquizoítos foram utilizadas para infectar camundongos Swiss divididos em 4 grupos. Taquizoítos de culturas de células (coletados na 1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a passagens) foram utilizados para infectar camundongos divididos em dois grupos (1A e 1B). O grupo 1A recebeu 1×10^5 taquizoítos/animal e o grupo 1B recebeu 1×10^6 taquizoítos/animal. Dois grupos controles (2A e 2B) receberam o mesmo esquema de inoculação utilizando taquizoítos provenientes de peritônio de camundongos. Após 4 dias, o fluído peritoneal foi coletado de cada camundongo e os níveis de infecção foram avaliados pela contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Estes experimentos foram feitos duas vezes para confirmar os resultados (dois experimentos independentes)

3.5.2. Purificação de DNA e PCR dos taquizoítos produzidos *in vitro*

Suspensões de 10^7 taquizoítos/mL, coletadas em cada 5 passagens em culturas de células VERO, foram utilizadas para extração DNA pelo kit Qiagen, conforme as instruções do fabricante. Concentrações de DNA e pureza foram determinadas pela razão de D.O a 260 e 280 nm em um espectrofotômetro NanoDrop ND100 (Thermo Scientific). Os experimentos de PCR e sequenciamento foram feitos utilizando dois pares de primers SAG2 F4/R4 (5'-GCT ACC TCG AGG AAC AAC AC-3' e 5'-GCA TCA ACA GTC TTC GTT GC-3'), que amplificam um produto de aproximadamente 300bp. E o segundo foi o marcador SAG2 F2/R2 (5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC3' e 5'AACGTTTCACGAAGGCACAC3'), que amplificam um produto de 240pb do outro lado 3' do gene SAG2 (Howe et al., 1997; Khan et al., 2007). Cada PCR foi realizada em um termoaciclador Long Gene Thermal Cycler em um volume final de 25 µl. As amostras de DNA (2 µl) e 15 pmol de cada primer foi adicionado a um kit Promega (Go Taq Master Mix Green). O mix do PCR (12,5 µL) foi composto de 1 unidade de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂ e 200 mM de cada dNTP. Cada ciclo de amplificação continha dois controles negativos (água ultra pura e um DNA negativo para toxoplasmose) e um positivo para *T. gondii*. As condições termais foram feitas com um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos à 95°C, 35 ciclos de desnaturação por 5 minutos à 94°C por 30 segundos, anelamento à 55 °C por 1 minuto, e extensão à 72°C por 90 segundos. O procedimento

foi completo por um ciclo final de extensão por 3 minutos. Depois das ciclagens, produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídio. Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz UV. As imagens foram analisadas por uma câmara de gel MiniBIS sistema de documentação e (BioSystematica). O tamanho dos fragmentos foi determinada com base na comparação de um marcador molecular de 100 pb (Ferreira et al., 2008).

3.5.2.1. Sequenciamento de DNA dos taquizoítos produzidos *in vitro*

Cada produto de PCR, foi utilizado para o seqüenciamento do DNA, após purificação com um kit específico de acordo com as instruções do fabricante (PCR Clean-up kit System - Promega). Os fragmentos foram seqüenciados com os primers citados anteriormente, para obter ambas sequências “forward” e “reverse” para os dois marcadores. O seqüenciamento foi feito no Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, usando o kit ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing e as eletroforeses foram feitas em um aparelho ABI Prism 377 DNA Sequencer. As seqüências nucleotídicas foram analisadas manualmente, montadas e alinhadas para a comparação utilizando Bio-Edit Sequence Alignment Editor. Foram feitos alinhamentos com seqüências publicadas no GenBank em "NCBI BLAST / nucleotídeo-nucleotídeo" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.5.3 Produção de antígenos e ensaios imunológicos

3.5.3.1. ALT

Foram testados 2 protocolos para a produção de antígenos utilizando 1×10^7 taquizoítos/mL em PBS coletados nas 1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a passagens em culturas de célula VERO livre de soro fetal bovino. O primeiro método testado foi o método convencional previamente descrito (Colombo et al., 2005; Costa- Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Os taquizoítos foram sonicados por 10 ciclos a 1.0 A/min, por 5 minutos com 2 minutos de intervalo. No segundo protocolo, os taquizoítos foram lisados utilizando pérolas de vidro (SIGMA -150:212 microns) por vórtex por 8 ciclos

de 4 minutos com 2 minutos de intervalo. Em ambos os procedimentos o ALT foi dissolvido em 0.3M NaCl e as concentrações protéicas foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop ND100 (Thermo Scientific). As porcentagens de lise dos taquizoítos foram calculadas pela contagem de parasitas viáveis por microscopia.

ALT foi avaliado por ELISA utilizando os seguintes grupos de soros: i. 10 soros de pacientes crônicos; ii. 10 soros de pacientes negativos para toxoplasmose; iii. 2 “pools” de soros positivos (5 de camundongos crônicos infectados com a cepa ME-49); e iv. 2 “pools” de soros negativos (5 camundongos sem infecção). As reações foram realizadas em placas de poliestireno (fundo chato, low binding, Corning) utilizando ALT na concentração de 2µg/mL. Cada placa foi incubada overnight à 4°C com o antígeno dissolvido em 0.1 mL NaHCO₃, 0.1 M pH 8.5. Os antígenos não ligados à placa foram removidos com lavagens com PBS Tween 20 (0.05%), pH 7,2. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS- leite desnatado (Molico) 5%. Após uma hora, 50 µl de cada amostra de soro diluída 1:50 (camundongos) e 1:200 (humanos) em PBS-leite 5% foram incubadas por 60 min à 37 °C. Após esta incubação, foram feitas 5 lavagens com PBS–Tween 20 e as amostras incubadas com os anticorpos conjugados à peroxidase por 60 min à 37 °C. Imunoglobulina G anti-camundongo (1:4000) e imunoglobulina G anti-humano (1:20000) (Sigma) diluído em PBS-leite 5%. Após novo ciclo de lavagens com PBS–Tween 20 foi adicionado a solução substrato (0.1 M ácido cítrico, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.05% *o*-phenylenediamine, 0.1% H₂O₂) a cada poço da placa e deixado à temperatura ambiente no escuro por 30 min. A reação foi parada adicionando-se 50 µl de H₂SO₄ 4N. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA (Multiscan; Labsystems) com o filtro 492 nm. As reações foram previamente padronizadas (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Cada amostra de soro foi ensaiada em duplicata. Os valores de absorbância foram subtraídos do “background” e a média aritmética de cada grupo foi calculada. Os valores de cada grupo foram representados pelas médias e desvio padrão da absorbância de cada amostra de soro. As amostras foram feitas duas vezes para confirmação dos resultados.

3.5.3.2. ESA

Os sobrenadantes das culturas celulares infectadas por *T. gondii* (preparados como descrito por Meira et al., 2008; Costa-Silva et al. 2008) foram retirados após 48 horas de infecção, passados para tubos de 15 mL (Corning). A seguir, os parasitas foram removidos por duas centrifugações de 2800 g por 10 minutos e filtrados em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro (MILLIPORE - USA). O sobrenadante livre de taquizoítos, contendo as ESAs, foi suplementado com adição de 10 µg/mL de um coquetel de inibidores de protease contendo por mL: AEBSF 20µm; EDTA 10µm; Bestatin 1,3µm; E-64 0,14µm; Leupeptin 10 nm e Aprotinin 3 nm (Sigma) e concentrado em *Speed Vac* (RC 10.09 - Jouan) por 4 horas. O concentrado final foi colocado em saco de diálise com poros que retém moléculas com massa molecular superiores a 12 kDa (Sigma) e dialisado contra PBS pH 7.2 a 4°C por aproximadamente 18 horas.

3.6. Experimentos de resposta imune - grupos experimentais

3.6.1. Grupos de animais imunizados

As imunizações foram realizadas como descrito previamente por Pereira-Chiocola et al. (1999) e Costa-Silva et al (2008). Grupos de 5 camundongos A/Sn fêmeas foram imunizados por via intraperitoneal com 4 doses quinzenais (0; 2; 4; 6) de 20 µg/animal de ESA acoplado ao adjuvante ALUM (0,5 mg de hidróxido de alumínio/animal – J. T. Baker).

3.6.2. Grupos controles

3.6.2.1. Controle negativo

O grupo controle negativo recebeu por via intraperitoneal 4 doses quinzenais de adjuvante ALUM (0,5 mg de hidróxido de alumínio/animal – J. T. Baker) dissolvido em 200 µl de solução salina estéril. Este grupo também foi constituído de 5 camundongos A/Sn, sendo as doses administradas no mesmo período do grupo imunizado.

3.6.2.2. Controle positivo

O grupo controle positivo foi constituído de 5 camundongos A/Sn infectados com a cepa ME-49, conforme descrito no item 3.4.3.

Uma semana após a última imunização, amostras de sangue foram coletas pela via caudal dos grupos de camundongos imunizados e controle negativo para determinação de anticorpos específicos, bem como para os experimentos de opsonização. Soro proveniente do grupo de animais infectados (positivos), foram coletados 50 dias pós-infecção. Para os ensaios de citocinas, baço de três camundongos foram coletados dentro de condições assépticas.

3.6.3. Grupos de animais- experimentos de opsonização

Três grupos de 5 camundongos A/Sn receberam pela via intraperitoneal IgG provenientes de animais imunizados, IgG anti-*T. gondii* e IgG de animais livres de infecção incubados com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH, sendo observados os níveis de parasitemia e o índice de sobrevivência. Conforme descrito no item 3.9.1.

3.7. Desafio dos camundongos imunizados com *T. gondii*

Realizadas as imunizações, uma semana após a última dose, prosseguiu-se com o desafio dos grupos de camundongos (imunizados e controles: positivos e negativos) com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH/animal. Após o primeiro dia de infecção, diariamente foi observada a mortalidade em todos os grupos. Do 4º ao 7º dia pós-desafio foi coletado sangue pela via caudal de cada grupo de animais (soros em *pool*). Deste sangue, o DNA foi extraído, conforme descrito no item 3.7.1.2., com a finalidade de estimar os níveis de parasitemia nos camundongos por qrtPCR. Os índices de sobrevivência foram observados diariamente e o experimento realizado duas vezes.

3.7.1. Determinação dos níveis de parasitemia por qrtPCR (Quantitative real-time PCR) dos animais desafiados

3.7.1. 2. Extração de DNA de taquizoítos da cepa RH para confecção de curva padrão

Para a determinação dos níveis de parasitemia, foi necessária a construção de uma curva padrão de DNA, sendo utilizados taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e acertados à concentração de 1×10^7 parasitas. Os parasitas foram diluídos em série para obter os pontos da curva padrão, variando a concentração de 1×10^7 a 10 parasitas (Mesquita et al., 2010; Reimão et al., 2012). As diversas concentrações foram centrifugadas e os sedimentos dissolvidos em uma solução contendo 10mM tris-HCl pH8,0; 10mM EDTA; 0,5% SDS; 0,01% N-laurilsarcozyl; 100ug/mL de proteinase K. Foram misturados e incubados a 56°C até a completa lise. O DNA foi extraído usando o PureLink Genomic DNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os pontos da curva foram testados em triplicata.

3.7.1.3. Extração de DNA de sangue e qrtPCR

As amostras de sangue provenientes dos camundongos dos grupos desafiados (item 3.7.) e dos grupos de camundongos que foram infectados com parasitas opsonizados (item 3.9.1) foram coletadas do 4º ao 7º dia pós infecção e adicionadas (*pool/grupo*) em um tubo contendo 200 µl de tampão de lise (10 mM Tris– HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurilsarcozyl, 100 µg/mL proteinase K). As extrações de DNA foram feitas pelo kit PureLink Genomic DNA (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Os pellets de DNA foram dissolvidos em água ultra pura. As concentrações e a pureza do DNA foi determinada pela razão da D.O de 260 e 280 nm em NanoDrop ND100 (Thermo Scientific). Cada qrtPCR foi feita como descrito anteriormente por Mesquita et al., 2010 com o aparelho Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System em um volume final de 20µl. As amostras ou DNAs controles (3 µl) foram adicionadas a uma mistura contendo 10 µl de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e 1µl do “Assay Mix” que inclui o iniciador forward, 18 µM (5'-CAAGCAGCGTATTGTCGAGTAGAT-3'); o iniciador reverse, 18 µM (5'-

GCGTCTCTTTCATTCCCACATTTT-3'); e a sonda TaqMan MGB marcada com o fluoróforo FAM, 5 μ M (5'- CAGAAAGGAACTGCATCCGTT -3'). As amplificações continham 2 controles negativos (água ultrapura e um DNA negativo para toxoplasmose) e um controle positivo (DNA extraído da cepa RH de *T. gondii*). As amplificações foram realizadas com uma temperatura inicial de 50°C por 2 minutos para a atividade ótima da enzima AmpliErase UNG e 95°C por 10 min. Em seguida foram realizados 40 ciclos compostos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. O sistema *ABI 7300* verifica o sinal fluorescente a cada segundo e calcula automaticamente o *mean baseline* (ou *baseline fluorescence*), ou seja, o “sinal de fundo” da fluorescência gerado durante os ciclos iniciais (3-15) da qrtPCR. Com base nesta “fluorescência de fundo” pode-se detectar a fluorescência gerada pelo acúmulo de DNA amplificado, denominado *Ct* (*threshold cycle*), com acurácia. O *Ct* é definido como o ciclo em que a fluorescência excede estatisticamente o *mean baseline*, sendo proporcional ao número de DNA alvos presentes na amostra e representando a mesma quantidade de produtos amplificados presentes no tubo.

3.8. Experimentos de resposta celular

Os experimentos de resposta celular foram realizados no Instituto Butantan, no laboratório de Bacteriologia.

3.8.1.Obtenção de linfócitos

Baços de 3 camundongos A/Sn divididos nos grupos: imunizados e controles (positivo e negativo) foram retirados de forma estéril com o auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente o baço foi dissociado em PBS (PH 7.2) em uma placa de petri e com ajuda de duas lâminas com extremidade esmerilhada o baço foi comprimido entre as duas extremidades. O conteúdo da placa de petri, com as células em PBS, foi transferido para um tubo falcon, adicionado PBS até completar 20 mL e centrifugado em 1000 g por 10 min à 4° C. Sobre o pellet foi adicionado tampão ACK pH 7,2 (NH₄Cl 0,15M; KHCO₃ 10mM; Na₂EDTA 0,1M) e deixado agir por 5 minutos em repouso. Posteriormente as células do baço foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas

em meio RPMI + 10% SFB, β -Mercapto e antibióticos (penicilina: 50 U/mL ou estreptomicina: 50 mg/mL) em placa de 24 poços (500 μ l/poço - 5×10^6 /poço mL).

3.8.2 Cultura de Linfócitos para dosagem das citocinas

Os linfócitos obtidos como descrito no item anterior e distribuídos em placas de 24 poços foram incubados com ESA e ALT em diferentes concentrações (0,5, 1, 5, 25 e 50 μ g/ poço) a fim de se padronizar a concentração desejada. Para controle dos experimentos *in vitro*, em todos os ensaios realizados com esplenócitos dos três grupos de camundongos (imunizados, controle positivo e negativo) foram incluídos, dois poços controles em duplicata (positivo e negativo). Os poços que ficaram sem estímulo, apenas com o meio de cultura foi considerado negativo. Os outros dois poços foram estimulados com proliferadores mitóticos (ConA ou LPS), sendo considerados controles positivos. ConA - Sigma (2 μ g/mL) foi utilizado como controle de produção das citocinas: IL-10, IL-4 e IFN- γ e LPS de *Escherichia coli* O11 B4 (2 μ g/mL) - Sigma para TNF- α . ConA e LPS são indutores da formação destas citocinas. Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram coletados após 20 hs para dosar TNF- α , 48hs para IL-10 e IL-4 e após 72 h para IFN- γ . Foram feitos pelo menos três experimentos *in vitro* para cada grupo de animal (imunizados e controles: positivo e negativo).

Após os experimentos *in vitro* descritos acima as citocinas IFN- γ , IL-4, TNF- α e IL-10 foram dosadas nos sobrenadantes colhidos com o auxílio de kits específicos (Ebioscience) por ELISA, sendo seguida as instruções do fabricante. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA (Multiscan; Labsystems) com o filtro 450 nm. Os resultados expressos em D.O (densidade óptica) foram convertidos em pg/mL a partir de uma curva de concentração feita com um anticorpo recombinante sabidamente conhecido que integrava o kit. O limite de detecção para cada teste foram os seguintes: IFN- γ 62,5 pg/mL, IL-4 7,8 pg/mL, IL-10 foi de 62,5 pg/mL e TNF- α 31,25 pg/mL.

3.9. Padronização e determinação dos níveis de IgM e subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a por ELISA

ESA ou ALT foram utilizados como antígenos nas reações com objetivo de avaliar os anticorpos dos camundongos imunizados e controles (positivo e negativo). Ambos antígenos foram diluídos em 0,1M bicarbonato de sódio pH 8.5 nas concentrações desejadas (ESA- 5µg/mL e ALT- 1µg/mL) e colocados 50 µl por orifício em placas escavadas de fundo chato com 96 orifícios (Corning). Após a incubação por 18 horas com os respectivos antígenos à 4°C, foram feitas 5 lavagens com PBS Tween (0,05%). As placas foram então bloqueadas com 100 µl de PBS-Leite desnatado 5% por 30 minutos em temperatura ambiente. As padronizações foram realizadas com 5 soros por grupo em duplicata. Para cada grupo os soros foram diluídos seriadamente a partir de 1:16 à 1:512 em PBS-Leite desnatado 5% e foram adicionados nos orifícios em duplicata num volume de 50 µl e incubados por uma hora a 37°C. Após novas 5 lavagens com PBS Tween 0,05% foram adicionados 50 µl/orifício de IgM, IgG1 e IgG2a de camundongo conjugada a peroxidase (Sigma) nas diluições de (1:1000; 1:2000; 1:8000). As placas foram incubadas por mais uma hora à 37°C. Após novas lavagens, ocorreu a revelação da reação em câmara escura após 30 minutos, e posterior interrupção com H₂SO₄ 4 N. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA (Multiscan; Labsystems) com o filtro 492 nm. As reações foram previamente padronizadas (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Cada amostra de soro foi ensaiada em duplicata. Os valores de absorbância foram subtraídos do “background” e a média aritmética de cada grupo foi calculada. Os valores de cada grupo foram representados pelas médias e desvio padrão da absorbância de cada amostra de soro. As amostras foram ensaiadas duas vezes para confirmação dos resultados e estes analisados conforme descrito no item 3.10.

3.9.1. Purificação de anticorpos e experimentos de opsonização

Soros em *pool* foram coletados de cada grupo de camundongos (imunizados, crônicos e normais) e utilizados para purificação em coluna de proteína A. Os soros foram diluídos separadamente em fosfato de sódio à 20 mM e passado em coluna de proteína A (HiTrap- 1 mL, Amersham Biosciences) previamente equilibrada no mesmo

tampão. Após a lavagem da coluna com 10 volumes do tampão, os anticorpos foram eluídos com ácido cítrico à 0.1 M (pH 3.6). Cada fração eluída (500 µL) foi imediatamente neutralizada pela adição de 50 µL de TrisHCl (pH 8.8) 1.5M e o material eluído dializado contra um litro de PBS. A quantificação de proteína foi estimada pela absorvância à 280nm em NanoDrop ND100.

Os anticorpos purificados de cada grupo, na concentração de 2.5µg foram incubados com 1×10^3 taquizoítos (cepa RH) à 37°C por 90 minutos. Em seguida, os parasitas foram utilizados para infectar outros 3 grupos de 5 camundongos A/Sn. O primeiro grupo recebeu parasitas incubados com IgG purificada de camundongos imunizados. O Segundo grupo recebeu os parasitas incubados com IgG purificada anti-*T. gondii* (camundongos infectados crônicos); e o último de camundongos normais (livres de infecção). Todos os animais receberam o inóculo pela via intraperitoneal contendo os anticorpos (0.5µg) e taquizoítos (1×10^3).

Alíquotas de sangue dos camundongos foram coletados nos 4º, 5º, 6º dias pós-infecção para determinação dos níveis de parasitemia por qrtPCR, conforme descrito no item 3.7.1.2 e os índices de sobrevida observados diariamente. Os experimentos foram realizados duas vezes para confirmar os resultados.

3.10. Análise estatística

As análises estatísticas deste trabalho foram feitas com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram calculados pelo teste *T de Student* por análise bicaudal não pareada. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todas as análises correspondem pelo menos três experimentos e representam os valores médios com desvio padrão.

4. RESULTADOS

4.1. Otimização da produção *in vitro* da cepa RH de *T. gondii* em células VERO (ATCC- CCL-81)

As padronizações das culturas de células VERO em meio VP para infecção com *T. gondii* foram feitas em dois passos. O primeiro foi para se estabelecer o inóculo ótimo de células para a formação da monocamada celular na garrafa de cultura. Quatro diferentes concentrações foram testadas (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 ou 5×10^6 células) em garrafas de 25 cm² em um volume total de 5 mL de meio VPM SFM AGT. As culturas de células foram avaliadas diariamente. A tabela 1 mostra que a melhor concentração foi de 1×10^6 como inóculo inicial e a formação total da monocamada foi de 96 horas. A concentração de 5×10^6 como inóculo inicial resultou em uma rápida confluência para formação da monocamada (48hs); porém após 72 hs gerou-se um excesso de células e ocorrência de morte celular.

A segunda etapa foi feita para estabelecer o número ótimo de taquizoítos para a infecção das culturas. Três garrafas de 25 cm² (em triplicata) contendo 1×10^6 células VERO livre de SFB foram infectadas com 7×10^5 , 1.5×10^6 e 3×10^6 taquizoítos em um volume final de 5 mL. Como mostra a tabela 2, a melhor coleta de taquizoítos foi de 2.1×10^7 /mL utilizando um inóculo inicial (1.5×10^6 taquizoítos/garrafa) após 7 dias de infecção. Entretanto resultados similares foram encontrados com as infecções de 0.7 e/ou 3.0×10^6 após 8 a 7 dias de infecção respectivamente.

Tabela 1: Formação de monocamada celular em garrafas de 25cm² com diferentes concentrações por inóculo de células VERO (ATCC- CCL-81). * excesso de células ou morte celular

Concentração inicial de <i>células VERO</i> (x10 ⁶) (adicionadas a garrafas de 25-cm ²)	Percentual de formação da monocamada de células				
	Tempo de incubação (hs)				
	24	48	72	96	120
0.1	20	30	50	60	*
0.5	50	70	80	90	100
1	70	90	95	100	100
5	80	100	100	*	*

Tabela 2: Quantidade de taquizoítos viáveis obtidos de sobrenadante de culturas de células VERO (ATCC- CCL-81) após infecção com a cepa RH de *T. gondii*^a. Os resultados foram expressos pela contagem de taquizoítos obtidos de 5 mL de meio das culturas infectadas durante 10 dias. (média de três culturas de 25-cm²). Os experimentos foram feitos em duas vezes para confirmar os resultados. * Parasitas inviáveis.

Número de taquizoítos adicionados em garrafas de 25-cm ² (x10 ⁶) ^a	Quantidade de taquizoítos viáveis liberados (x10 ⁶ /mL)										
	Dias pós-infecção (multiplicação dos taquizoítos após inóculo inicial)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0.7	0	0	0.1	0.2	1.3	11.2	20	20	11	*	
1.5	0.01	0.05	0.05	0.1	0.5	1.2	21	10	10	*	
3.0	0.01	0.02	0.08	0.2	0.9	6.2	20	17	*	*	

4.2. Infectividade de *T. gondii* *in vitro* e *in vivo*

A infectividade dos taquizoítos liberados das culturas celulares foi avaliada durante 30 passagens em cultura. Dois grupos de camundongos Swiss foram infectados com 1×10^5 e 1×10^6 parasitas provenientes de culturas de células comparando-se com outro grupo que foi infectado com a mesma quantidade de parasitas, porém com taquizoítos provenientes de camundongos (grupo controle), como descrito em Materiais e métodos. A Figura 5 A mostra a quantidade de taquizoítos do fluído peritoneal de camundongos infectados 4 dias antes com taquizoítos provenientes de culturas celulares (a cada 5 passagens) e a Figura 5 B com taquizoítos provenientes de outro grupo de camundongos. Os resultados foram expressos com as médias e desvios padrão de dois camundongos por grupo. A análise estatística (Test T de Student's e test F) foram feitos para determinar se a infectividade com parasitas provenientes de culturas de células (Figura 5A) e de camundongos Swiss (Figura5B) foram estatisticamente diferentes. A análise de variância feita pelo teste F revelou que os grupos infectados com 1×10^5 parasitas, 1A e 2A (1.348, P= 0.2520) não foram estatisticamente diferentes, bem como os grupos 1B e 2B (1.199, P=0.2520), que receberam 1×10^6 parasitas. Embora tenha sido observado variações de infectividade por grupo durante o mesmo período de inoculação, estes resultados mostraram que as concentrações de taquizoítos recolhidas no fluído peritoneal após 4 dias de infecção foram similares nos camundongos infectados com taquizoítos provenientes de culturas de células VERO ou de outros grupos de camundongos. Tanto os dados dos experimentos *in vitro* e *in vivo* mostrou que ao menos até a 30ª passagem em cultura, os parasitas mantiveram a mesma infectividade que *in vivo*.

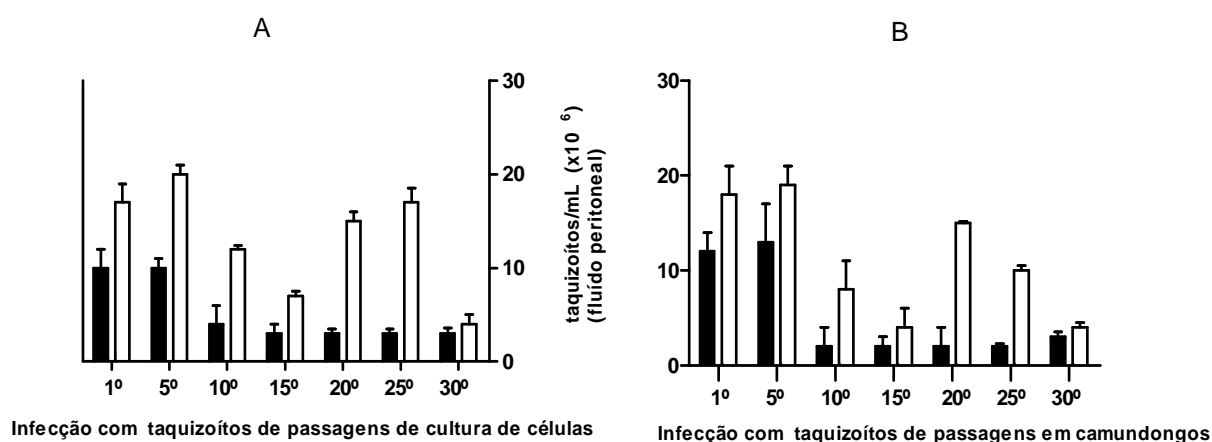


Figura 5: Experimentos de infectividade *in vivo*: Número de tachizoítos de *T. gondii* colhidos de lavado peritoneal de camundongos após 4 dias de infecção. **A.** Grupo 1A, barras pretas; e 1B, barras brancas receberam 1×10^5 e 1×10^6 tachizoítos/animal, respectivamente. Estes parasitas foram provenientes de sobrenadantes de culturas de células VERO previamente infectadas sem SFB. **B.** Grupos controles 2A (barras pretas) e 2B (barras brancas) receberam no mesmo dia o mesmo esquema de tachizoítos, porém com parasitas coletados de outro grupo animais infectados. Os tachizoítos das culturas celulares foram coletados das passagens indicadas na Figura. Os valores expressam as médias e os desvios padrão de dois camundongos por grupo. Os experimentos foram feitos duas vezes em períodos diferentes e os resultados foram similares. O test T Student's e revelou que os grupos 1A e 2A, bem como 1B e 2B foram estatisticamente similares ($P > 0.05$).

4.2.1 Características genéticas e antigênicas dos tachizoítos após várias passagens em culturas celulares

Os experimentos de sequenciamento foram feitos para se estimar se após várias passagens em culturas celulares, os parasitas mantinham a mesma homogeneidade genética. Diferentes regiões do gene SAG2 têm sido utilizadas em estudos de genotipagem (Howe et al., 1997; Khan et al., 2007; Ferreira et al., 2008). Assim, duas regiões diferentes do gene SAG2 foram utilizadas para o sequenciamento. As análises foram feitas nos produtos de PCRs amplificados de DNA extraído de tachizoítos coletados nas culturas celulares a cada 5 passagens. Um produto de PCR foi de uma

região de 300-pb do gene SAG2 localizado próximo a porção final 5'. O segundo produto de PCR foi de 240-pb, localizado na porção oposta final 3'. Primeiramente a qualidade do sequenciamento foi verificada comparando-se as sequências obtidas com outras descritas anteriormente no GenBank. Os resultados confirmaram a identidade completa com o gene SAG2 e a proteína SAG2. O próximo passo foi o alinhamento como mostrado na Figura 6, de todas as amostras (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 30^a passagens) que apresentaram a mesma sequência de nucleotídeos. Nenhuma modificação foi observada durante 30 passagens, mostrando identidade genética conservada.

Em seguida as características antigênicas foram avaliadas por ELISA utilizando-se soro imune. Um protocolo adicional para a lise dos taquizoítos foi testado. Os taquizoítos foram lisados com pérolas de vidro em vórtex. O método convencional de lise inclui a sonicação dos parasitas. Como mostrado na tabela 3, a lise utilizando pérolas de vidro em vórtex foi mais rápida e eficiente do que a com sonificador.

Os diferentes lotes de ALT provenientes de taquizoítos coletados de 5 em 5 passagens em cultura de células foram testados por ELISA (coating 2µg/mL de ALT/pérolas de vidro). Os resultados estão apresentados na Figura 7. Soros humanos e de camundongos negativos para a toxoplasmose mostraram-se negativos nos diferentes lotes (1^a ao 30^a passagem em cultura), bem como todos os lotes foram capazes de detectar anticorpos anti- *T. gondii* provenientes de soros positivos humanos e de camundongos.

A

```

      35      45      55      65      75      85      95      105     115     125     135     145     155     165
1st  GAAGAAAACGAGCGCTGCTTGGC-ATTCTGTGTGTTGTTTACGGGTTGCAGTTCTAGGAACTGAGTTGTGATTGTGCACAATTGCGGTGTGACACCTTCTGTCTCGTTCCAATCTTTGTCTTGCAGGAACTATGAGTTT
5th  .....
10th .....
15th .....
20th .....
25th .....
30th .....

      175     185     195     205     215     225     235     245     255     265     275     285     295
1st  CTCAAAGACCACGAGCCTAGCGCTCGCTAGCGCTCACGGGCTTGTTGTTGTGTTCAAGTTCGCTCTTGCGTCCACCACCGAGACGCCAGC GCCCATTGAGTGCACCTGCCGGCGCAACGAAGACTGTTGAT
5th  .....
10th .....
15th .....
20th .....
25th .....
30th .....

```

B

```

      15      25      35      45      55      65      75      85      95      105     115     125
1st  AGCGAGCTAGGCTCGTGGTCTTTGAGAAACTCATAGTTCGACAAAGACAAAGATTGGAACGAGACAGAAGGTGTACACCCGCAATTGTGCACAATCACAACTCAGTTCCTAGAACTGCA
5th  .....
10th .....
15th .....
20th .....
25th .....
30th .....

      135     145     155     165     175     185     195     205     215     225     235
1st  ACCCGTGAAACAACACACAGAATCGCAAGCAGCGCTCGTTTTCTTCGACAGATGGGTCACCTGCAGCAACCTGAAACATTTCTGTTCCCTTTGTGTTTCTGTTTCGAGGTAGC
5th  .....
10th .....
15th .....
20th .....
25th .....
30th .....

```

Figura 6: Cepa RH de *T. gondii*: Sequência de nucleotídeos localizada na região SAG2 próximo à extremidade 5' (A) e na extremidade oposta 3' (B). Análise do alinhamento das sequências dos produtos de PCR amplificados do DNA extraído de taquizoítos coletados a cada 5 passagens nas culturas celulares da (1^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a, 25^a e 30^a).

Tabela 3: Produção de ALT. Comparação entre o método convencional (sonicação) e com pérolas de vidro (vórtex). A metodologia foi ensaiada utilizando 1×10^7 taquizoítos de cultura de células/mL conforme descrita no item Materiais e métodos.

Produção de ALT	Protocolo para lise de taquizoítos	
	Sonicação	Pérolas de vidro
Período/lise	10 ciclos/5 minutos	8 ciclos/4 minutos
Interval de lise (min)	2	2
% lise	80-90	100

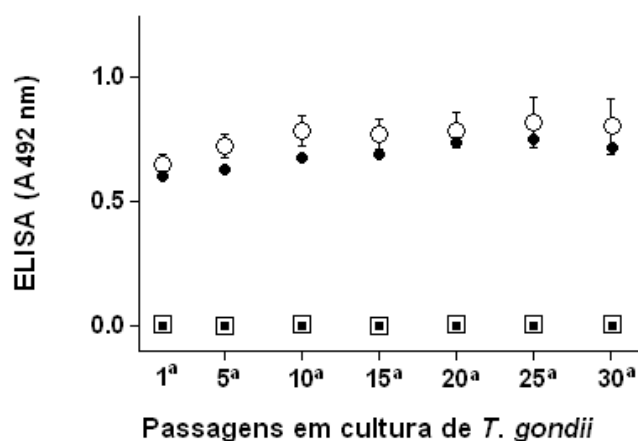


Figura 7. Reatividade imunológica determinada por ELISA utilizando como antígeno ALT (2 $\mu\text{g/mL}$) provenientes de taquizoítos coletados na 1ª, 5ª, 10ª, 15ª, 20ª, 25ª e 30ª passagens em cultura de células VERO. Os resultados representam os valores médios de absorbância de cada amostra de soro na densidade óptica de 492 nm (ELISA) \pm DP obtidas de: 10 soros de pacientes cronicamente infectados (círculos vazios); 10 soros de indivíduos normais sem toxoplasmose (quadrados vazios); 3 “pools” de soros de camundongos positivos infectados com a cepa ME-49 (círculos pretos); e 3 “pools” de soros de camundongos negativos (quadrados pretos).

4.3. Padronização da PCR tempo real (qrt-PCR)

4.3.1. Determinação do limite de detecção

Para determinar o comportamento e o limite de detecção da reação foi realizada uma curva padrão com diluições seriadas de DNA extraído das formas taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* provenientes de cultura de células VERO. Os pontos da curva variaram entre concentrações de 1×10^7 a 10 taquizoítos. Os “Cycle Threshold” (C_T) obtidos foram plotados contra as diferentes concentrações de parasitas. O número de parasitas foi calculado pelo valor do C_T , pela equação de regressão linear, $y=ax+b$, onde: $y = C_T$; a = inclinação da curva (slope); x = número de parasitas; b = onde a curva intercepta o eixo do y (y intercept) (Reimão et al., 2012), obtendo-se assim a curva padrão expressa na Figura 8.

Deste modo foi possível estimar o número de parasitas presentes em cada amostra. Como mostra na Figura 8, a curva apresentou ótima linearidade e reprodutibilidade, sendo o seu $R^2 = 0,9856$ indicando grande correlação entre as variáveis $P < 0,0001$. Foi determinado o limite de detecção da curva correspondendo ao C_T de 37,91.

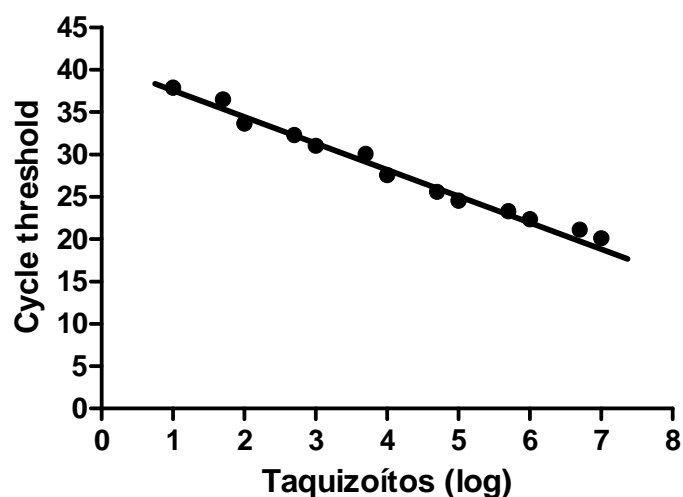


Figura 8: Curva padrão obtida do log das diluições seriadas de DNA de *T. gondii* e seus respectivos valores de C_T .

4.4. Desafio dos grupos imunizados e controles

A partir da curva padrão realizada anteriormente procedeu-se com o desafio dos animais, a fim de determinar a efetividade da resposta imune produzida após a imunização. Foi observado que os grupos imunizados e controle positivo e negativo desafiados com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH uma discreta proteção conferida pela imunização, retardando a morte dos camundongos imunizados por 2 dias em relação o grupo controle negativo. O grupo controle positivo mostrou que a infecção prévia protegeu o organismo do desafio posterior, não sendo observada morte destes animais que foram acompanhados por 3 meses (Figura 9). Os resultados de parasitemia por qrtPCR confirmam os de mortalidade. Podemos notar na Figura 10 que no desafio (reinfecção) do grupo controle positivo, houve ausência de parasitemia quantificável e que no grupo imunizado a parasitemia foi menor que no grupo controle negativo.

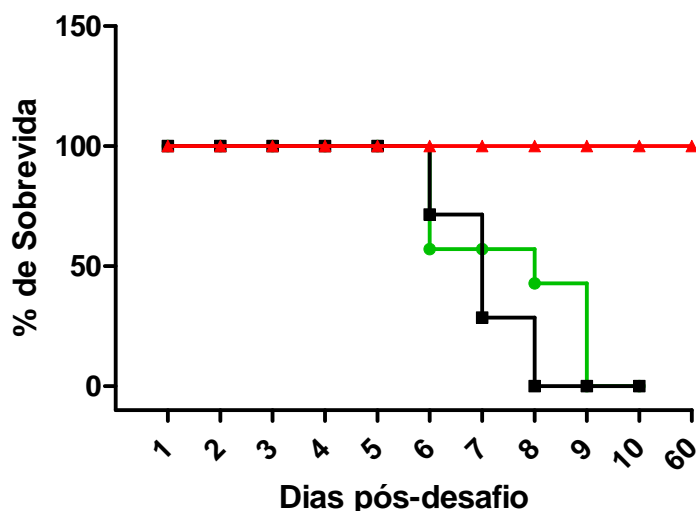


Figura 9: Índice de sobrevivência após desafio com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH dos grupos camundongos imunizados (verde), controle positivo (vermelho) e negativo (preto). Resultados expressos em porcentagem acumulativa.

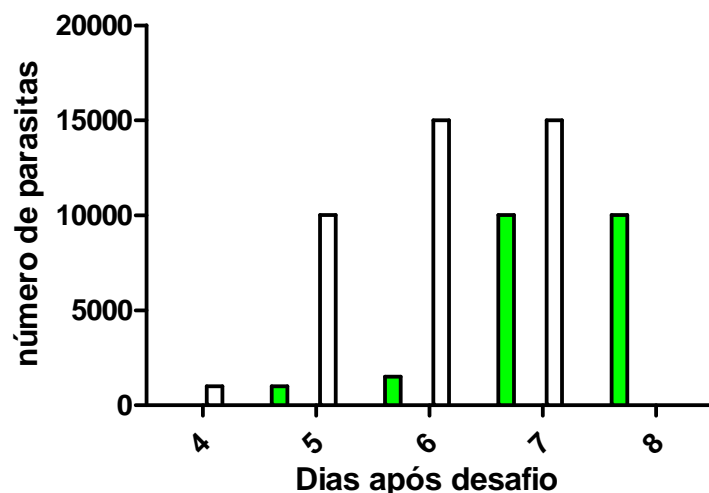


Figura 10: qrtPCR de amostras de sangue coletados via caudal do 4º ao 7º pós-desafio com 1×10^3 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* dos grupos de camundongos imunizado (verde), controle negativo (branco).

4.5. Experimentos de Resposta Celular: detecção de citocinas

4.5.1 Testes de proliferação linfocitária, padronizações

Após os experimentos de desafio deu-se continuidade com os experimentos de resposta celular. Os linfócitos provenientes de baços dos três grupos de animais: imunizados e controles (positivos e negativos) foram estimulados com ESA e ALT nas concentrações de 0,5; 1; 5; 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Para IFN- γ e TNF- α a concentração ótima de ambos os antígenos para estímulo foi de 5 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Para IL-4 e IL-10 a concentração foi de 25 $\mu\text{g}/\text{poço}$. Estas concentrações foram as utilizadas em todos os experimentos.

Os mitógenos utilizados (ConA ou LPS) foram satisfatórios quanto a proliferação linfocitária em todos os grupos estudados, funcionando como controle positivo para a detecção de citocinas. Sendo assim, para cada experimento os linfócitos provenientes de baço de camundongos imunizados e controles (positivo e negativo) foram estimulados separadamente com ConA ou LPS para avaliação da viabilidade celular. Em relação à produção de IFN- γ , as células de camundongos imunizados quando

estimuladas com ConA tiveram uma produção média de 2249,2 pg/mL, as de animais controle positivo e negativo 3313 pg/mL e 3574,8 pg/mL respectivamente. Quanto à produção de IL-4, os linfócitos do grupo de camundongos imunizados quando estimulados com ConA produziram uma média de 18,3 pg/mL; de camundongos positivos foi 23,7 pg/mL. Células provenientes de camundongos controle negativos sintetizaram 4,2 pg/mL. ConA também foi efetivo na produção de IL-10, produzindo 7609,3 pg/mL em células de camundongos imunizados; 5416 pg/mL em células de camundongos controle positivo e 8919,3 pg/mL em células de camundongos controle negativo. Em relação à produção de TNF- α , os linfócitos provenientes de camundongos imunizados quando estimulados com LPS induziram a produção de 858,6 pg/mL. Linfócitos de camundongos controle positivo e negativo produziram 1107,4 pg/mL e 657,2 pg/mL de TNF- α respectivamente (Figura 11).

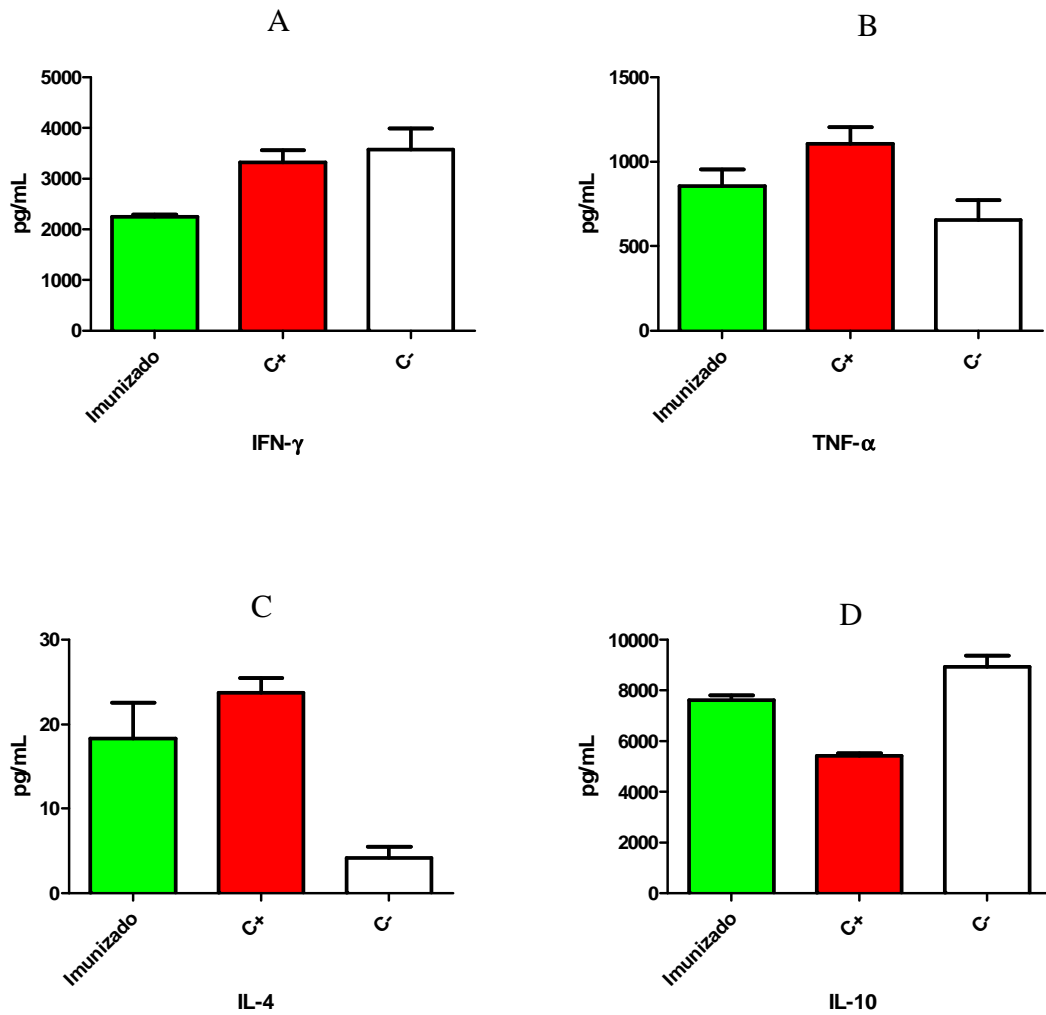


Figura 11. Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com proliferador mitótico ConA para IFN- γ , IL-4 e IL-10 ou LPS para TNF- α . As citocinas foram dosadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura de linfócitos.

4.5.1.2. IFN- γ

Linfócitos provenientes de animais do grupo imunizado com ESA e do controle negativo e estimulados *in vitro* com ESA não produziram IFN- γ (Figura 12A), porém quando estas mesmas células foram estimuladas *in vitro* com ALT, foi observada a síntese desta citocina com uma produção média de 1547,8 pg/mL (Figura 13A), a qual foi maior do que as células provenientes do grupo controle positivo (1398,4 pg/mL).

As células do grupo de animais controle positivo estimuladas *in vitro* com ESA produziram IFN- γ com um total de 3632 pg/mL (Figura 12A). Estes níveis foram maiores e estatisticamente significantes (***) $p < 0,0005$) do que quando estimuladas com ALT como citado no parágrafo anterior. Os valores obtidos pelas diferenças de produção de IFN- γ das células do grupo controle positivo estimuladas com ALT quando comparado aos outros grupos estudados (imunizado e controle negativo) estimulados com ALT foram estatisticamente significantes (***) $p < 0,0005$). O grupo controle negativo apresentou uma produção de 1134,2 pg/mL para ESA e 1116 pg/mL para ALT.

4.5.1.3. TNF- α

ESA foi capaz de induzir a síntese de TNF- α *in vitro* nos linfócitos dos grupos de animais imunizados (350 pg/mL) e animais controle positivos (397 pg/mL) similarmente (Figura 12B). O mesmo resultado foi encontrado para o estímulo ALT, porém em níveis maiores (511,3 pg/mL e 535 pg/mL respectivamente) (Figura 13B). Ambos os antígenos foram capazes de induzir níveis de TNF- α estatisticamente significantes (***) $p < 0,0005$) quando comparados aos sobrenadantes provenientes de linfócitos do grupo controle negativo que produziu 160,11 pg/mL para ESA e 178,378 pg/mL para ALT (Figura 12B e 13B).

4.5.1.4. IL-4

O estímulo *in vitro* ESA foi mais eficiente do que ALT em produzir IL-4 nos linfócitos provenientes dos camundongos imunizados e do controle positivo (9 pg/mL e 9,3 pg/mL respectivamente) (Figura 12C). ALT não foi eficiente em produzir esta citocina nas células dos animais imunizados, produzindo níveis muito baixos (2,3 pg/mL). (Figura 13C). Os linfócitos dos animais controles e estimulados *in vitro* com ambos antígenos (ESA ou ALT) não produziram IL-4 (Figura 12C e 13C).

4.5.1.5. IL-10

Altos níveis de IL-10 foram observados nos sobrenadantes de linfócitos dos animais imunizados e controle positivo (Figura 12D e 13D) estimulados com ESA (8608 pg/mL e 9480 pg/mL respectivamente) e ALT (8096,9 pg/mL e 10009 pg/mL respectivamente), apresentando diferenças estatisticamente significantes quando comparados as células provenientes do grupo controle negativo (**p < 0,0005), que apresentou uma síntese de 3492,5 pg/mL para ESA e 3198,4 pg/mL para ALT.

Ambos os antígenos induziram maiores níveis desta citocina nas células do grupo controle positivo.

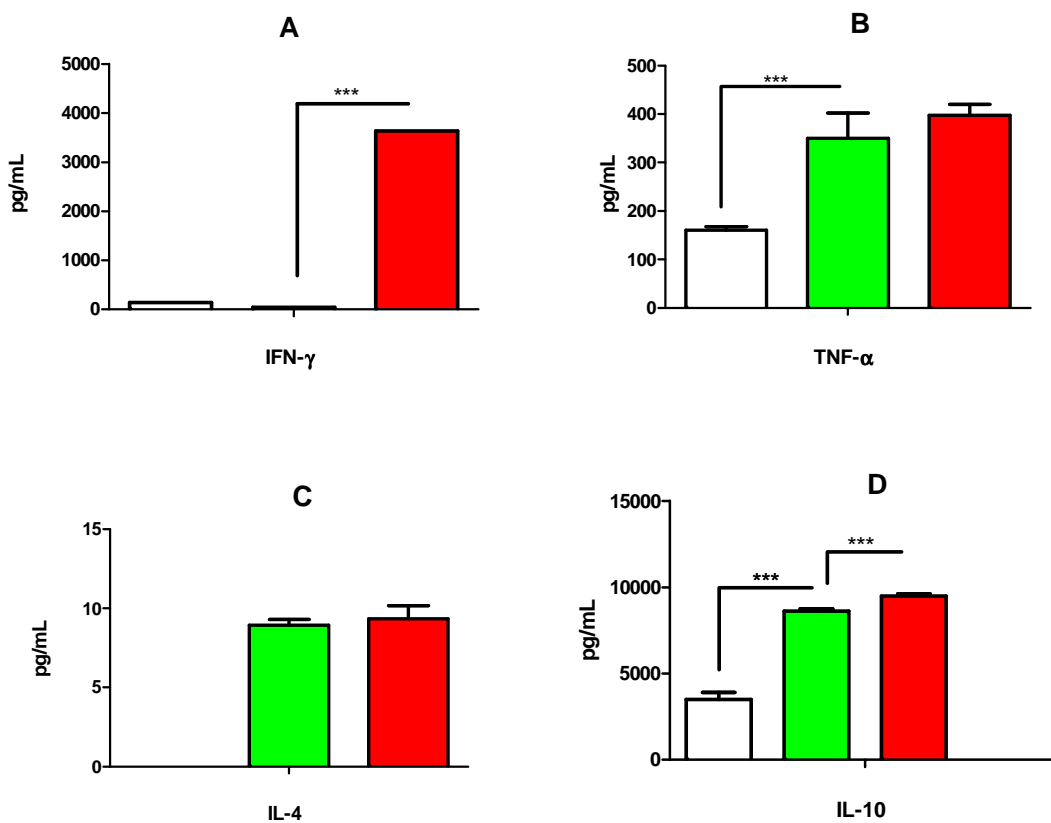


Figura 12. Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com ESA. Todo experimento como controle utilizou um poço com proliferador mitótico ConA para IFN- γ , IL-4 e IL-10 ou LPS para TNF- α , bem como um poço sem estímulo. As citocinas foram dosadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura de linfócitos. Comparação das reatividades entre os grupos por teste T (95% de intervalo de confiança * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

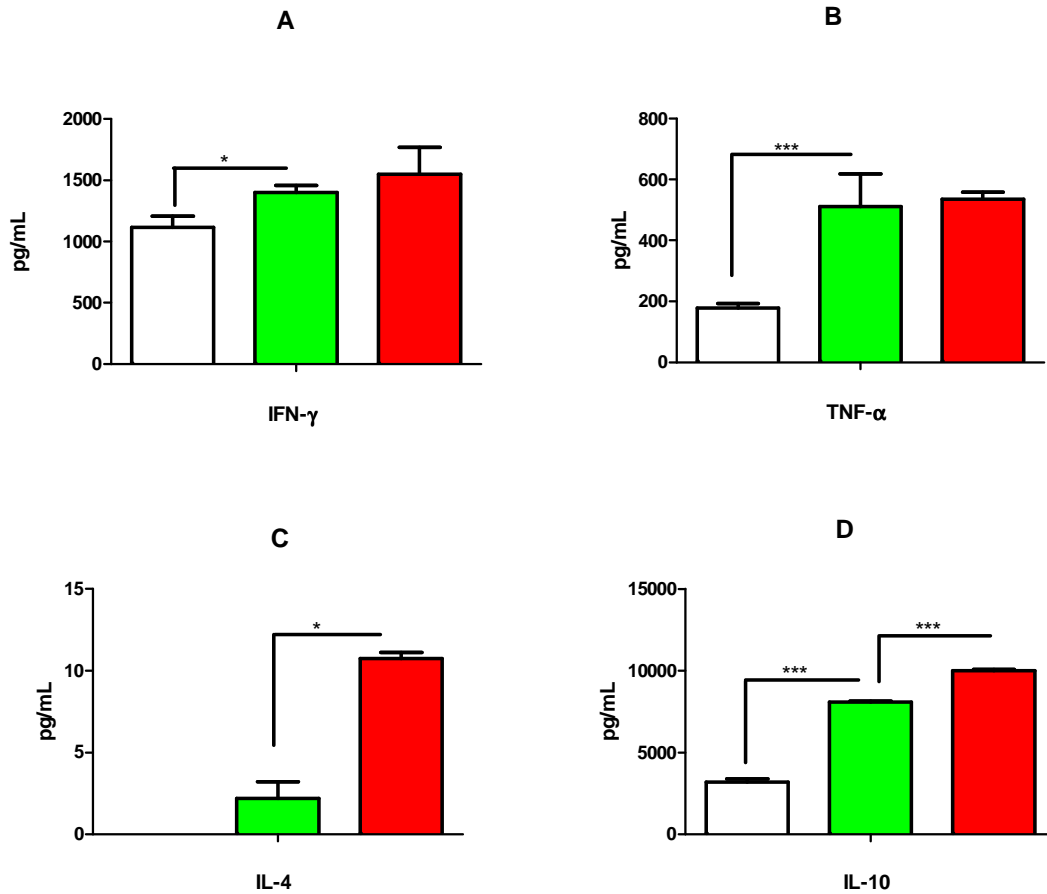


Figura 13. Produção de IFN- γ (A); TNF- α (B); IL-4 (C) e IL-10 (D) em linfócitos provenientes de baço de camundongos A/Sn imunizados com ESA associado à ALUM (verde) e controles: positivo (vermelho) e negativo (branco) estimulados *in vitro* com ALT. Todo experimento como controle utilizou um poço com proliferador mitótico ConA para IFN- γ , IL-4 e IL-10 ou LPS para TNF- α , bem como um poço sem estímulo. As citocinas foram dosadas por ELISA nos sobrenadantes de cultura de linfócitos. Comparação das reatividades entre os grupos por teste T (95% de intervalo de confiança * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$).

4.4. Concentrações de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a

4.4.1. Padronizações

Após a verificação da resposta celular, o próximo passo foi estudar a resposta imune humoral. Os experimentos iniciais foram para padronizar as concentrações de soro e de IgM, IgG1 e IgG2a de camundongo conjugada a peroxidase na reação de ELISA. Foram utilizados para as padronizações os antígenos ESA e ALT. As reações foram feitas conforme descrito no item 3.8. de Materiais e métodos. Como mostra as Figuras 14A, B e C os títulos dos soros para os conjugados IgM, IgG1 e IgG2a, quando se usa ESA como antígeno foi de 1:32 (Figura 14A), 1:128 (Figura 14B) e 1:512 (Figura 14C) respectivamente. Com o antígeno ALT, os títulos dos soros para os conjugados IgM, IgG1, e IgG2a foram 1:64 (Figura 15A); 1:512 (Figura 15B) e 1:512 (Figura 15C), respectivamente.

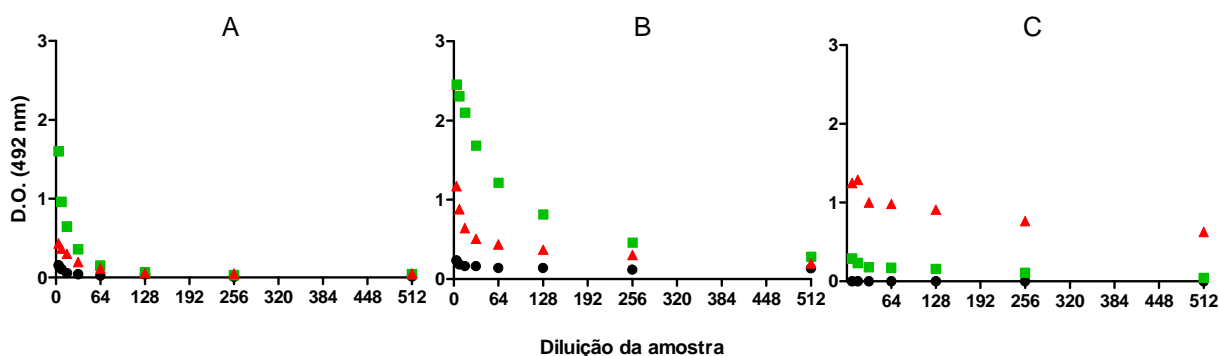


Figura 14: Determinação do título do soro para IgM (A), IgG1(B) e IgG2a(C) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA + ALUM) (verde), controle positivo (vermelho) e controle negativo (preto). Em placas sensibilizadas com o antígeno ESA. Títulos dos soros: 1:32 para IgM, 1:128 para IgG1 e 1:512 para IgG2a. Os experimentos foram realizados com 5 soros em “pool” provenientes de 5 camundongos por grupo em duplicata.

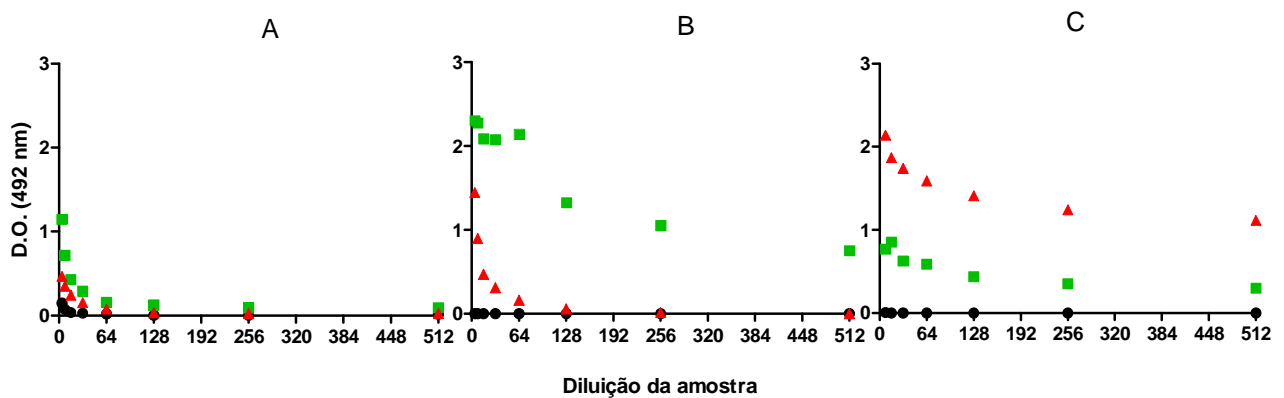


Figura 15: Determinação do título do soro para IgM (A), IgG1(B) e IgG2a(C) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA +ALUM) (verde), controle positivo (vermelho) e controle negativo (preto). Em placas sensibilizadas com o antígeno ALT. Título dos soros para IgM (A), IgG1 (B) e IgG2a (C). Títulos dos soros: 1:32 para IgM, 1:512 para IgG1 e IgG2a Os experimentos foram realizados com soros em “pool” provenientes de 5 camundongos por grupo em duplicata.

4.5. Produção de anticorpos

A imunização com ESA em camundongos A/Sn induziu alta produção de anticorpos IgM e IgG1, quando comparado ao grupo de camundongos positivos. Estes achados foram verificados por ELISA utilizando-se como antígenos: ESA (Figura 16A) e ALT (Figura 16B). Quanto à produção de IgG2a os resultados foram inversos. O grupo de camundongos positivos produziram altos títulos desta subclasse de imunoglobulina (Figura 16A e B), em ESA e ALT. A imunização com ESA, por sua vez, induziu fracamente a produção destes anticorpos. As reatividades contra ESA (16A) e ALT (16B) foram estatisticamente significantes (teste T- 95% de intervalo de confiança * $p < 0.05$ e ** $p < 0,005$).

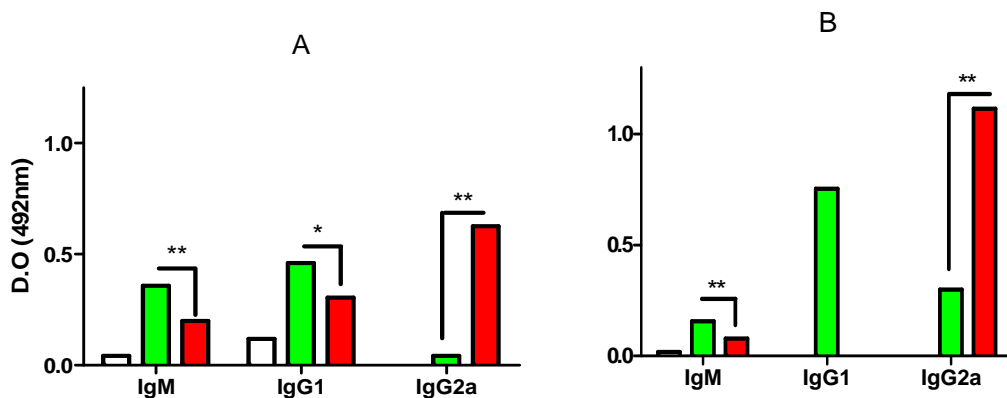


Figura 16: Comparação da produção das imunoglobulinas (IgM, 1:1000; IgG1, 1:2000 e IgG2a, 1:8000) em soros de camundongos A/Sn imunizados (ESA + ALUM) verde, controle positivo (vermelho) e controle negativo (branco) contra ESA (A) e ALT (B). Título dos soros: IgM, 1:64; IgG1 e IgG2a, 1:512. Os experimentos foram realizados com soros em “pool” provenientes de 5 camundongos por grupo: controle, imunizado e infectado em duplicata.

4.5.1. Experimentos de opsonização e análise de parasitemia pela qrt-PCR

Para avaliar o efeito dos anticorpos anti-ESA na parasitemia e na mortalidade, 1×10^3 taquizoítos (cepa RH) foram incubados com IgG purificada de soros provenientes de camundongos imunizados, crônicos e livres de infecção. Estes parasitas opsonizados foram utilizados para infectar 3 grupos de camundongos A/Sn e a parasitemia e a mortalidade foram monitoradas diariamente. Para avaliar a parasitemia amostras de sangue foram coletadas para avaliação pela qrtPCR do 4º ao 7º dia. No 7º dia apenas foi coletado sangue dos camundongos imunizados, visto a mortalidade antecipada dos grupos controles. Camundongos desafiados com taquizoítos opsonizados com IgG anti-ESA ou IgG anti- *T. gondii* tiveram menor parasitemia (Figura 17) do que quando comparados com IgG de camundongos livres de infecção. Além disso, a opsonização de parasitas com IgG anti-ESA foi mais efetiva, pois a mortalidade foi atrasada em 48 horas quando comparada com os animais que foram desafiados com taquizoítos incubados com IgG anti- *T. gondii* (crônicos) ou normal (Figura 18).

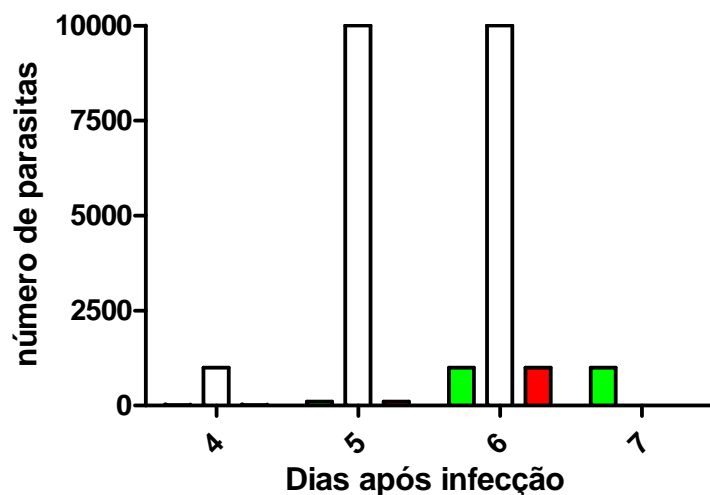


Figura 17: qrtPCR de amostras de sangue coletados via caudal do 4º ao 7º pós-transferência de parasitas opsonizados, 1000 taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* incubados com IgG coletadas de camundongos imunizados (verde), controle negativo (branco) e controle positivo (vermelho). No 7º dia apenas foi coletado sangue dos camundongos imunizados, visto a mortalidade antecipada dos grupos controles.

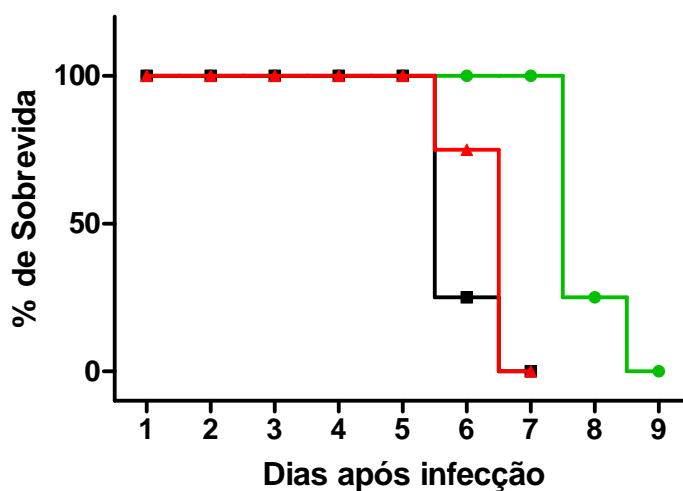


Figura 18: Índice de sobrevida pós-transferência de parasitas opsonizados (0,5µg de IgG/animal em grupos de 5 camundongos com anticorpos provenientes de grupo imunizado (verde), grupo controle negativo (preto) e grupo controle positivo (vermelho). Resultados expressos em porcentagem acumulativa.

5. DISCUSSÃO

Na toxoplasmose estudos de imunização e pesquisa de novos antígenos são muito importantes para o melhor entendimento da doença e aperfeiçoamento das ferramentas de diagnóstico disponíveis. A manutenção de cepas e a produção de antígenos de *T. gondii* são de primordial importância na pesquisa científica de resposta imune na toxoplasmose. Centros de referência no mundo inteiro usam as formas taquizoítos, derivados de cultura de células, como fonte antígeno para testes sorológicos (Hughes et al., 1986; Chatterton et al., 2002; Ashburn et al., 2003; Buddhirongawatr et al., 2006). A principal vantagem de se utilizar este sistema reside nos aspectos éticos, uma vez que não são utilizados animais experimentais para a produção antigênica, além do custo e rapidez (Evans et al., 1999; Ashburn et al., 2000). No entanto, outros centros de referência ainda utilizam antígenos provenientes de taquizoítos da cepa RH mantida somente por inóculos em camundongos (Ware e Kasper 1986; Colombo et al., 2005; Lee et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008; Macre et al., 2009; Ferreira da Silva et al., 2009; Lynch et al., 2009).

A primeira parte deste trabalho foi dedicada ao aperfeiçoamento da produção de taquizoítos em culturas de células VERO sem adição de SFB, visto que os dois antígenos (ESA e ALT) utilizados durante o estudo de resposta imune celular e humoral foram feitos a partir de taquizoítos da cepa RH de *T. gondii*. Em estudos anteriores de nosso grupo foi constatado contaminação do antígeno ESA com o SFB, mesmo após lavagens sucessivas das garrafas de culturas de células com meio sem SFB antes da infecção celular com os parasitas (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008). Dentro desta proposta avaliamos se taquizoítos mantidos em culturas de células VERO que crescem sem adição de SFB, são capazes de manter as suas propriedades antigênicas, mesmo após várias passagens, em relação à antígenos mantidos em animais experimentais. Os resultados não mostraram diferenças entre os taquizoítos provenientes de culturas de células em relação com os de camundongos. A otimização da produção de *T. gondii* em células VERO que não necessitam da adição de SFB alcançou bons resultados e demonstrou que este antígeno é capaz de detectar anticorpos IgG anti - *T. gondii*, mantendo sua imunogenicidade e antigenicidade após 30 passagens em culturas.

Já foi relatado anteriormente que a manutenção de antígeno em contínua passagem em cultura de células produz taquizoítos viáveis com coletas regulares, sendo uma alternativa relevante (Evans et al., 1999). Em adição, linhagens celulares são fáceis de serem mantidas, confiáveis e de baixo custo. *Toxoplasma gondii* têm sido cultivado em diferentes linhagens de células com grandes variações na qualidade e quantidade de antígeno produzido. Os principais tipos celulares utilizados são Hep-2 (Hughes et al., 1986), VERO (Costa-Silva et al., 2008, Meira et al., 2008; Saadatnia et al., 2010) e HeLa (Hughes et al., 1986; Ashburn et al., 2000; Chatterton et al., 2002; Değirmenci et al., 2011). A otimização da produção em massa requer equilibrar fatores como taxa de multiplicação da linhagem celular e dos parasitas, bem como, as condições da cultura nas diferentes gerações (Hughes et al., 1986).

A melhor coleta de taquizoítos nas culturas celulares foi 2.1×10^7 após 7 dias de infecção, utilizando um inóculo inicial de 1.5×10^6 parasitas. Foi conseguida uma boa produção de antígeno com infecção de 3 parasitos/célula (1.10^7), diferente de Degirmenci et al., 2011 que utilizaram infecções de até 8 parasitas/ célula e obtiveram produção na ordem de 10^6 taquizoítos. Estes resultados mostraram que a infecção das células VERO sem SFB foi bem sucedida na propagação do parasita *in vitro* mesmo após várias passagens, sem nenhuma perda da infectividade ou decréscimo na taxa de multiplicação.

No que diz respeito à viabilidade dos taquizoítos nas culturas celulares nossos dados estão de acordo com Ashburn et al. 2000, os quais mostraram que taquizoítos produzidos em células HeLa por várias passagens mantiveram viabilidade aceitável sem diferenças significantes entre coletas iniciais e mais tardias, o que confirma a utilidade deste tipo de produção antigênica.

Uma das maiores questões em relação às contínuas passagens de parasitas em culturas celulares, é que estas poderiam levar a perda imunogênica e/ou antigênica progressiva. O estudo das sequências de nucleotídeos provenientes de amostras das diferentes passagens não mostraram alterações, confirmando mais uma vez a viabilidade do antígeno. Embora estes resultados sejam promissores quanto à substituição do uso de animais por culturas celulares na produção de antígenos, algumas desvantagens podem ser notadas. Protocolos para prevenir a contaminação são necessários, e técnicas assépticas em cabines de classe II são as mais recomendadas. Estoques de culturas de

células devem ser mantidos separadamente das células infectadas, além da necessidade de um sistema de estoque em nitrogênio líquido para recomeçar o processo caso ocorra contaminações ou alguma outra falha no sistema de produção de taquizoítos em cultura (Harmer et al., 1996).

Em suma a produção dos antígenos ALT e ESA no presente trabalho corrobora com outros estudos. Hughes et al., 1986; Ashburn et al., 2000 mostraram que a produção antigênica em cultura de células possui claras vantagens éticas e benefícios financeiros. Adicionalmente o uso de meio de cultura formulado sem qualquer componente derivado de humanos ou animais foi bem sucedido na produção de taquizoítos, minimizando interferências nos ensaios.

Padronizados os antígenos, partiu-se para o principal objetivo deste estudo: investigar a participação da ESA no desenvolvimento da resposta imune e controle da infecção por *T. gondii* a partir dos antígenos produzidos com os taquizoítos adaptados ao tipo de cultura celular citado anteriormente. Diante do fato que os sintomas clínicos na toxoplasmose são diversos, não há um modelo animal que apresente todos os sintomas clínicos que podem ser observados nos humanos. Em adição, o tipo de cepa utilizada, a dose do inóculo, o estágio do parasita e a rota de inoculação em conjunto com o “background” genético do camundongo têm um grande impacto no curso clínico da infecção. A seleção do modelo apropriado para a infecção é uma das coisas mais importantes para se obter conclusões apropriadas dos resultados obtidos (Munoz et al., 2011). Dentro deste contexto, o modelo C57BL/6 é amplamente utilizado em estudos de toxoplasmose, mostrando-se susceptível à infecção (Hiramoto et al., 2002; Martin et al., 2004; El-Malky et al., 2005; Lee et al., 2007) e o modelo A/Sn é conhecido como susceptível para infecções com *Trypanosoma cruzi* (Franchin et al., 1997; Pereira-Chiocola et al., 1999; Vasconcelos et al., 2003; Araújo et al., 2005).

Em camundongos C57BL/6 infectados pela via oral com 100 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, observa-se letalidade de 100% dos animais, enquanto que camundongos BALB/c sobrevivem a este mesmo inóculo (Liesenfeld et al., 1996). A alteração patológica causada pela infecção compartilha alterações morfológicas e histológicas como as doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês “Inflammatory Bowel Disease”) em humanos. Essa resposta inflamatória exacerbada resulta em uma mortalidade precoce dos hospedeiros susceptíveis (Liesenfeld, 2002). Sendo assim, em

estudo anterior de nosso grupo, Costa-Silva et al., 2008, antes da escolha do modelo murino para as imunizações efetuaram uma seleção de um modelo murino ideal comparando as linhagens C57BL/6 e A/Sn. Neste estudo foi constatado que a cinética de parasitemia e a mortalidade nestas duas linhagens de camundongos foram similares, quando submetidas ao mesmo inóculo (1×10^3). Desta forma foi escolhida a linhagem A/Sn já que não haviam trabalhos anteriores na toxoplasmose com esta linhagem, além da facilidade de manipulação.

Com estes parâmetros iniciais avaliados, manteve-se a linhagem A/Sn e o perfil de resposta celular e humoral de camundongos imunizados com ESA associada à ALUM foi comparado ao de camundongos infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* (controle positivo) e com camundongos que apenas receberam ALUM com PBS (controles negativos). Foi considerado como grupo de camundongos positivos os infectados pela via oral com a cepa ME-49, visto que esta rota de infecção é a mais próxima do que ocorre na natureza, com a integridade do parasita preservada, o que é necessário para que a capacidade de penetração nas células intestinais ocorra com sucesso para a produção de uma resposta imune protetora adequada induzindo a cronicidade (Hiramoto et al., 2002). Os experimentos de desafio dos grupos de camundongos A/Sn imunizados com ESA, controles (positivos e negativos) observou-se os níveis de parasitemia, determinados por qrtPCR, e o índice de sobrevivência. Foi constatado que a imunização com ESA contribuiu para o controle da infecção reduzindo a parasitemia e atrasando a mortalidade em relação ao grupo controle. O grupo infectado crônico com a cepa ME-49 (controle positivo), quando re-infectado com a cepa RH (desafio) não apresentou parasitemia e nem mortalidade, durante o período estudado. Estes dados sugerem que a resposta imune protetora gerada pela infecção foi eficiente em controlar uma infecção causada por outra cepa de *T. gondii* e que a ESA participa deste processo incluindo a resposta celular e humoral, por ser liberada durante o processo de penetração celular (Carruthers e Sibley, 1997; Dubremetz, 1998; Carruthers e Tomley, 2008), atrasando a mortalidade e reduzindo a parasitemia no grupo imunizado.

A imunidade desencadeada pela infecção por *T. gondii* é estritamente relacionada à produção de IFN- γ pelos linfócitos T CD8+, células NK e células T CD4+ (Werk, 1985; Hunter et al., 1995). Embora o recrutamento dos linfócitos T CD8+

não serem completamente compreendidos, uma possibilidade é o reconhecimento pelo MHC de classe I de células não hematopoiéticas infectadas, que levam a inibição do crescimento do parasita, pela secreção de IFN- γ (Suzuki et al., 1990; Denkers et al., 1997). A habilidade de sobreviver à infecção é dependente da produção de IFN- γ (Suzuki et al., 1988, 1989, 1990; Scharton-Kersten et al., 1996). Interessante notar que as células dos camundongos imunizados com ESA não respondem ao antígeno homólogo quando reestimuladas *in vitro* para a produção de IFN- γ , porém os linfócitos provenientes destes mesmos camundongos imunizados respondem para outras proteínas presentes no antígeno ATL induzindo elevados níveis desta citocina.

Tanto ESA quanto ALT foram capazes de induzir produção de TNF- α nos linfócitos dos grupos de animais imunizados e controle positivo em níveis similares e com resultados estatisticamente significantes quando comparados às células provenientes de camundongos do grupo controle negativo. Também foi observado que os níveis de IFN- γ e TNF- α foram produzidos em concentrações similares por linfócitos de camundongos imunizados e de camundongos controles positivos quando estimulados *in vitro* com ALT. Estes dados sugerem que durante a infecção ativa, quando os taquizoítos estão circulantes e conseqüentemente a ESA é liberada, o sistema imune do hospedeiro é estimulado a produzir IFN- γ e TNF- α . Estas duas citocinas são envolvidas no controle da infecção. IFN- γ induz a síntese TNF- α em células infectadas com a intenção de controlar a infecção por *T. gondii* (Suzuki et al, 2000). Entretanto IFN- γ é necessário tanto na resistência da fase aguda quanto da fase crônica (Suzuki et al., 1989; Gazzinelli et al., 1993; Denkers e Gazzinelli, 1998) e o recrutamento de TNF- α manifesta-se primariamente na fase crônica, quando o parasita reside no SNC (sistema nervoso central) (Gazzinelli et al., 1993; Scharton-Kersten, 1996; Deckert-Schluter,1998). Como as duas citocinas agem sinergicamente durante a infecção, é possível que clones específicos de linfócitos T estimulados pela ESA e anticorpos anti-ESA possam ajudar no controle da infecção. TNF- α tem um papel importante na geração de reativos intermediários de oxigênio como mediadores para a resistência do hospedeiro na infecção inicial por *T. gondii* (Denkers e Gazzinelli 1998; Vercammen et al., 2000; Leng et al., 2009; Dziadek et al, 2009; Rosenberg et al, 2009). Logo uma boa imunização na resposta protetora da toxoplasmose deve induzir a produção de citocinas que tenda a um balanço Th1/Th2.

Como apresentado, linfócitos de camundongos imunizados e de camundongos controle negativos que só receberam ALUM não produzem IFN- γ em resposta ao reestímulo com ESA, porém produzem IL-4. Os linfócitos provenientes de baço de camundongos controle positivos, produziram IL-4 com ambos estímulos ALT ou ESA. Já as células de camundongos imunizados apenas sintetizaram IL-4 quando o reestímulo foi ESA. Em relação à IL-10 tanto os linfócitos de animais imunizados com ESA quanto os de controle positivos responderam igualmente ao antígeno ESA e ao ALT sintetizando altos níveis desta citocina. Apesar das células de camundongos negativos produzirem valores altos desta citocina, esta produção foi menos da metade produzida pelos linfócitos de camundongos imunizados e controle positivo. IL-4 e IL-10 são citocinas que modulam a síntese de IL-12, IFN- γ e TNF- α permitindo que não haja uma resposta imune excessiva que possa causar inflamação e dano tecidual (IL-10) (Gazzinelli et al. 1996; Anderson et al., 2007; Jankovic et al, 2007; Sun et al., 2009). Simultaneamente IL-4, é produzida pelas células Th2 e também suprime a secreção de IFN- γ pelas células Th1 (Swain et al., 1990; Brinkmann et al, 1993).

De acordo com Wilson et al. (2005), IL-10 têm um papel importante no balanço entre imunidade protetora e desenvolvimento de patologia na toxoplasmose. Estes autores e Gazzinelli et al., 1996 (B), demonstraram que camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem uma resposta aguda inflamatória letal, visto que esta citocina controla os níveis de IL-12, IFN- γ e TNF- α , sendo assim a morte dos animais associadas à falta de IL-10, é relacionada com baixa parasitemia e altos níveis de IL-12, IFN- γ e TNF- α (Jankovic et al., 2007). Logo, a resposta encontrada aqui tende ao equilíbrio, visto que produz citocinas da resposta Th1, Th2 e Th3, já que IL-10 é citocina pertencente tanto a resposta Th2 quanto Th3 (Defrance et al., 1992). Trinchieri, 2007, também ressalta que em células animais, células efectoras Th1 produzem IL-10 como meio de prevenção de danos colaterais, como um mecanismo de autocontrole, porém esse mecanismo também pode ser utilizado como escape por agentes patogênicos.

Em relação à produção de IL-12_{P70} e NO (dados não mostrados) não foram detectados nas células estimuladas, provavelmente por serem os linfócitos as células alvo do estudo, os quais produzem estes mediadores em níveis baixos, ao contrário das células dendríticas que são a maior fonte de IL-12 em resposta a infecção por *T. gondii* e são vitais para a resistência contra a infecção *in vitro* (Liu et al., 2006 B).

Quanto à resposta imune humoral, a imunização dos camundongos A/Sn induziu alta produção de anticorpos IgM e IgG1 em relação aos camundongos controle positivos, utilizando tanto ALT quanto ESA como antígenos. Já na produção de IgG2a os resultados foram inversos. O grupo de camundongos controle positivos produziram altos títulos desta subclasse de imunoglobulina, diferente dos animais imunizados. Sendo assim, pela produção de imunoglobulinas, o perfil da imunização foi direcionado à uma resposta Th2 e o da infecção predomínio da resposta Th1, o que já é amplamente divulgado na literatura (Gazzinelli et al, 1992; Pereira-Chiocola et al., 2009; Costa-Silva e Pereira-Chiocola, 2010; Tan et al., 2010). Quando observamos a produção de IgM sérica nos grupos estudados, observamos que o grupo imunizado (via intraperitoneal – 45 dias de imunização) sintetizou níveis mais altos dessa imunoglobulina em relação ao grupo controle positivo (via oral – 50 dias de infecção). Dados da literatura comprovam que a exposição dos antígenos no trato gastrointestinal é capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica, porém com menor intensidade do que quando a exposição é feita por via parenteral (Ogra e Metecky, 1994).

Antígenos diferentes, rotas de inoculação e alteração de modelos experimentais podem induzir respostas imunes diferentes. No estudo de imunização em ovelhas de Hiszczyńska-Sawicka et al., 2011, utilizando a rota intramuscular para as imunizações com o antígeno de DNA ROP1 associado à CD154, obtiveram elevados títulos de IgG1 e IgG2, com produção de IFN- γ mostrando uma resposta com balanço Th1/Th2. Já Dziadek et al, 2009 elucidou que as vacinas de DNA induzem resposta tipo Th1 e que vacinação com antígenos recombinantes leva a uma resposta mista Th1/Th2 com altos títulos de anticorpos antígenos-específicos IgG2a e IgG1, com síntese predominante do isotipo IgG1. Neste estudo os quais utilizaram a vacina recombinante aplicada pela via subcutânea de ROP2 e ROP4 com camundongos C3H foram obtidos altos títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a, com produção predominante de IgG1, característica de resposta tipo Th2. Já no estudo Levya et al 2001, a imunização com vacina de DNA ROP2 em camundongos CBA/J geraram resposta heterogênea de IgG com altos níveis de IgG2a e baixos de IgG1, tendendo à Th1.

Finalizando, os experimentos de opsonização sugerem que os anticorpos anti-ESA participam do início da resposta imune através da ativação do sistema complemento, a fim de facilitar a fagocitose, e conseqüentemente a diminuição da parasitemia

observada pela qrtPCR e no atraso da mortalidade em relação aos grupos controles, sendo os anticorpos anti-ESA mais efetores que os anti-*T. gondii*.

Em conclusão, todos estes dados sugerem que ESA age induzindo um perfil misto Th1/Th2. A imunização induziu produção de IgM, imunoglobulina presente nos dois perfis de resposta celular (Th1 e Th2), porém falhou na produção de IFN- γ quando o estímulo foi ESA. Contudo os linfócitos dos camundongos imunizados sintetizaram esta citocina quando o reestímulo foi ALT. Em contrapartida, ESA estimulou a produção em níveis significativos de TNF- α , IL-4, IL-10 e IgG1. Como esperado, animais do grupo controle positivo (crônicos) desenvolveram o perfil Th1/Th2, com dominância de Th1 e produção predominante de IgG2a e IFN- γ .

6. CONCLUSÕES

1. Antígenos obtidos de taquizoítos cultivados em células VERO sem adição de soro fetal bovino (SFB) são tão eficientes quanto os antígenos provenientes de camundongos e de culturas celulares com SFB.
2. Imunização com ESA reduziu a parasitemia e retarda a mortalidade de animais infectados com cepas virulentas letais de *T. gondii*.
3. Antígenos excretados/secretados (ESA) obtidos em culturas de células VERO sem SFB são importantes na identificação de infecção ativa de *T. gondii* e são responsáveis, em modelo experimental murinho, pela alta produção de IgG1 e das citocinas IFN- γ , TNF- α e baixa produção de IgM, IgG2a, IL-10 e IL-4
4. ESA induz resposta imune mista com perfil Th1 e Th2.
5. Um dos mecanismos de diminuição da parasitemia na Toxoplasmose é a produção de anticorpos opsonizantes anti-ESA.

7. BIBLIOGRAFIA

Alexander DL, Mital J, Ward GE, Bradley P, Boothroyd JC. Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. PLoS Pathog 2005; 1:e17.

Aliberti D, Jankovic J, Sher A, “Turning it on and off: regulation of dendritic cell function in *Toxoplasma gondii* infection,” Immunological Reviews. 2004; 201(1): 26–34.

Altcheh J, Diaz NS, Pepe CM, Martin V, Nigro M, freilij H, Angel SO. Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*- recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis, Diag Microb Infect Dis. 2006; 56 (2):161-5

Ashburn D, Evans R, Chatterton, JM, Joss AW, Ho-Yen DO. *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites. J Clin Pathol. 2003; 53: 630–33.

Araújo AF, Alencar BC, Vasconcelos JR, Hiyane MI, Marinho CR, Penido ML, Boscardin SB, Hoft DF, Gazzinelli RT, Rodrigues MM. CD8+ T-cell dependent control of *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after immunization with recombinant proteins based on amastigote surface protein. Infect Immun. 2005; 73: 6017–25.

Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk, Babiuk SL. Immunization of animals: from DNA to the dinner plate. Vet Immunol Immunopathol. 1999 15;72(1-2):189-202.

Barragan A, Sibley LD. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. Trends in Microbiology, Limerick. 2003; 11: 426-30.

Baum J, Richard D, Healer J, Rug M, Krnajski Z, Gilberger TW, Green JL, Holder AA, Cowman AF. A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility

across malaria life cycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem.* 2006; 281: 5197-208.

Beckers CJM, Wakefield T, Joiner KA. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel roptry protein. *Mol Biochem Parasitol.* 1996; 89: 209-23.

Bessières MH, Le Breton S, Séguéla JP. Analysis by immunoblotting of *Toxoplasma gondii* exo-antigens and comparison with somatic antigens. *Parasitol Res.* 1992;78(3):222-8.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY, “Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection,” *J Immun.* 2000; 165(8): 4515–21.

Bohne W, Gross U, Ferguson DJP, Heesemann J. Cloning and characterization of a bradyzoite-specifically expressed gene (hsp30/bag1) of *Toxoplasma gondii*, related to small heat-shock proteins of plants. *Mol Microbiol.* 1995; 16: 1221-1230.

Bradley PJ, Ward C, Cheng SJ, Alexander DL, Coller S, Coombs GH, Dunn JD, Ferguson DJ, Sanderson SJ, Wastling JM, Boothroyd JC. Proteomic analysis of roptry organelles reveals many novel constituents for host-parasite interactions in *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem.* 2005; 280: 34245– 34258.

Brindley PJ, Gazzinelli RT, Denkers EY, Davis SW, Dubey JP, Belfort Jr. R, et al. Differentiation of *Toxoplasma gondii* from closely related coccidia by riboprint analysis and a surface antigen gene polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 1993; 48: 447-56.

Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1993; 178(5):1655-63.

Brown CR, McLeod R. Class I MHC genes and CD8+T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol.* 1990; 145: 3438–41.

Brown CR, Hunter CA, Estes RG, Beckmann E, Forman J, David C, et al. Definitive identification of a gene that confers resistance against *Toxoplasma* cyst burden and encephalitis. *Immunology*. 1995; 85:419–28.

Buddhirongawatr R, Tungsudjai S, Chaichoune K, Sangloun C, Tantawiwattananon N, Phonaknguen R, Sukthana Y. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *T Southeast Asian J Trop Med and Public Health*. 2006; 3: 15–17.

Bülow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*. 1991 15;147(10):3496-500.

Burg JL, Perelman D, Kasper LH, Ware PL. and Boothroyd JC. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 1988; 141: 3584–91.

Burg JL, Grove CM, Pouletty P, Boothroyd JC. Directed and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. *J Clin Microb*. 1989; 27: 1787–92.

Bushrod F. Toxoplasmosis: not just a risk during pregnancy. *Clin Lab Inter*. 2004; 28: 4.

Buxton D, Thomson KM, Maley S, Wright S, Bos HJ. Experimental challenge of sheep 18 months after vaccination with a live (S48) *Toxoplasma gondii* vaccine. *Vet Rec*. 1993 25; 133(13):310-2.

Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology. Review*. 1995; 110 Suppl:S11-6.

Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Review. Vet Res*. 1998; 29 (3-4): 289-310.

Buzoni-Gatel D, Schulthess J, Menard LC, Kasper LH. Mucosal defenses against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol*. 2006; 8: 535-44.

Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Peruzzi S, Zerbini L, Bommezzadri S, Dettori G, Chezzi C. Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii*. Acta Biomed. 2006; 77: 75-80.

Cantos GA, Prando M D, Siqueira MV. *et al.* Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti - *Toxoplasma gondii* e diagnóstico. Rev Assoc Med Bras. 2000; 46: 335-41.

Carey KL, Donahue CG, Ward GE. Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 2000; 105 (1):25-37.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. Eur J Cell Biol. 1997; 73 (2): 114-23.

Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD. Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. Cell Microbiol. 1999; 1(3):225-35.

Carruthers, VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. Acta Trop. 2002; 81: 111-22.

Carruthers VB, Sherman GD, Sibley LD. The *Toxoplasma* adhesive protein MIC2 is proteolytically processed at multiple sites by two parasite-derived proteases. J Biol Chem. 2000; 275(19): 14346-53.

Carruthers VB, Tomley FM. Microneme proteins in apicomplexans. Subcell Biochem. 2008;47:33-45. Review.

Cassaing S., Bessières M.H., Berry A., *et al.* Comparison between Two Amplification Sets for Molecular Diagnosis of Toxoplasmosis by Real-Time PCR. J Clin Microb. 2006; 44: 720-24.

Cenci-Goga BT, Rossitto PV, Sechi P, McCrindle CM, Cullor JS. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. Foodborne Pathog Dis. 2011;8(7):751-62.

Cesbron-Delauw MF, Capron A. Excreted/secreted antigens of *T. gondii* – their origin and role in the host-parasite interaction. In: 48th Forum in immunology. 1994; 41-4.

Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primers systems for detection of *toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. J Clin Microb. 2004; 42: 1719-22.

Chatterton JM, Evans R, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. J Microbiol Methods. 2002; 51, 331–5.

Chatton E, Blanc G. Notes et reflexions sur le toxoplasme and le toxoplasmose du gondi. (*Toxoplasma gundii* Ch. Nicolle et Manceaux 1909). Arch. Inst. Pasteur Tunis. 1917; 10: 1–41.

Cingolani A, De Luca A, Larocca LM, Ammassari A, Scerrati M, Antinori A, Ortoni L. Minimally invasive diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma. J Natl Cancer Inst. 1998; 90: 364-9.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chioccola VL. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. J Clin Microbiol. 2005; 43 (10): 5044-7.

Commodaro AG, Belfort RN, Rizzo LV, Muccioli C, Silveira C, Burnier Jr MN, Belfort Jr R. Ocular toxoplasmosis: an update and review of the literature. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104; 345–50.

Contreras M, Schenone H, Salinas P, Sandoval L, Rojas A, Villarro el F, Solis F. Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996; 38: 431-51.

Copeland R, Phillpotts BA. Ocular manifestations of HIV. eMedicine. 2006: 1-46.

Costa-Silva TA, Meira CS, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol. 2008; 120(3):227-34.

Costa-Silva TA, Pereira-Chiocola Fase aguda da infecção por *Toxoplasma gondii*: avaliação do parasitismo sanguíneo e resposta humoral em camundongos isogênicos A/Sn. *Scientia Medica*. 2010; 20 (1): 88-92.

Cozon GJ, Ferrandiz J, Nebhi H, Wallon M, Peyron F. Estimation of the avidity of immunoglobulin G for routine diagnosis of chronic *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *Eur J Clin Microb Infect Dis*. 1998; 17: 32-6.

Dawson HD, Beshah E, Nishi S, Solano-Aguilar G, Morimoto M, Zhao A, Madden KB, Ledbetter TK, Dubey JP, Shea-Donohue T, Lunney JK, Urban JF Jr. Localized multigene expression patterns support an evolving Th1/Th2-like paradigm in response to infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infect Immun*. 2005;73(2):1116-28.

Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4): 569-88. Review.

Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Rang A, Hof H, Schluter D. Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p75), in murine toxoplasmosis. *J Immunol*. 1998; 160: 3427-36.

Decoster A, Darcy F, Capron A. Recognition of *Toxoplasma gondii* excreted and secreted antigens by human sera from acquired and congenital toxoplasmosis: identification of markers of acute and chronic infection. *Clin Exp Immunol*. 1988; 73 (3): 376-82.

Defrance T, Vanbervliet B, Brière F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med*. 1992; 175(3): 671-82.

Değirmenci A, Döşkaya M, Caner A, Çiçek C, Korkmaz M, Gürüz Y, Uner A. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Exp Parasitol*. 2011; 128(1):1-8.

Del Bono V, Canessa A, Bruzzi P, Fiorelli MA, Terragna A. Significance of specific immunoglobulin M in the chronological diagnosis of 38 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(9): 2133-5.

Denkers EY, Yap G, Scharon-Kersten T, Charest H, Butcher BA, Caspar P, Hieny S, Sher A. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 1997; 159:1903-08.

Denkers EY. Toll-like receptor initiated host defense against *Toxoplasma gondii*. *J Biomed Biotechnol. Review.* 2010: 737125.

Diab MR, El-Bahy MM *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Exp Parasitol.* 2008; 118, 75-9.

Dobrowolski JM, Sibley LD. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* 1996; 84 (6): 933-9.

Donahue CG, Carruthers VB, Gilk SD, Ward GE. The *Toxoplasma* homolog of Plasmodium apical membrane antigen-1 (AMA-1) is a microneme protein secreted in response to elevated intracellular calcium levels. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 111(1):15-30.

Dollfus H, Dureau P, Hennequin C, Uteza Y, Bron A, Dufier JL. Congenital *Toxoplasma* chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. *Br J Ophthalmol.* 1998; 82: 1444-45.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*, *J Parasitol.* 1970; 56: 447-56.

Dubey JP, Frenkel JK. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J Protozool.* 1972; 19(1): 155-77.

Dubey JP, Frenkel JK. Feline toxoplasmosis from acutely infected mice and the development of *Toxoplasma* cysts. *J Protozool.* 1976; 4: 537-46.

Dubey JP, Beattie CP. *Toxoplasmosis of Man and Animals*. Boca Raton: CRC press. 1988.

Dubey JP. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other cyst-forming coccidia of humans and animals*. In: Kreier JP (ed). *Parasitic Protozoa*. Vol VI, New York: Academic Press; 1993. p.1-57.

Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol*. 1998; 11 (2): 267-99.

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

Dupouy-Camet J, De Souza SL, Maslo C, Paugam A, Saimot AG, Benarous R, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in venous blood from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microb*. 1993; 31: 1966-69.

Dupon M, Cazenave J, Pellegrin JL, Ragnaud JM, Cheyrou A, Fischer I, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR and tissue culture in cerebrospinal fluid and blood of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microb*. 1995; 33: 2421-26.

Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. 2009; 123(1): 81-9.

Edvinsson B, Lundquist J, Ljungman P, Ringdén O, Evengård B. A prospective study of diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection after bone marrow transplantation. *APMIS*. 2008; 116 (5): 345-51.

Ee TY, Singh M, Yap EH. The determination of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in different IgG subclasses of human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1989; 20(1):71-9.

Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé ML, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud JC, Philippe Thulliez P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis.* 2009; 199: 280-5.

El-Malky M, Shao hong L, Kumagai T, Yabu Y, Noureldin MS, Saady N, Maruyama H, Ohta N. Protective effect of vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen and CpG as an adjuvant against *Toxoplasma gondii* in susceptible C57BL/6 mice. *Microbiology and Immunol.* 2005; 49, 639–46.

Evans R, Chatterton JM, Ashburn D, Joss AW, Ho-Yen DO. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiol Infect Dis.* 1999; 18: 879–84.

Ferreira IM, Vidal JE, Costa-Silva TA, Meira CS, Hiramoto RM, Penalva de Oliveira AC, Pereira-Chiocola VL. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Exp Parasitol.* 2008;118(2):221-7.

Ferreira MS. Infections by protozoa in immunocompromised hosts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000; 95 (suppl I): 159-162.

Ferreira-da-Silva Mda F, Rodrigues RM, Andrade EF, Carvalho L, Gross U, Lüder CG, Barbosa HS. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104 (2): 196-200.

Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Comparison of Targets for Detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *J Clin Microb.* 2003; 41: 4826-28.

Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 2004; 40: 71-80.

Fishbein DB, Yenne KM, Dreesen DW, Teplis CF, Mehta N, Briggs DJ. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study. *Vaccine*. 1993; 14: 1390–94.

Foudrinier F, Villena I, Jaussaud R, Aubert D, Chemla C, Martinot F, Pinon JM. Clinical value of specific immunoglobulin E detection by enzyme-linked immunosorbent assay in cases of acquired and congenital toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(4):1681-6.

Francis JM, Joynson DH. Duration of specific immunoglobulin A antibody following acute toxoplasmosis as determined by enzyme immunoassay and immunosorbent agglutination assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12(7):556-9.

Frazatti-Gallina NM, Mourão-Fuches RM, Paoli RL, Silva ML, Miyaki C, Valentini EJ, Raw I, Higashi HG. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine*. 2004; 23: 511-517.

Franchin G, Pereira-Chioccola VL, Schenkman S, Rodrigues MM. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infection and Immunity*. 1997; 65 (7): 2548–54.

Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* . 1970; 167: 893-6.

Frenkel JK, Dubey JP. Toxoplasmosis and its prevention in cats and man. *Journal of Infections Disease*. 1972; 126: 664-73.

Frenkel JK. *Toxoplasma* in and around us. *BioScience*. 1973; 23: 343-352.

Frenkel JF, Vidal JE: Toxoplasmose, In: tratado de infectologia 4^a. Ed. Veronesi R, Focacci R, *Atheneu*. São Paulo Brasil. 2010

Froud SJ. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Developments in Biological Standardization*. 1999; 99; 157–66.

Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol. 1991; 146: 286–92.

Gazzinelli RT, 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*. J Immunol. 1992; 149: 175-80.

Gazzinelli RT, Eltoun IA, Wynn T, Sher A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-a and correlates with down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. J Immunol. 1993; 151:3672–81.

Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, et al. “Parasite induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*,” J Immunol. 1994; 153(6): 2533–43.

(A) Gazzinelli RT, Amichay DM, Sharton-Kersten T, Grunwald E, Farber JM, Sher A, Role of macrophage derived cytokines in the induction and regulation of cell mediated immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Curr Top Immunol. 1996; 219: 127-40.

(B) Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, et al., “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- γ , and TNF- α ,” J Immunol. 1996; 157 (2): 798–805.

Gilbert RE, Stanford MR. Is ocular toxoplasmosis caused by prenatal or postnatal infection? Br J Ophthalmol. 2000; 84: 224-6.

Gilbert R. Screening option in the management of congenital toxoplasmosis. Clinical Laboratory International. 2004; 28: 8-12.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Morau D, Martins MC, Burnier Junior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in Southern Brazil. Am J Ophthalmol. 1992; 144: 136-44.

Godard I, Darcy F, Deslee D, Dessaint JP, Capron A. Isotypic profiles of antibody responses to *Toxoplasma gondii* infection in rats and mice: kinetic study and characterization of target antigens of immunoglobulin A antibodies. *Infect Immun*. 1990; 58(8):2446-51.

Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie R, Cesbron-Delauw MF, Mercier C. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine*. 2007; 25(21):4301-11.

Gorgievski-Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol*. 1996; 34 (6):1506-11.

Gramzinski RA, Maris DC, Doolan D, Charoenvit Y, Obaldia N, Rossan R, Sedegah M, Wang R, Hobart P, Margalith M, Hoffman S. Malaria DNA vaccines in *Aotus* monkeys. *Vaccine*. 1997 Jun;15(8):913-5.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion. *Exp Parasitol*. 1992; 74; 106-11.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: redistribution of tachyzoite surface protein during host cell invasion and intracellular development. *Parasitol Res*. 1995; 81: 657-1.

Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between tachyzoites and bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 1996; 12 (1): 30-3.

Gutiérrez J, Maroto C. Are IgG antibody avidity assays useful in the diagnosis of infectious disease? A review. *Microbios* 1996; 87: 113-21.

Gutiérrez J, Rodríguez M, Piédrola G, del Carmen Maroto M. Detection of IgA and low-avidity IgG antibodies for the diagnosis of recent active toxoplasmosis. *Clin Microbiol Infect*. 1997; 3(6):658-62.

Hakansson S, Morisaki H, Heuser J, Sibley LD. Time-lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel, biphasic mechanism of cell locomotion *Mol Biol Cell*. 1999; 10 (11): 3539-47.

Harmer C, Hassl A, Kreinecker S, Aspöck H. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. J Microbiol Methods. 1996; 27: 225-28.

Hedman K, Lappalainen M, Seppala I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. J. Infect Dis. 1989; 159: 736-9.

Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. J Med Microb. 2004; 53: 629–632.

Hill D, Dubey JP. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 2002; 8: 634-40.

Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. Anim Health Res Rev. Review. 2005; 6(1): 41-61.

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

Hiszczyńska-Sawicka E, Li H, Boyu Xu J, Akhtar M, Holec-Gasior L, Kur J, Bickerstaffe R, Stankiewicz M. Induction of immune responses in sheep by vaccination with liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* MIC3 gene. Pol J Vet Sci. 2012;15(1):3-9.

Hoffmann C, Ernst M, Meyer P, Wolf E, Rosenkranz T, Plettenberg A, et al. Evolving characteristics of toxoplasmosis in patients infected with human immunodeficiency virus-1: clinical course and *Toxoplasma gondii*-specific immune responses. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(5): 510-5.

Hohlfeld P, Daffos F, Costa JM, Thulliez P, Forestier F, Vidaud M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis with a polymerase-chain-reaction test on amniotic fluid. N Engl J Med. 1994; 331: 695-99

Holland GN 1999. Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. Am J Ophthalmol 128: 502-05.

Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part I: epidemiology and course of disease. Am J Ophthalmol. 2003; 136: 973-88.

Holland GN. Ocular toxoplasmosis: a global reassessment. Part II: disease manifestations and management. Am J Ophthalmol. 2004; 137: 1-17.

Holliman RE, Raymond R, Renton N, Johnson JD. The diagnosis of toxoplasmosis using IgG avidity. Epidemiol Infect. 1994; 112: 399-408.

Homan WL, Vercammenb M, De Braekeleer J, Verschueren H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Inter J Parasit 2000; 30: 69-75.

Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995; 172: 1561-66.

Howe DK, Honoré S, Derouin F, Sibley LD. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. J Clin Microb 1997; 35: 1411-14.

Howell SA, Hackett F, Jongco AM, Withers-Martinez C, Kim K, Carruthers VB, Blackman MJ. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. Mol Microbiol. 2005; 57(5): 1342-56.

Hu K, Roos DS, Murray JM: A novel polymer of tubulin forms the conoid of *Toxoplasma gondii* J Cell Biol. 2002; 156: 1039-50.

Hughes HP, van Knapen F. Characterisation of a secretory antigen from *Toxoplasma gondii* and its role in circulating antigen production. Int J Parasitol. 1982; 12(5): 433-7.

Hughes HP, Hudson L, Fleck DG. In vitro culture of *Toxoplasma gondii* in primary and established cell lines. In J Parasitol. 1986; 16: 317-22.

Hunter CA, Candolfi E, Subauste C, Van Cleave V, Remington JS. Studies on the role of IL-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunol.* 1995 84: 16–20.

Huskinson J, Stepick-Biek PN, Araujo FG, Thulliez P, Suzuki Y, Remington JS. *Toxoplasma* antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(9):2031-8.

Huynh MH, Rabenau KE, Harper JM, Beatty WL, Sibley LD, Carruthers VB. Rapid invasion of host cells by *Toxoplasma* requires secretion of the MIC2-M2AP adhesive protein complex. *Embo J.* 2003; 22: 2082–90.

Huynh MH, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* 2006; 2 (8): 84.

Ismael AB, Sekkai D, Collin C, Bout D, Mévélec MN. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infect. Immun.* 2003; 71 (11): 6222–28.

Jacobs, L. *Toxoplasma* and toxoplasmosis. *Adv Parasitol.* 1967; 5: 1-45.

Jamra LMF. Contribuição para a epidemiologia de toxoplasmose. Inquérito em 100 famílias de uma área da cidade de São Paulo. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. SP. 1964.

Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J Exp Med.* 2007; 204 (2): 273-83.

Jankû J 1923. Pathogens a pathologica anatomie T. Zv. Vrozaneho kolobou zlute skurney oku normal ne velikem a mikrophtalmickem s nalezem parisitu v sitnici. *Cas Lek Ses.* 62: 1021-1027.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of anti-*toxoplasma* immunoglobulin G avidity. *J Clin Microb.* 1997; 35: 1972-1977.

Jewett TJ, Sibley D, The *Toxoplasma* proteins MIC2 and M2AP form a hexameric complex necessary for intracellular survival. *J Biol Chem.* 2004; 279 (10): 9362-69.

Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999–2004, decline from the prior decade. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77: 405–10.

Johnson M, Broady K, Angelici MC, Johnson A. The relationship between nucleoside triphosphate hydrolase (NTPase) isoform and *Toxoplasma* strain virulence in rat and human toxoplasmosis. *Microbes Infect.* 2003; 5(9):797-806.

Joynton DH, Payne RA, Rawal BK. Potential role of IgG avidity for diagnosing toxoplasmosis. *J Clin Pathol.* 1990; 43: 1032-33.

Jung C, Lee CYF, Grigg ME, The superfamily of *Toxoplasma gondii* surface proteins. *Int J Parasitol.* 2004; 34, 285-96.

Kasper LH, Mineo JR. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today.* 1994; 10 (5): 184-8.

Kawarabayashi M, Aureliano DP, Raymundo ML, Garcia RA, Costa-Silva TA, Castellão KG, Taniguchi HH, Tolezano JE, Hiramoto RM. Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2007; 66 (1): 63-7.

Khan A, Fux B, Su C, Dubey JP, Darde ML, Ajioka JW, Rosenthal BML, Sibley D. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *PNAS, USA.* 2007; 104: 14872–77.

Koppe JG, Loewer-Sieger DH, de Roever-Bonnet H. Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet.* 1986; 1: 254-6.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med.* 2005; 118: 212-6.

Kodjikian L, Hoigne I, Adam O, Jacquier P, Aebi-Ochsner C, Aebi C, Garweg JG. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. *Pediatr Infect Dis J*. 2004; 23: 272-4.

Kupferschmidt O, Kruger D, Held TK, Ellerbrok H, Siegert W, Janitschke K. Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by TaqMan polymerase chain reaction. *Clin Microb Infect*. 2001; 7: 120-4.

Kur J, Holec-Gasior L, Hiszczyńska-Sawicka E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 2009; 8: 791–808.

Lebrun M, Michelin A, El Hajj H, Poncet J, Bradley PJ, Vial H, Dubremetz JF. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol*. 2005; 7: 1823–33.

Lee YH, Shin DW, Lee JH, Nam HW, Ahn MH. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. *Yonsei Medical Journal* 2007; 48, 396–404.

Lee EJ, Heo YM, Choi JH, Song HO, Ryu JS, Ahn MH. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean J Parasitol*. 2008; 46 (3): 145-51.

Lekutis C, Ferguson DJ, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp Parasitol*. 2000; 96(2):89-96.

Leng J, Butcher BA, Egan CE, Abi Abdallah DS, Denkers EY. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. *J Immunol*. 2009;182(1):489-97.

Leyva R, Hérion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res*. 2001; 87(1):70-9.

Liesenfeld O, Kosek J, Remington JS, 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*. J Exp Med. 1996; 184(2):597-607.

(A) Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of testing for IgG avidity in the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women: experience in a US reference laboratory. J Infect Dis. 2001; 183: 1248-53.

(B) Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ, Davis M, Brown Jr, Cobb KL, Parsonnet J, Remington JS Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. Am. J. Obstet. Gynecol. 2001; 184: 140-5.

Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? J Infect Dis. 2002; 185 Suppl 1:S96-101. Review.

Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microb. 2000; 38: 4121-25.

(A) Liu KY, Zhang DB, Wei QK, Li J, Li GP, Yu JZ. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. World J Gastroenterol. 2006; 12(15): 2363-8.

(B) Liu CH, Fan YT, Dias A, Esper L, Corn RA, Bafica A, Machado FS, Aliberti J. Cutting edge: dendritic cells are essential for in vivo IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol. 2006; 177 (1): 31-5.

Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis. Clin. Infect. Dis. 1992; 15: 211-222.

Lynch MI, Malagueño E, Lynch LF, Ferreira S, Stheling R, Oréfice F. Anti-*Toxoplasma gondii* secretory IgA in tears of patients with ocular toxoplasmosis: immunodiagnostic validation by ELISA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104 (6): 818-22.

Macre Mde S, Pires M, Meireles LR, Angel SO, Andrade HF Jr. Serology using rROP2 antigen in the diagnostic of toxoplasmosis in pregnant women. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2009; 51(5): 283-8.

Macrì G, Sala M, Linder A, Pettirossi N, and Scarpulla M. Comparison of indirect fluorescent antibody test and modified agglutination test for detecting *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G antibodies in dog and cat. *Parasitol Res* 2009;105: 35–40.

Magno RC, Lemgruber L, Vommaro RC, De Souza W, Attias M. Intravacuolar network may act as a mechanical support for *Toxoplasma gondii* inside the parasitophorous vacuole. *Microsc Res Tech*. 2005; 67:45–52.

Marcolino PT, Silva DA, Leser PG, Camargo ME e Mineo JR. Molecular markers in acute em chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by western blotting. *Clin Diag Lab Immunol*. 2000; 7: 384-9.

Marshall VM, Peterson MG, Lew AM, Kemp DJ. Structure of the apical membrane antigen I (AMA-1) of *Plasmodium chabaudi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; 37: 281–3.

Martin V, Supanitsky A, Echeverria PC, Litwin S, Tanos T, De Roodt AR, Guarnera, EA, Angel SO. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the gra4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 2004: 11, 704–10.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chioccola VL. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol*. 2008; 57(7): 845-50.

Meissner M, Reiss M, Viebig N, Carruthers VB, Toursel C, Tomavo S, Ajoika JW, Soldati D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *Journal of Cell Science*. 2002; 115: 563-74.

Mercier C, Dubremetz JF, Rauscher B, Lecordier L, Sibley LD, Cesbron-Delauw MF. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 2397–409.

Mesquita RT, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. Molecular diagnosis of cerebral toxoplasmosis: comparing markers that determine *Toxoplasma gondii* by PCR in peripheral blood from HIV-infected patients. *Braz J Infect Dis*. 2010; 14(4): 346-50.

Montoya JG, Remington JS. Toxoplasmic chorioretinitis in the setting of acute acquired toxoplasmosis. *Clin Infect Dis*. 1996; 23: 277-82.

Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis, *THE LANCET*. 2004; 363: 1965-76.

Mordue DG, Monroy R, La Regina M, Dinarello CA, Sibley LD. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. *J Immunol*. 2001; 167: 4574-84.

Morris MT, Coppin A, Tomavo S, Carruthers VB. Functional analysis of *Toxoplasma gondii* protease inhibitor 1. *J Biol Chem*. 2002; 277 (47): 45259-66.

Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. *Immunol Rev*. 2011; 240(1): 269-85.

Nakaar V, Ngô HM, Aaronson EP, Coppens I, Stedman TT, Joiner KA. Pleiotropic effect due to targeted depletion of secretory rhoptry protein ROP2 in *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2003; 116 (11): 2311-20.

Neudeck A, Stachelhaus S, Nischik N, Striepen B, Reichmann G, Fischer H-G. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. *Microbes Infect*. 2002; 4: 581-90.

Neyer LE, Gruning G, Fort M, Remington JS, Rennick D, Hunter CA Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-dependent and T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 1997; 65(5):1675-82.

Nguyen TD, Bigaignon G, Van Broeck J, Vercammen M, Nguyen TN, Delmee M, Turneer M, Wolf SF, Coutelier JP. Acute and chronic phases of *Toxoplasma gondii* infection in mice modulate the host immune responses. *Infect Immun*. 1998; 66 (6): 2991-5.

Nicolle C, Manceaux L. Sur. Une infection a corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Acad Sci (Paris)*. 1908; 147: 763-66.

Nielsen HV, Lauemoller SL, Christiansen L, Buus S, Fomsgaard A, Petersen E. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect Immun.* 1999; 67: 6356–63.

Nusseblatt RB, Belfort Júnior R. Pathogenesis of inflammatory conditions of the retina: toxoplasmosis retinochoroiditis. In: Tabbara KF, Hyndiuk RA. *Ophthalmology: infections of the eye.* 2nd ed. Boston: Little, Brown 1996; 61-5.

Ogra PL, Metecky H. *Handbook of Mucosal Immunology.* 1a ed. Academic Press, San Diego. 1994 : 766.

Okay TS, Yamamoto L, Oliveira LC, Manuli ER, Andrade Junior HF, Del Negro GMB. Significant performance variation among PCR systems in diagnosing congenital toxoplasmosis in São Paulo, Brazil: Analysis of 467 amniotic fluid samples. *Clinics.* 2009; 64: 171-76.

Pappas G, Roussos N, Falagas ME. Toxoplasmosis snapshots: global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int J Parasitol.* 2009; 39:1385–94.

Park Y, Nam H. Early recognized antigen (p34) of *Toxoplasma gondii* after peroral ingestion of tissue cyst forming strain (ME49) in mice. *The Korean J Parasitol.* 1999; 37 (3) 157-62.

Pereira-Chioccola VL, Costa F, Ribeirão M, Soares IS, Arena F, Schenkman S, Rodrigues MM. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. *Parasite Immunol.* 1999; 21(2):103-10.

Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol. Review* 2009; 4(10):1363-79.

Perkins ME. Roptry organelles of Apicomplexan parasite. *Parasitology Today.* 1992; 8 (1) 28-32.

Pinon JM, Dumon H, Chemla C, Franck J, Petersen E, Lebech M, *et al.* Strategy for diagnosis of congenital toxoplasmosis: evaluation of methods comparing mothers and

newborns and standard methods for postnatal detection of immunoglobulin G, M, and A antibodies. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 2267-71.

Potasman I, Resnick L, Luft BJ, Remington JS. Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med.* 1988; 108 (1):49-51.

Prigione I, Fachetti P, Lecordier L, Deslée D, Chiesa S, Delawn MFC, et. al. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross – react with live tachyzoites: Characterization of fine antigens specificity of the clones and implication for vaccine development. *J Immunol* 2000; 164: 164: 3741-8.

Pszenny V, Ledesma BE, Matrajt M, Duschak VG, Bontempi EJ, Dubremetz JF, Angel SO. Subcellular localization and post-secretory targeting of TgPI, a serine proteinase inhibitor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002; 121(2):283-6.

Ravdin JI. Protozoal Disease. In: Mandell, GL, Benett, JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol. 2, 4th Edition, Churchill Livingstone. 1995; 2393-95.

Ravel R, Aplicações Clínicas de dados laboratoriais. Rio de Janeiro 1998. 6^oed.

Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chiocola VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Exp Parasitol.* 2012; 130(3):195-9.

Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P “The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection,” *Current Op Immunol* 1999; 11 (4): 392–99.

Remington JS, Mcleod R, Desmots G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO (EDS). Infectious Diseases of the fetus e newborn infant. 4th edition, W.B. Saunders Company. 1995; 140-268.

Remington JS, McLeod R, Thulliez P, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein J, eds. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5th edn. Philadelphia: WB Saunders. 2001: 205-346.

Roberts CD, Ferguson DJP, Jebbari J, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun 1996; 64: 897-904.

Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis . Parasitol Today. 1999; 15(2): 51-7.

Roiko MS, Carruthers VB. New roles for perforins and proteases in apicomplexan egress. Cell Microbiol. 2009; 11(10): 1444-52.

Rosenberg C, De Craeye S, Jongert E, Gargano N, Beghetto E, Del Porto P, Vorup-Jensen T, Petersen E. Induction of partial protection against infection with *Toxoplasma gondii* genotype II by DNA vaccination with recombinant chimeric tachyzoite antigens. Vaccine. 2009; 27 (18): 2489-98.

Saadatnia G, Haj Ghani H, Khoo BY, Maimunah A, Rahmah N. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. Trop Biomed. 2010; 27(1):125-30.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite *Toxoplasma*. Science 1948; 108: 660-3.

Santos TR, Costa AJ, Toniollo GH et al. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in dairy cattle, dogs, and humans from the Jauru micro-region, Mato Grosso state, Brazil. Vet Parasitol, Amsterdam 2009; 161(3/4): 324-6.

Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol. 1990; 145(11): 3796-806.

Scharton-Kersten TM, Wynn TA, Denkers EY, Bala S, Grunvald E, Hieny S, Gazzinelli RT, Sher A. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. J Immunol 1996; 157: 4045-54.

Scorza T, D'Souza S, Laloup M, Dewit J, De Braekeleer J, Verschueren H, Vercammen M, Huygen K, Jongert E. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 2003; 71(1):309-16.

Sensini A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12(6): 504-12.

Siachoque H, Guzman F, Burqos J, Patarroyo ME, Gomez Marin JE. *Toxoplasma gondii*: immunogenicity and protection by SAG1 peptides in a murine model. *Exp Parasitol*. 2006; 114: 62–5.

Sibley LD, Adam SL, Fukutomi Y, tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages. *J Immunol*. 1991; (147): 2340-45.

Silveira C. Toxoplasmose: levantamento bibliográfico de 1997 a 2000. *Arq Bras Oftalmol*. 2001; 64(3): 263-70.

Silveira C, Ferreira R, Muccioli C, Nussenblatt R, Belfort RJ. Toxoplasmosis transmitted to a newborn from the mother infected 20 years earlier. *Am J Ophthalmol* 2003; 136: 370-1.

Sinai AP, Webster P, Joiner KA. Association of host cell endoplasmic reticulum and mitochondria with the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane: a high affinity interaction. *J Cell Sci* 1997; 110 (17):2117-28.

Sinai AP. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. *Subcell Biochem*. 2008;47:155-64.

Shaapan RM, El-Nawawi FA, and Tawfik MAA. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. *Vet Parasitol*. 2008; 153: 359–62.

Sher A, Reis e Sousa C. Ignition of the type 1 response to intracellular infection by dendritic cell-derived interleukin-12. *Eur Cytokine Netw*. 1998;9 (3 Suppl):65-8.

Soldati D, Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(1):32-40.

Spano F, Ricci I, Di Cristina M, Possenti A, Tinti M, Dendougrl N, Tomavo S, Crisanti A. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. *Int J Parasitol.* 2002; 32: 121-31.

Splendore A. Un nuovo protozoa parassita de conigli encontrado nelle lesioni anatomiche d'une malattiache ricorda in moltopunti il Kalazar dell'uomo. Nota preliminaire pel. *Rev Soc Sci São Paulo.* 1908; 3: 109-12.

Subauste CS, Koniaris AH, Remington JS. Murine CD8+ cytotoxic T Lymphocytes lyse *Toxoplasma gondii*-infected cells. *J Immunol.* 1991; 147: 3955-59.

Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science.* 1988; 240 (4851): 516-8.

Suzuki Y, Conley FK, Remington JS. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J Immunol.* 1989; 143: 2045-50.

Suzuki Y, Remington JS. The effect of anti- IFN-g antibody on the protective effect of lyt-21 immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J. Immunol.* 1990; 144:1954– 56.

Suzuki Y, Sher A, Yap G, et al. "IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*," *Journal of Immunol* 2000; 164 (10): 5375–82.

Tan TG, Mui E, Cong H, Witola WH, Montpetit A, Muench SP, Sidney J, Alexander J, Sette A, Grigg ME, Maewal A, McLeod R. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine.* 2010; 28(23): 3977-89.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000 Nov;30(12-13):1217-58. Review. Erratum in: *Int J Parasitol* 2001;31(2):217-20.

Tomavo S, Dubremetz JF, Schwarz RT. Structural analysis of glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor of the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface glycoprotein gp23. *Biol Cell* 1993; 78 (3): 155-62.

Trinchieri G, Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med.* 2007; 204 (2): 239-43.

Vallochi AL, Goldberg AC, Falcai A, Ramasawmy R, Kalil J, Silveira C, Belfort Jr R, Rizzo LV. Molecular markers of susceptibility to ocular toxoplasmosis, host and guest behaving badly. *Clin Ophthalmol.* 2008; 2; 837–48.

Vasconcelos JR, Boscardin SB, Hiyane MI, Kinoshita SS, Fujimura AE, Rodrigues MM. A DNA-priming protein-boosting regimen significantly improves type 1 immune response but not protective immunity to *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain. *Immunol Cell Biol* 2003; 81; 121–29

Vidal JE, Diaz AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL. Importance of high IgG anti-*Toxoplasma gondii* titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(4):356-9.

Vidal JE, Hernandez AV, Penalva de Oliveira AC, Dauar R, Barboza SP, Focaccia R. Cerebral toxoplasmosis in HIV-Positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDS.* 2005; 19: 840-8.

Vidal JE, Diaz AV, de Oliveira AC, Dauar RF, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL. Importance of high IgG anti-*Toxoplasma gondii* titers and PCR detection of *T. gondii* DNA in peripheral blood samples for the diagnosis of AIDS-related cerebral toxoplasmosis: a case-control study. *Braz J Infect Dis.* 2011;15 (4): 356-9.

Villavedra M, Battistoni J, Nieto A. IgG recognizing 21-24KDa and 30-33KDa tachyzoite antigens show maximum avidity maturation during natural and accidental human toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop. São Paulo* 1999; 41: 297-303.

Ware PL, Kasper LH. 1986 Strain Specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Am Soc Microbiol.* 55: 778-83.

Wan KL, Carruthers VB, Sibley LD, Ajioka JW. Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 84:203–14.

Werk R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? *Rev. Infect. Dis.* 1985; 7: 449–457.

Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA. A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol.* 2005; 165: 63-74.

Wolf A, Cowen D, Paige BH. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis; verification by transmission to animals. *Science* 1939; 89: 226-7.

Wong SY, Remington JS. Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 1993; 7: 299-316.

Yap G, Pesin M, Sher A. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 2000; 165 (2): 628-31.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – Comissão de Ética na Experimentação Animal-CEEA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Análise da resposta celular de camundongos A/Sn imunizados com proteínas excretadas/secretadas (ESAs) de *Toxoplasma gondii*" (Protocolo FAMERP nº 7063/2008), sob responsabilidade do Prof. Dr. Luiz Carlos de Mattos, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002 e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (CEEA-FAMERP).

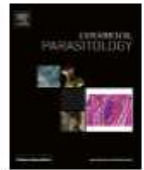
Lembramos ao senhor pesquisador a necessidade do relatório completo ao final do estudo.

We certify that Project entitled "Evaluation of cellular response of A/Sn mice immunized with excreted-secreted proteins from *Toxoplasma gondii*" (Protocol nº 7063/2008), agrees with the Ethical Principles for Animal Research established by Brazilian law nº11.794/2008 and Resolution nº 714/2002 and was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research of Faculty of Medicine from São José do Rio Preto (CEEA – FAMERP) on March 05, 2009.

São José do Rio Preto, 05 de março de 2009.

Profa. Dra. Cristiane Damas Gil
Presidente da CEEA – FAMERP

8.2 Anexo 2. *Costa-Silva TA, da Silva Meira C, Frazzatti-Gallina N, Pereira-Chiocola VL. Toxoplasma gondii antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. Exp Parasitol. 2012 Apr;130(4):463-9.*



Toxoplasma gondii antigens: Recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium

Thaís Alves da Costa-Silva^a, Cristina da Silva Meira^a, Neuza Frazzatti-Gallina^b, Vera Lucia Pereira-Chioccola^{a,*}

^aLaboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

^bInstituto Butantan, Seção de Raiva, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 June 2011

Received in revised form 24 October 2011

Accepted 10 January 2012

Available online 24 January 2012

Keywords:

Toxoplasma gondii

Vero cells

Serum-free medium

Tachyzoites

Antigens

ABSTRACT

Vero cells have been used successfully in *Toxoplasma gondii* maintenance. Medium supplementation for culture cells with fetal bovine serum is necessary for cellular growth. However, serum in these cultures presents disadvantages, such as the potential to induce hypersensitivity, variability of serum batches, possible presence of contaminants, and the high cost of good quality serum. Culture media formulated without any animal derived components, designed for serum-free growth of cell lines have been used successfully for different virus replication. The advantages of protozoan parasite growth in cell line cultures using serum-free medium remain poorly studied. Thus, this study was designed to determine whether *T. gondii* tachyzoites grown in Vero cell cultures in serum-free medium, after many passages, are able to maintain the same antigenic proprieties as those maintained in experimental mice. The standardization of Vero cell culture in serum-free medium for *in vitro T. gondii* tachyzoite production was performed establishing the optimal initial cell concentration for the confluent monolayer formation, which was 1×10^5 Vero cell culture as initial inoculum. The total confluent monolayer formatted after 96 h and the best amount of harvested tachyzoites was 2.1×10^7 using parasite inoculum of 1.5×10^6 after 7 days post-infection. The infectivity of tachyzoites released from Vero cells maintained in serum-free medium was evaluated using groups of Swiss mice infected with cell-culture tachyzoites. The parasite concentrations were similar to those for mice infected with tachyzoites collected from other infected mice. The data from both *in vivo* and *in vitro* experiments showed that in at least 30 culture cell passages, the parasites maintained the same infectivity as maintained *in vivo*. Another question was to know whether in the several continued passages, immunogenic progressive loss could occur. The nucleotide sequences studied were the same between the different passages, which could mean no change in their viability in the lysate antigen. Thus, the antigen production by cell culture has clear ethical and cost-saving advantages. Moreover, the use of culture media formulated without any human or animal derived components, designed for serum-free growth of cell lines, successfully produced tachyzoites especially for antigen production.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan parasite capable of infecting humans, warm-blooded domestic and wild animals. It is geographically widespread, and is thought to infect approximately one-third of the world's human population, although the prevalence of the parasite varies from country to country (Dubey, 1998; Tenter et al., 2000; Bojar and Szymańska, 2010; Elmore et al., 2010).

The laboratorial diagnosis of toxoplasmosis is based on serological and molecular methods, and rarely, on the isolation of *T. gondii* (Ahn et al., 1997; Pereira-Chioccola et al., 2009). Thus, the use of *in vivo* or *in vitro* tachyzoites is essential for different procedures such as experimental models, genetic studies and antigen production (Sibley and Boothroyd, 1992; Roos et al., 1994; Chatterton et al., 2002; Buddhirongawatr et al., 2006).

The RH strain has been used routinely in the majority of *T. gondii* studies. From the first isolation, from an infected human tissue in 1939 (Sabin, 1941), this strain has been maintained *in vivo* and *in vitro* by continuous passage in either mouse peritoneal cavities or in cultured cells (Mavin et al., 2004).

The most common antigen used in immunological assays is a lysate of *T. gondii* tachyzoites from the RH strain, which has been maintained via intraperitoneal passages in mice (Lee et al., 2008;

* Corresponding author. Address: Laboratório de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 351, 8 Andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3068 2890.

E-mail address: pchioccola@gmail.com (V.L. Pereira-Chioccola).

Costa-Silva et al., 2008; Değirmenci et al., 2011). Antigen production via mouse passages is considered an expensive method since mice survive only 4–6 days after infection, yet tachyzoite suspensions normally contain large numbers of mouse peritoneal cells. Additionally, the development of these procedures requires an extensive infrastructure for antigen production such as a vivarium, specialized professionals, and a great deal of animals. Thus, the propagation of tachyzoites in cell culture is more economical.

Since *in vitro* culture of *T. gondii* has been possible for many years, a variety of cell lines and culture methods have been developed to produce antigens for: immunological tests (Warren and Russ, 1948; Verhofstede et al., 1988; Hass and Aspöck, 1990; Ashburn et al., 2000; Meira et al., 2008), parasite isolation (Derouin et al., 1987; Calico et al., 1991; Domzig et al., 1993; Diab and El-Bahy, 2008), therapeutic (Bunetel et al., 1995; Fichera et al., 1995; Fichera and Roos, 1997) and vaccination studies (Garcia et al., 2005; Costa-Silva et al., 2008; Xue et al., 2008).

Typically there are two fundamental reasons for doing parasite cultivation *in vitro*. The first is that it provides long-term preservation of strains without having to resort to laboratory mammals. The second is the cheap production of a large number of parasite cells, especially for applications such as antigens, since it is possible to produce a large quantity of pure, extra-cellular, or recovered intact parasites. The goal of a mass production technique is usually rapid growth of intact tachyzoites. However, small amounts of host cell remnants such as serum proteins, and long-term maintenance of strains and regular provision of fresh viable tachyzoites still relies on culture in animals, usually rats or mice. In addition, currently, cell culture systems are replacing animal models because of ethical issues, infrastructural deficiencies such as the lack of experienced personnel and/or standardized vivariums in most research centers. In addition, the cost of *in vitro* culture is one-third to one-half of the cost of animal culture, which could justify the use of this system in routine procedures (Harmer et al., 1996; Evans et al., 1999; Ashburn et al., 2000; Chatterton et al., 2002).

Among the different cell lines, Vero cells have been used successfully in *T. gondii* maintenance (Costa-Silva et al., 2008; Saadania et al., 2010). Originally, Vero cells were established in Japan from the kidney of a normal adult African green monkey (*Cercopithecus aethiops*). Previous studies showed that Vero cell lines were free of oncogenic properties, not presenting risks to humans when used as substrate in the production of vaccines (Furesz et al., 1989). These cells have been used extensively for production of human virus vaccines in large-scale production as microcarriers or cultures in bioreactors. These procedures have also been recognized by the WHO (Frazzatti-Gallina et al., 2004).

Medium supplementation for culture cells with fetal bovine serum, human or bovine albumin is necessary for cellular growth. However, the use of serum in culture presents disadvantages, such as the potential to induce hypersensitivity, variability of serum batches, possible presence of contaminants (bacteria, fungi, mycoplasma, bovine viruses, etc.), and the high cost of a good quality serum (Fishbein et al., 1993; Froud, 1999; Frazzatti-Gallina et al., 2004). Previous studies showed that culture media formulated without human or animal derived components (VP-SFM AGT medium – GIBCO), designed for serum-free growth of cell lines have been used successfully for different virus replications, such as rabies virus, Japanese encephalitis virus, yellow fever virus and others (Frazzatti-Gallina et al., 2004; Torinawa and Komiya, 2011; Monath et al., 2011).

Previous studies of our group showed, even after culture cell washing with medium without fetal bovine serum before tachyzoite infection, serum traces were still detected in polyacrylamide gel (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2008). Although, a previous study demonstrated that recovery of tachyzoites is slightly lower in the absence of fetal calf sera (Diab and El-Bahy, 2008), the

advantages of using *T. gondii* growth in cell line cultures using serum-free medium were not totally established. Thus, the present study was designed to determine whether tachyzoites grown in Vero cell cultures in medium serum-free, after many passages are able to maintain the same antigenic proprieties as those maintained in experimental mice.

2. Materials and methods

2.1. Mice, cell cultures and *T. gondii* strain

Four-week-old female Swiss mice were used in experiments and to maintain *T. gondii* (RH strain) experiments. Groups of four mice were selected for *in vivo* infectivity experiments. All mice used in these experiments were housed in the pathogen-free mouse colony and obtained from the Laboratory Animal Center of Instituto Adolfo Lutz. During the experiments, the mice were equally maintained in the Laboratory Animal Center in Experimentation.

Vero cell monolayers (ATCC-CCL-81) obtained from the working Vero cell bank (WCB) from Rabies Laboratory (Instituto Butantan – SP-Brazil) were used in this study. This WCB was prepared with Vero cells maintained in serum-free medium and were tested according WHO requirements for cell lines: tests to determine the absence of fungi, bacteria, mycoplasma and other adventitious agents. To maintain the Vero cells in 25 cm² T-flasks, serum-free medium (VP SFM AGT-Gibco-Life Technologies) supplemented with 4 mM of L-glutamine and 2.5 µg/mL of gentamicin was used. The Vero cells in the T-flasks were washed once with PBS, incubated with 0.25% trypsin (Life Technologies) for 5 min at room temperature and tapped sharply to release the cells from the bottom of the flasks. Subsequently a new medium aliquot was added to the trypsinized cells. The cells were counted with a haemocytometer. An appropriate amount of cells were subcultured every 3–4 days into new flasks with medium and then incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere to form the confluent monolayer.

T. gondii RH tachyzoites were grown and maintained in Swiss mice ascites by intraperitoneal inoculation or in Vero cells. Every 3 or 4 days after infection, the peritoneal fluids from infected mice were collected in phosphate-buffered saline, pH 7.2 (PBS), pooled and centrifuged at 3000g for 10 min. Tachyzoites from both mice and cell cultures were washed twice, counted, suspended in PBS, at different concentrations for infecting other cell cultures or groups of mice. The same procedure was followed to prepare antigens for ELISA or the other experiments. This study was performed according recommendations of the "Colegio Brasileiro de Experimentação Animal" (COBEA), and the institutional review board of the Ethics Committee of both institutions approved this study.

2.2. Study of Vero cell growth in T-flask to *T. gondii* production *in vitro*

Different Vero cell concentrations of 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 and 5×10^6 cells per 25-cm² T-flasks were used. Two T-flasks of each cell concentration were incubated with 5 mL serum free medium at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. The amount of cells/flask after 24, 48, 72, 96 and 120 h were determined using an inverted microscope until forming a complete confluent monolayer (100%). The results were expressed in percent of confluent monolayer.

2.3. *In vitro* and *in vivo* *T. gondii* infectivity

T. gondii production was tested after establishing the optimal Vero cell concentration/T-flask and the best time of incubation. Six 25 cm² T-flask (with initial inoculum of 1×10^6 Vero cells) were infected, after 96 h, with 7×10^5 , 1.5×10^6 and 3×10^6

tachyzoites (two T-flask/each tachyzoite concentration). The final volume of each T-flask was 5 mL of new VP SFM AGT medium aliquot. These parasites were harvested from previously infected Swiss mice peritoneums. The cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. The release parasites in supernatants were counted daily with a hemocytometer for 10 days.

Next, tachyzoites released from Vero cells in VP SFM AGT medium were maintained for 30 passages. Each five passages (1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th), parasites were collected to infect another two new T-flasks with intention to evaluate *in vitro* and *in vivo* infectivity as well as, antigen production.

To compare the infectivity of parasites released from Vero cells in VP SFM AGT medium and Swiss mice, both sources of tachyzoites were used to infect eight Swiss mice divided in four groups. Cell culture tachyzoites (collected at 1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th passages) were used to infect four mice that were divided in two Groups (1A and 1B). Group 1A received 1×10^5 tachyzoites/animal and Group 1B, 1×10^6 tachyzoites/animal. Two control groups (2A and 2B) received the same scheme of infection using tachyzoites collected from another group of mice. After 4 days, peritoneal fluid was collected from each mouse, and the infection levels were evaluated by parasite counts in a hemocytometer. These experiments were done twice to confirm the results (two independent experiments).

2.4. DNA purification, PCR, primer selection and sequencing

Tachyzoites (1×10^7 parasites/mL) obtained in each five passages in Vero cell culture were used for DNA extraction by PureLink Genomic DNA Kits (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNA pellets were dissolved in ultra-pure water. DNA concentrations and purity were determined by the ratio of O.D. at 260 and 280 nm in a NanoDrop ND100 (Thermo Scientific). The experiments for PCR and sequencing were made using the two primer sets. The first was a SAG2 F4/R4 marker (5'GCTACCTCGAACAGGAACAC3' and 5'GCATCAACAGTCTTCGTTGC3'), which amplified a product around 300-bp from the 5' end side of SAG2 gene located in *T. gondii* chromosome VIII. The second was a SAG2F2/R2 marker (5'ATTCTCATGCCTCCGCTTC3' and 5'AACGTTT-CACGAAGGCACAC3'), which amplified a 240-bp product from another side (3'end) of the SAG2 gene (Howe et al., 1997; Khan et al., 2007).

Each PCR was carried out in a LongGene Thermal Cycler in a final volume of 25 µL. The DNA samples (2 µL) and 15 pmol of each primer were added to a kit purchased from Promega (Go Taq Green Master Mix). The PCR mix (12.5 µL) was composed of 1 unit of Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl; 1.5 mM MgCl₂; and 200 mM of each of dNTP. The amplification runs contained two negative controls (ultrapure water and a negative DNA for toxoplasmosis). The thermal cycle conditions were made by one initial denaturation cycle for 5 min at 95 °C, 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 90 s. The procedure was completed by a final cycle extension for 3 min. PCR products were analyzed under UV illumination after electrophoresis in 2% agarose gel and staining with ethidium bromide. The images were analyzed by a Mini Bis Gel Imager and Documentation (BioSystematica). The size of fragments was based on comparison with a 100-bp ladder (Ferreira et al., 2008).

Each PCR product was used for DNA sequencing after purification according to the manufacturer's instructions (PCR Clean-up System kit-PROMEGA). The fragments were sequenced with both primers to obtain forward and reverse sequences for both markers. The sequencing analysis was done using an ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing reaction kit and electrophoresis was made in an ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied BioSystems,

Foster City, CA/USA). The nucleotide sequences were analyzed and manually assembled and aligned for comparison using a Bio-Edit Sequence Alignment Editor. The alignments with the Genbank published sequences were made using the "NCBI/nucleotide-nucleotide BLAST" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

2.5. Antigen production and immunological tests

Two different protocols for antigen production were made using 1×10^7 cell culture tachyzoites/mL in PBS collected at 1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th passage in Vero cell culture in serum-free medium. The first was the conventional method as previously described (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Briefly, tachyzoites were sonicated for 10 cycles of 1.0A/min, for 5 min with 2 min intervals. In the second protocol, tachyzoites were lysed using glass beads (SIGMA –150:212 microns) by vortex for eight cycles per 4 min with 2-min intervals. In procedures, Toxoplasma lysate antigen (TLA) was dissolved in 0.3 M NaCl, and the protein concentration was determined in a Nanodrop ND 100 (Thermo Scientific). The percentage of tachyzoite lysis of each batch was calculated after viable parasite counts by microscopy.

Next TLA were evaluated by ELISA using the following serum groups: (i) 10 sera from chronically infected patients; (ii) 10 sera from normal individuals without toxoplasmosis; (iii) two pooled positive sera (five chronically infected mice with ME-49 strain); and (iv) two pooled negative sera (five healthy mice). Reactions were performed with polystyrene microtiter plates (flat bottom, low binding, Corning) using TLA at a concentration of 2 µg/mL. Each plate was incubated overnight at 4 °C with the antigen dissolved in 0.1 mL of 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5. Unbound antigens were removed by washing the plates with PBS, pH 7.2 containing 0.05% Tween 20. The free binding sites were blocked by treating the wells with 5% skimmed milk/PBS. After 1 h, 50 µL of each serum sample diluted 1:50 (mouse sera) and 1:200 (human sera) in 5% skimmed milk-PBS was incubated for 60 min at 37 °C. After five washes with PBS-Tween 20, the wells were incubated for a further 60 min at 37 °C with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse (1:4000) and anti-human immunoglobulin G (1:20000) (Sigma) diluted in 5% skimmed milk/PBS. After a new wash cycle with PBS-Tween 20, substrate solution (0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.05% o-phenylenediamine, 0.1% H₂O₂) was added to each well and the plates were left to stand at room temperature in the dark for 30 min. Color development was stopped by adding 50 µL of 4 N H₂SO₄. The absorbance was measured with an ELISA reader (Multiscan; Labsystems) with a 492 nm filter. The reactions were previously standardized (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Each serum sample was assayed in duplicate. The absorbance values were subtracted from the background, and the arithmetic mean was calculated. The values of each group were represented by the mean and standard error (SE) of the absorbance of each serum sample. The reactions were done twice to confirm the results.

2.6. Data analysis

The comparisons between the infectivity from parasites released from Vero cells and Swiss mice were statistically evaluated by the computer program GraphPad Prisma 5.0 (San Diego, CA). Differences between means of number of tachyzoites recovered per mL of mouse peritoneal fluids of Groups 1A and 2A and 1B and 2B were tested for significance by using the variance analyses, calculated by *F* test. The coefficient of similarity between both groups was calculated by Unpaired Student's *t*-test (two-tailed). Differences or similarities were considered statistically significant when *P* value was <0.05.

3. Results

3.1. Vero cell inoculum and optimization of *T. gondii* production in vitro

The standardization of Vero cell culture in serum free medium for *T. gondii* tachyzoite production was performed in two stages. The first was to establish the optimal inoculum for the confluent monolayer formation. Four different concentrations of cell inoculum were tested (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 or 5×10^6 cells) using 25-cm² T-flasks and 5 mL of VP SFM AGT medium per T-flask. The culture cells were evaluated every day. As shown in Table 1, the best Vero cell initial concentration was 1×10^6 . The total confluent monolayer was formed after 96 h. The concentration of 5×10^6 cells as initial inoculum resulted in a rapid cell total confluent monolayer (in 48 h); however, after 72 h an excess of cell confluence and cell death occurred. The excess of host cells hampers the parasite penetration.

The second step was to establish the optimal *T. gondii* infection. Six 25-cm² T-flasks received 1×10^6 Vero cells as inoculum and VP SFM AGT medium. After 96 h, in each two T-flasks, the cells were infected with 7×10^5 , 1.5×10^6 and 3×10^6 tachyzoites in a final volume of 5 mL of new medium aliquot, respectively. The cultures were incubated at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. As shown in Table 2, the best multiplication of harvested tachyzoites was (2.1×10^7) using parasite inoculum of 1.5×10^6 after 7 days post-infection. However, similar results were also shown after 7 and 8 days post-infection when inoculums were made with 0.7 or 3.0×10^6 .

3.2. Infectivity, in vivo, of tachyzoites from Vero cell culture in serum-free medium

The infectivity of tachyzoites released from Vero cells maintained in VP SFM AGT medium was evaluated during 30 passages. Two groups of Swiss mice were infected with 1×10^5 or 1×10^6 cell culture tachyzoites/animal as described in the Section 2. Fig. 1 shows the tachyzoite amount per mL of mouse peritoneal fluid after 4 days post-infection. These experiments were done each 5-culture tachyzoite passage (Fig. 1A). The control group received parasites collected from other infected mice in the same periods (Fig. 1B).

The results are expressed as mean and standard error (SE) of two mice per group. The statistical analysis, using the Student's *t* and *F* tests were done to determine whether infectivity from parasites released from Vero cells (Fig. 1A) and Swiss mice (Fig. 1B) were statistically different. The variance analysis by *F* test revealed that results of groups infected with 1×10^5 parasites, 1A and 2A (1.348 , $P = 0.2520$) were not statistically different, as well as Groups 1B and 2B (1.199 , $P = 0.2538$), that received 1×10^6 parasites. Although infectivity variations per group have been observed during the same period of inoculation, these results showed that

tachyzoite concentrations recovered in mouse peritoneal fluids after 4 days post-infection were similar in mice infected with parasites cultivated in Vero cells or collected from infected mice.

The data from both *in vivo* and *in vitro* experiments showed that in at least 30 culture cell passages, the parasites maintained the same infectivity as maintained *in vivo*.

3.3. Tachyzoite genetic and antigenic characteristics after several Vero cell culture passages

The sequencing experiments were done in order to estimate whether after different culture passages, parasites maintained the same genetic homogeneity. Different regions of the SAG2 gene have been used for *T. gondii* genotyping studies (Su et al., 2006; Khan et al., 2007). Thus, two different regions of SAG2 gene were used here. The sequencing analyses were made in PCR products amplified from DNA extracted from tachyzoites collected each five Vero cell culture passage. One PCR product was a 300-bp region from SAG2 gene located near the 5' end side. The second PCR product was a 240-bp, located on the opposite side (3' end region). Firstly, the quality of the experiments was checked comparing the sequences with others already described in GenBank. The results confirmed the complete identity for the SAG2 gene and SAG2 protein. Next, after sequence alignment and as shown Fig. 2, all samples (1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th, 30th passage) presented the same nucleotide sequence. No modification was observed during the 30 passages, showing conserved parasite genetic identity.

Next, the antigenic features were evaluated by ELISA using well-known immune-sera and TLA as antigen. One additional tachyzoite lysis protocol, using glass beads and vortex mixed, was also tested. The conventional tachyzoite lysis method includes parasite sonication. As shown in Table 3, parasite lysis using glass beads and vortex was faster and more efficient than lysis using a sonicator.

The different TLA batches (coating 2 µg/mL of TLA/glass beads) were tested in ELISA. The results were shown in Fig. 3. Mouse or human negative sera for toxoplasmosis had negative results in all antigen batches (1st to 30th culture passage). In contrast, all antigen batches were able to detect *T. gondii* specific IgG antibodies from both, human or mouse positive sera.

4. Discussion

Many centers use *T. gondii* tachyzoites, derived from cell cultures, as an antigen source in serological diagnostic assays (Hughes et al., 1986; Ashburn et al., 2000; Chatterton et al., 2002; Buddhironawatr et al., 2006). Most use the *T. gondii* RH strain, maintained via intraperitoneal passages in mice, for crude antigen production (Ware and Kasper, 1986; Colombo et al., 2005; Lee et al., 2008; Macre et al., 2009; Ferreira-da-Silva et al., 2009; Lynch et al., 2009).

Another alternative is continuous cell cultures, which could provide regular harvests of fresh viable tachyzoites (Evans et al., 1999). Continuous cell lines are easy to maintain, reliable and inexpensive. *T. gondii* has been cultured in different continuous cell lines with a wide variation in the quality and quantity of the produced tachyzoites. The main cell lines used were HFF (Gail et al., 2004; Molestina et al., 2008), Hep-2 (Hughes et al., 1986; Diab and El-Bahy, 2008), Vero (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008; Diab and El-Bahy, 2008; Saadatnia et al., 2010); and HeLa (Hughes et al., 1986; Ashburn et al., 2000; Chatterton et al., 2002; Degirmenci et al., 2011). Optimizing a mass production technique means balancing factors such as the multiplication rate of the host cells and parasites, as well as, their generation periods un-

Table 1
Kinetics of Vero cell growth maintained in serum-free medium in 25 cm² T-flasks with different initial cell concentration.

Initial Vero cell concentration/25 cm ² T-flasks	Percent of cell confluence in monolayer				
	Time of incubation (h) at 37 °C				
	24	48	72	96	120
1×10^5	20	30	50	60	*
5×10^5	50	70	80	90	100
1×10^6	70	90	95	100	100
5×10^6	80	100	100	*	*

* Excess of cell confluence and/or cell death.

Table 2

Amount of viable tachyzoites obtained from 25-cm² T-flask supernatants after Vero cell infection with indicated number of *T. gondii* RH strain.^a The results were expressed by tachyzoite counts in 5 mL of medium obtained during 10 days (average of three 25-cm² T-flasks). The experiments were done twice.

Amount of tachyzoites added to 25 cm ² T-flasks ^a	Amount of viable tachyzoites released × 10 ⁶ /mL (tachyzoite multiplication after initial inoculum)									
	Days post-infection									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.7 × 10 ⁶	0	0	0.1	0.2	1.3	11.2	20	20	11	^b
1.5 × 10 ⁶	0.01	0.05	0.05	0.1	0.5	1.2	21	10	10	^b
3.0 × 10 ⁶	0.01	0.02	0.08	0.2	0.9	6.2	20	17	^b	^b

^b Non-viable parasites.

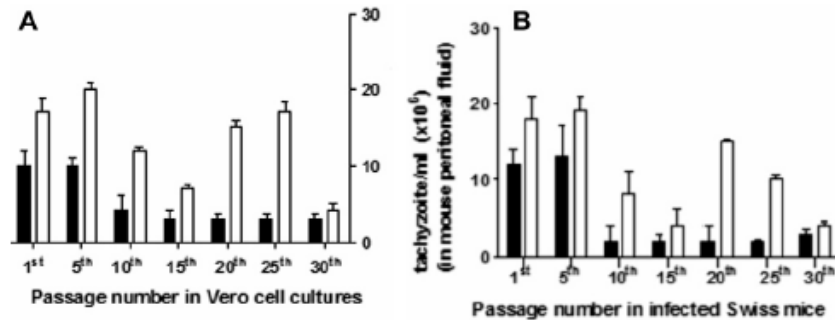


Fig. 1. *In vivo* infectivity experiments: number of *T. gondii* tachyzoites recovered per mL of mouse peritoneal fluids after 4 days post-infection. (A) Groups 1A, black bars; and 1B, white bars received 1×10^5 and 1×10^6 tachyzoites/animal, respectively. The parasites were collected from supernatants of Vero cell cultures in serum-free medium. (B) Control groups, 2A (black bars) and 2B (white bars) received the same data and scheme tachyzoites collected from other infected mice. Tachyzoites from cell cultures were collected at indicated passages. The values are expressed as mean \pm SE of two mice per group. The experiments were done twice at different times and the results were similar. The Student's *t* and *F* tests revealed that Groups 1A and 2A, as well as, Groups 1B and 2B are statistically similar at $P < 0.05$.

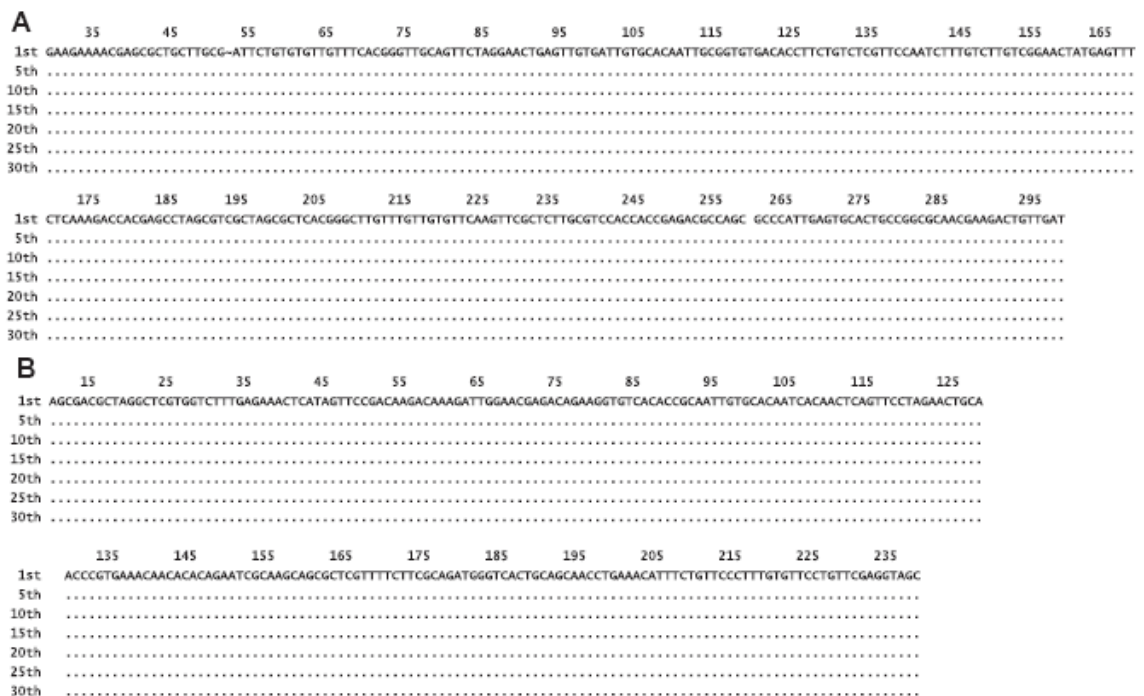


Fig. 2. *T. gondii*, RH strain. Nucleotide sequence from SAG 2 gene located near the 5' end side (A) and on the opposite side, 3' end (B). Multiple sequence alignment analysis of the PCR products amplified from DNA extracted from tachyzoites collected at each five Vero cell culture passages (1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th).

Table 3
TLA production. Comparison of the conventional method using tachyzoite sonication with glass bead lysis (SIGMA – 150:212 microns). The methodology was assayed using 1×10^7 cell culture tachyzoites/mL and is described in detail in the Section 2.

Toxoplasma lysate antigen production	Protocols for tachyzoite lysis	
	Sonication	Glass beads
Lysis/period	10 cycles/5 min	8 cycles/4 min
Lysis intervals (min)	2	2
% Lysis	80–90	100

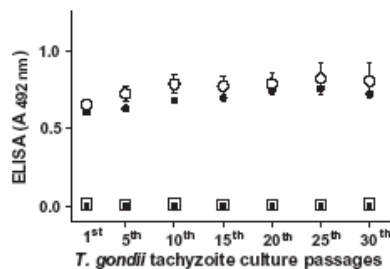


Fig. 3. Immunological reactivity determined by ELISA using TLA (2 µg/mL) as antigen produced from culture tachyzoites collected at the 1st, 5th, 10th, 15th, 20th, 25th and 30th Vero cell culture passage in serum free-medium. The results represent the mean value of the absorbance of each serum sample at an optical density of 492 nm (ELISA A492 nm) obtained from: 10 sera from chronically infected patients (hollow circles); 10 sera from normal individuals without toxoplasmosis (hollow squares); three pooled positive mouse sera (full circles); and three pooled negative mouse sera (full squares) ±SE.

der given culture conditions (Hughes et al., 1986). For this purpose, this study evaluated whether tachyzoites growing in Vero cell maintained in VP SFM AGT medium, after many passages, are able to maintain the same antigenic proprieties as those maintained in experimental mice. The results showed no difference between tachyzoites from infections in mice or cell cultures. The optimization of production of *T. gondii* in Vero cells in serum-free medium was successful and demonstrated that this antigen is able to detect IgG antibodies anti-*T. gondii* maintaining the immunogenic and antigenicity capacity after 30 passages.

The best amount of harvested tachyzoites in Vero cell cultures was 2.1×10^7 after 7 days post-infection, which used 1.5×10^6 parasites as inoculum. These results showed that the infection in Vero cultivated in serum-free medium was successful in propagating the parasite *in vitro* for many passages without any loss of infectivity or decrease of the rate of multiplication.

Regarding the viability of tachyzoites in various passages in cell cultures, our data are in agreement with other studies showing that tachyzoites produced by serial passage in HeLa cell cultures had acceptable viability but did not significantly differ in low and high pass harvests (Ashburn et al., 2000). Thus, the parasites could be used both from early and later pass numbers, confirming the diagnostic usefulness of the tachyzoites produced.

One of our main questions was to know whether in several continued passages, immunogenic progressive loss could occur. The nucleotide sequences studied were the same between the different passages, which could mean no change in its viability in the lysate antigen.

Although these results are promising for cell cultures to replace animal culture in the routine production of tachyzoites, particular pitfalls should be noted for all procedures used in cell cultures. Strict protocols should be followed to prevent contamination and aseptic techniques in class II cabinets. Stock cell cultures should be maintained separately from infected cell lines. A liquid nitrogen

storage system is required to restart the process when there is contamination or a complete failure of the cell-culture system to produce tachyzoites (Harmer et al., 1996).

Finally this study is in agreement with others that showed that antigen production by cell culture has clear ethical advantages and economic benefits (Hughes et al., 1986; Ashburn et al., 2000). Moreover, the use of culture media formulated without any human or animal derived components, designed for serum-free growth of cell lines successfully produced tachyzoites.

Acknowledgments

This study was supported by Grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil), Proc-08/09311-0. C.S.M. was supported by fellowships from FAPESP and T.A.C.S. was supported by fellowships from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). V.L.P.C. was supported by a fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) Produtividade em Pesquisa, Proc. 301531/2009-9. AcademicEnglishSolutions.com proofread the text.

References

- Ahn, M.H., Hyun, K.H., Kang, J.O., Min, D.Y., 1997. Partially purified *Toxoplasma gondii* antigens by immunoaffinity chromatography. *Korean Journal of Parasitology* 35, 251–258.
- Ashburn, D., Evans, R., Chatterton, J.M.W., Joss, A.W.L., Ho-Yen, D.O., 2000. *Toxoplasma* dye test using cell culture derived tachyzoites. *Journal of Clinical Pathology* 53, 630–633.
- Bojar, I., Szymańska, J., 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* – state of the art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 17, 209–214.
- Buddhirongawatr, R., Tungsudjai, S., Chaichoune, K., Sangloun, C., Tantawiwattananon, N., Phonaknguen, R., Sukthana, Y., 2006. Detection of *Toxoplasma gondii* in captive wild felids. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 3, 15–17.
- Bunetel, L., Guerin, J., Andre, P., Roberts, R., Deunff, J., 1995. Calibration of an *in vitro* assay system using a non-adherent cell line to evaluate the effect of a drug on *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 25, 699–704.
- Calico, I., Caballero, E., Martinez, O., Arcalis Arce, L., Llopart, L., Ocana, I., Juste, C., 1991. Isolation of *Toxoplasma gondii* from immunocompromised patients using tissue culture. *Infection* 19, 340–342.
- Chatterton, J.M., Evans, R., Ashburn, D., Joss, A.W., Ho-Yen, D.O., 2002. *Toxoplasma gondii* *in vitro* culture for experimentation. *Journal of Microbiological Methods* 51, 331–335.
- Colombo, F.A., Vidal, J.E., Penalva de Oliveira, A.C., Hernández, A.V., Bonasser-Filho, F., Nogueira, R.S., Focaccia, R., Pereira-Chioccola, V.L., 2005. Diagnosis of cerebral toxoplasmosis in AIDS patients in Brazil: importance of molecular and immunological methods using peripheral blood samples. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5044–5047.
- Costa-Silva, T.A., Meira, C.S., Ferreira, I.M., Hiramoto, R.M., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology* 120, 227–234.
- Değirmenci, A., Döşkaya, M., Caner, A., Çiçek, C., Korkmaz, M., Gürüz, Y., Uner, A., 2011. *Toxoplasma gondii* RH Ankara: production of evolving tachyzoites using a novel cell culture method. *Experimental Parasitology* 128, 1–8.
- Derouin, F., Mazeron, M.C., Gann, Y.J.F., 1987. Comparative study of tissue culture and mouse inoculation methods for demonstration of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 25, 1597–1600.
- Diab, M.R., El-Baby, M.M., 2008. *Toxoplasma gondii*: virulence of tachyzoites in serum free media at different temperatures. *Experimental Parasitology* 118, 75–79.
- Domzig, W., Seguela, J.-P., Binz, H., 1993. A method to obtain large quantities of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with extreme purity. *The Journal of Parasitology* 79, 613–615.
- Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal for Parasitology* 7, 1019–1024.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad, P.A., Patton, S., Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology* 26, 190–196.
- Evans, R., Chatterton, J.M., Ashburn, D., Joss, A.W., Ho-Yen, D.O., 1999. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18, 879–884.
- Ferreira, I.M., Vidal, J.E., Costa-Silva, T.A., Meira, C.S., Hiramoto, R.M., Penalva de Oliveira, A.C., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. *Toxoplasma gondii*: genotyping of strains from Brazilian AIDS patients with cerebral toxoplasmosis by multilocus PCR-RFLP markers. *Experimental Parasitology* 118, 221–227.

- Ferreira-da-Silva, M.F., Rodrigues, R.M., de Andrade, E.F., de Carvalho, L., Gross, U., Lüder, C.G., Barbosa, H.S., 2009. Spontaneous stage differentiation of mouse-virulent *Toxoplasma gondii* RH parasites in skeletal muscle cells: an ultrastructural evaluation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 196–200.
- Fichera, M.E., Bhopale, M.K., Roos, D.S., 1995. *In vitro* assays elucidate peculiar kinetics of clindamycin action against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39, 1530–1537.
- Fichera, M.E., Roos, D.S., 1997. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature* 390, 407–409.
- Fishbein, D.B., Yenne, K.M., Dreesen, D.W., Teplis, C.F., Mehta, N., Briggs, D.J., 1993. Risk factors for systemic hypersensitivity reactions after booster vaccinations with human diploid cell rabies vaccine: a nationwide prospective study. *Vaccine* 14, 1390–1394.
- Frazzatti-Gallina, N.M., Mourão-Fuches, R.M., Paoli, R.L., Silva, M.L., Miyaki, C., Valentini, E.J., Raw, I., Higashi, H.G., 2004. Vero-cell rabies vaccine produced using serum-free medium. *Vaccine* 23, 511–517.
- Froud, S.J., 1999. The development, benefits and disadvantages of serum-free media. *Developments in Biological Standardization* 99, 157–166.
- Furesz, J., Fanok, A., Contreras, G., Becker, B., 1989. Tumorigenicity testing of various cell line substrates for production of biological. *Developments in Biological Standardization* 70, 233–243.
- Garcia, J.L., Gennari, S.M., Navarro, I.T., Machado, R.Z., Sinhorini, I.L., Freire, R.L., Marana, E.R., Tsutsui, V., Contente, A.P., Begale, L.P., 2005. Partial protection against tissue cyst formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 129, 209–217.
- Gail, M., Gross, U., Bohne, W., 2004. Transferrin receptor induction in *Toxoplasma gondii*-infected HFF is associated with increased iron-responsive protein 1 activity and is mediated by secreted factors. *Parasitology Research* 94 (3), 233–239.
- Harmer, C., Hassl, A., Kreinecker, S., Aspöck, H., 1996. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. *Journal of Microbiological Methods* 27, 225–228.
- Hass, A., Aspöck, H., 1990. A rapid and simple method of purification of *Toxoplasma gondii* trophozoites originating from tissue culture for use in the indirect immunofluorescent antibody test. *Zentralblatt für Bakteriologie* 272, 509–513.
- Howe, D.K., Honoré, S., Derouin, F., Sibley, L.D., 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 1411–1414.
- Hughes, H.P., Hudson, L., Fleck, D.G., 1986. *In vitro* culture of *Toxoplasma gondii* in primary and established cell lines. *International Journal of Parasitology* 4, 317–322.
- Khan, A., Fux, B., Su, C., Dubey, J.P., Darde, M.L., Ajioka, J.W., Rosenthal, B.M.L., Sibley, D., 2007. Recent transcontinental sweep of *Toxoplasma gondii* driven by a single monomorphic chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 14872–14877.
- Lee, E.J., Heo, Y.M., Choi, J.H., Song, H.O., Ryu, J.S., Ahn, M.H., 2008. Suppressed production of pro-inflammatory cytokines by LPS-activated macrophages after treatment with *Toxoplasma gondii* lysate. *Korean Journal of Parasitology* 46, 145–151.
- Lynch, M.L., Malagueño, E., Lynch, L.F., Ferreira, S., Stheling, R., Oréfiçe, F., 2009. Anti-*Toxoplasma gondii* secretory IgA in tears of patients with ocular toxoplasmosis: immunodiagnostic validation by ELISA. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 818–822.
- Macre, Mde.S., Pires, M., Meireles, L.R., Angel, S.O., Andrade Jr., H.F., 2009. Serology using rROP2 antigen in the diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51, 283–288.
- Mavin, S., Joss, A.W., Ball, J., Ho-Yen, D.O., 2004. Do *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites evolve during continuous passage? *Journal of Clinical Pathology* 57, 609–611.
- Meira, C.S., Costa-Silva, T.A., Vidal, J.E., Ferreira, I.M., Hiramoto, R.M., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Journal of Medical Microbiology* 57, 845–850.
- Molestina, R.E., El-Guendy, N., Sinai, A.P., 2008. Infection with *Toxoplasma gondii* results in dysregulation of the host cell cycle. *Cell Microbiology* 10, 1153–1165.
- Monath, T.P., Fowler, E., Johnson, C.T., Balsler, J., Morin, M.J., Sisti, M., Trent, D.W., 2011. An inactivated cell-culture vaccine against yellow fever. *New England Journal of Medicine* 364, 1326–1333.
- Pereira-Chioccola, V.L., Vidal, J.E., Su, C., 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiology* 4, 1363–1379.
- Roos, D.S., Donald, R.G.K., Mourissette, N.S., Moulton, A.L.C., 1994. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods in Cell Biology* 45, 27–63.
- Saadatnia, G., Haj Ghani, H., Khoo, B.Y., Maimunah, A., Rahmah, N., 2010. Optimization of *Toxoplasma gondii* cultivation in VERO cell line. *Tropical Biomedicine* 27, 125–130.
- Sabin, A.B., 1941. Toxoplasmic encephalitis in children. *Journal of the American Medical Association* 116, 801–807.
- Sibley, L.D., Boothroyd, J.C., 1992. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. *Nature* 359, 82–85.
- Su, C., Zhang, X., Dubey, J.P., 2006. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of parasites. *International Journal of Parasitology* 36, 841–848.
- Tenter, A.M., Heckeroth, A.R., Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal of Parasitology* 30, 1217–1258.
- Toriniwa, H., Komiya, T., 2011. Comparison of viral glycosylation using lectin blotting with Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. *Vaccine* 29, 1859–1862.
- Verhofstede, C., Van Gelder, P., Rabaey, M., 1988. The infection stage-related IgG response to *Toxoplasma gondii* studied by immunoblotting. *Parasitology Research* 74, 515–520.
- Ware, P.L., Kasper, L.H., 1986. Strain Specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *American Society for Microbiology* 55, 778–783.
- Warren, J., Russ, S.B., 1948. Cultivation of *Toxoplasma* in embryonated egg an antigen derived from chorioallantoic membrane. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 67, 85–89.
- Xue, M.F., He, S.Y., Zhang, J., Cui, Y.L., Yao, Y., Wang, H.X., 2008. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of *Toxoplasma* multiantigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Experimental Parasitology* 119, 352–357.

8.3 Anexo 3. Artigo submetido à revista Acta Tropica; Título: Toxoplasma gondii antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated Vero cell maintained in serum free medium. Título: Immunization with Excreted/Secreted Proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against Toxoplasma gondii infection

Elsevier Editorial System(tm) for Acta Tropica
Manuscript Draft

Manuscript Number: ACTROP-D-12-00145

Title: Immunization with Excreted/Secreted Proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against Toxoplasma gondii infection

Article Type: Regular Articles

Keywords: Toxoplasma gondii, excreted-secreted antigens, cellular response, humoral response.

Corresponding Author: Dr. Vera Lucia Pereira-Chioccola, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto Adolfo Lutz

First Author: Thaís Alves Costa-Silva

Order of Authors: Thaís Alves Costa-Silva; Monamaris M Borges ; Cynthia S Galhardo; Vera Lucia Pereira-Chioccola, PhD

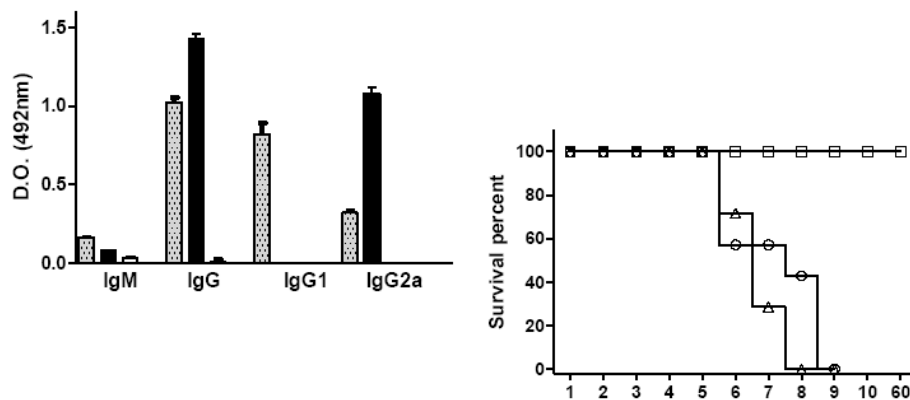
Abstract: This study investigated how Toxoplasma gondii excretory-secretory antigens (ESA) stimulate the humoral and cellular response in infected hosts. We evaluated IFN- γ , IL-4, TNF- α and IL-10 levels as well as humoral response of ESA-immunized AS/n mice. T. gondii lysate antigen (TLA), a crude antigen, was used in all experiments to evaluate the immune response. Chronic infected and normal mice were used as control groups, since the immune response is well known. The challenge experiments showed the parasitemia levels, determined by real time PCR and survival index. The normal group had early mortality and higher parasitemia than the ESA-immunized mouse group. In addition the chronic infected group had no parasitemia and mortality. Both ESA-immunized and chronic infected mice produced a similar level of IFN- γ and TNF- α . ESA, also, activated cells from immunized mice to produce IL-4 and IL-10 in lower levels compared to those cells collected from chronic mice but sufficient to modulate IFN- γ and TNF- α synthesis, preventing an excessive immune response that could cause extensive inflammation and host tissue damage. After 6 weeks, ESA-immunized mice had low IgM and IgG2a levels and high IgG1 levels. Purified anti-ESA IgG were able to opsonize tachyzoites (RH strain), and mice that received these parasites had lower parasitemia, and mortality was delayed 48 hours, compared with the same results from those receiving parasites opsonized with purified normal IgG. The protective immune response in the chronic infection was efficient in protecting the host against infection caused by other T. gondii strain and ESA participate in stimulating the host humoral and cellular responses. The immunization assays showed that ESA can elicit high IgG1, IFN- γ and TNF- α production and, a lower amount of IgM, IgG2, IL-10 and IL-4, suggesting a mixed Th1/Th2 profile.

Immunization with Excreted/Secreted Proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection

Thais Alves Costa-Silva¹, Monamaris Marques Borges², Cynthia Soares Galhardo² and Vera Lucia Pereira-Chioccola^{1*}

1. Laboratorio de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz; 2. Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

This article investigated how *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens stimulate the humoral and cellular response in infected hosts.



Highlights

- We studied *T. gondii* excretory-secretory antigens (ESA) and host immune response.
- Cellular and humoral responses of ESA-immunized AS/n mice were investigated.
- ESA elicit high IgG1, IFN- γ , TNF- α levels and lower amount of IgM, IgG2, IL-10, IL-4.
- Mice infected with opsonized parasites had low parasitemia, and mortality.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Immunization with Excreted/Secreted Proteins in AS/n mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection

Thais Alves Costa-Silva¹, Monamaris Marques Borges², Cynthia Soares Galhardo² and Vera Lucia Pereira-Chioccia^{1*}

¹Laboratorio de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz; ²Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan; São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author: Laboratorio de Parasitologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 351 8 andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil. Phone (55 11) 3068 2991. Fax (55 11) 3068 2890. E-mail: pchioccia@gmail.com

Abstract

1
2 This study investigated how *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens (ESA)
3 stimulate the humoral and cellular response in infected hosts. We evaluated IFN- γ , IL-4 TNF-
4 α , and IL-10 levels as well as humoral response of ESA-immunized AS/n mice. *T. gondii*
5 lysate antigen (TLA), a crude antigen, was used in all experiments to evaluate the immune
6 response. Chronic infected and normal mice were used as control groups, since the immune
7 response is well known. The challenge experiments showed the parasitemia levels,
8 determined by real time PCR and survival index. The normal group had early mortality and
9 higher parasitemia than the ESA-immunized mouse group. In addition the chronic infected
10 group had no parasitemia and mortality. Both ESA-immunized and chronic infected mice
11 produced a similar level of IFN- γ and TNF- α . ESA, also, activated cells from immunized
12 mice to produce IL-4 and IL-10 in lower levels compared to those cells collected from chronic
13 mice but sufficient to modulate IFN- γ and TNF- α synthesis, preventing an excessive immune
14 response that could cause extensive inflammation and host tissue damage. After 6 weeks,
15 ESA-immunized mice had low IgM and IgG2a levels and high IgG1 levels. Purified anti-ESA
16 IgG were able to opsonize tachyzoites (RH strain), and mice that received these parasites had
17 lower parasitemia, and mortality was delayed 48 hours, compared with the same results from
18 those receiving parasites opsonized with purified normal IgG. The protective immune
19 response in the chronic infection was efficient in protecting the host against infection caused
20 by other *T. gondii* strain and ESA participate in stimulating the host humoral and cellular
21 responses. The immunization assays showed that ESA can elicit high IgG1, IFN- γ and TNF- α
22 production and, a lower amount of IgM, IgG2, IL-10 and IL-4, suggesting a mixed Th1/Th2
23 profile.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Keywords: *Toxoplasma gondii*, excreted-secreted antigens, cellular response, humoral response.

1. Introduction

1
2 *Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that is of major
3
4 significance in veterinary and public health (Dubey, 1998; Hill and Dubey, 2002). Human
5
6 infection is generally asymptomatic and commonly acquired by ingestion of undercooked,
7
8 raw meat containing tissue cysts, as well as water or food contaminated with oocysts excreted
9
10 in the feces by the host (Dubey, 2008; Elmore et al., 2010). These parasites can, also be
11
12 transmitted in a vertical manner, when a mother is infected during pregnancy, causing severe
13
14 neonatal malformations and ocular complications in the fetus (Bojar and Szymańska, 2010).
15
16 Transmission also occurs during organ transplantation from seropositive donors to
17
18 seronegative recipients (Castagnini et al., 2007). Around 10-20% of cases of *T. gondii*
19
20 infection are symptomatic as ocular and disseminated forms. In immunodeficiency disorders
21
22 such as AIDS, the low levels of CD4+ T cells facilitate the parasite proliferation and the
23
24 symptomatic disease such as cerebral toxoplasmosis (Vidal et al., 2005; Pereira-Chiocola et
25
26 al., 2009). Economically, toxoplasmosis is also important, since infection during pregnancy,
27
28 especially in sheep, often results in abortion, representing considerable economic loss
29
30 (Buxton and Innes, 1995; Buxton, 1998).
31
32
33
34
35
36
37

38 *T. gondii* infection induces a systemic immune response. During acute infection,
39
40 tachyzoites invade any nucleated cell and disseminate rapidly throughout the body (Noor et
41
42 al., 2010). It is known that during the primary *T. gondii* infection, the immunocompetent hosts
43
44 induce a cellular and humoral immune response, resulting in lifelong immunity against
45
46 reinfection. In experimental infections, *T. gondii* stimulates Th1 immune response producing
47
48 interferon-gamma (IFN- γ) and other cytokines, which activate macrophage functions
49
50 (Gazzineli et al., 1992; Denkers and Gazzinelli, 1998). IFN- γ and tumor necrosis factor-alpha
51
52 (TNF- α) are important for controlling tachyzoite replication during both acute and chronic
53
54 phases of infection (Johnson, 1992; Scharon-Kersten et al., 1996). In contrast, interleukin-10
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 (IL-10) and IL-12 seem to be crucial in the initial phase of infection and less important during
3 chronic toxoplasmosis (Yap and Sher, 2000; Denkers, 2003; O'Garra and Vieira, 2007).
4 Moreover the IL-4 synthesis can be inhibited by the presence of IL-12, produced by
5 macrophages, after activation with tachyzoite products (Sender et al., 1993; Ma et al., 1996,
6
7 Denkers and Gazzinelli, 1998).
8
9

10
11 The active secretion of antigens by *T. gondii* is an important part of the low-grade
12 stimulation or boosting of the immune system, as these antigens have been shown to stimulate
13 antibodies as well as a T-cell response (Denkers and Gazzinelli, 1998; Carruthers, 2002).
14 Excretory-secretory antigens (ESA) produced by tachyzoites, represent the majority of the
15 circulating antigens in sera and cerebrospinal fluid from hosts in active toxoplasmosis
16 (Cesbron-Delauw and Capron, 1993; Prigione et al., 2000; C er ede et al., 2005; Meira et al.,
17 2008, Meira et al., 2011) and contributes to stimulation of the humoral and cellular immune
18 responses to control infection (Zenner et al., 1999; Costa-Silva et al., 2008). The usefulness of
19 ESA as antigen in the serological diagnosis of toxoplasmosis was recently shown (Meira et
20 al., 2008; Ara ujo and Ferreira, 2010; Meira et al., 2011; Mattos et al., 2011). ESA was able to
21 distinguish sera from patients with cerebral or ocular toxoplasmosis from asymptomatic
22 individuals.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 A previous study showed that anti-ESA antibodies from immunized mice were
42 reactive with a crude tachyzoite antigen and bonded on the parasite surface, especially on the
43 apical region. In addition, challenged susceptible mice with RH strain, a lethal *T. gondii*
44 strain, had a reduction in tachyzoite levels in blood and a delay in mortality rate. Anti-ESA
45 antibodies agglutinate and kill tachyzoites *in vitro* through interactions by complement and
46 cellular pathways. (Costa-Silva et al., 2008). Since the immune activation by ESA has not
47 been elucidated, we investigate how excreted/secreted antigens stimulate the humoral and
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

cellular response in infected hosts. The levels of IFN- γ , IL-4, TNF- α , and IL-10 were evaluated, as well as the humoral response of AS/n mice immunized with ESA.

2. Material and Methods

2.1. Mice, *T. gondii* and culture cells

Four-week-old female AS/n inbred mice were used to maintain *T. gondii* strains and for immunization experiments. AS/n inbred mice were chosen for immunization experiments since they have been shown to be susceptible to *T. gondii* infection (Costa-Silva et al., 2008). All mice used in these experiments were obtained from the Laboratory Animal Center of Instituto Adolfo Lutz. During the experiments, the mice were equally maintained in the Laboratory Animal Center in Experimentation.

Vero cell cultures in serum-free medium (obtained from Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil) were grown in VP SFM AGT (Gibco-Life Technologies) supplemented with 4 mM L-glutamine and 2.5 μ g/mL gentamicin (Costa-Silva et al., 2012).

T. gondii RH strain tachyzoites were maintained in mice ascites by intraperitoneal (i. p.) inoculations and Vero cell cultures in serum-free medium. Tachyzoites from both mice and/or cell cultures were collected in phosphate-buffered saline (PBS), pooled and centrifuged at 2,000 g for 10 min. Next the parasite suspension was washed twice, counted, suspended in PBS, at different concentrations for infecting other tissue cultures or groups of mice. The same procedure was followed to prepare antigens for all experiments. *T. gondii* ME-49 strain cysts were obtained from mice previously infected thirty days prior.

This study was performed according to recommendations of the “Colegio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA), and the institutional review board of the Ethics Committee of both institutions approved this study.

2.2. Antigens

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ESA were recovered from Vero cell culture in serum-free medium supernatants infected with tachyzoites as previously described (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Briefly, tissue cell cultures were infected with 1×10^7 tachyzoites/mL. After 48h, culture supernatants were harvested, filtered through a 0.22 μm -pore-size filter, and 10 $\mu\text{g/mL}$ of a cocktail of protease inhibitors were added. The supernatants, referred to as ESA were concentrated in a Speed Vac (RC 10.09-Jouan) for 4 h and dialyzed against PBS overnight at 4°C.

T. gondii lysate antigen (TLA) was prepared as described before (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012). Tachyzoites from Vero cell cultures in serum-free medium were purified by filtration. Then, parasites were washed, suspended in PBS and lysed using glass beads by vortex for 8 cycles per 4 minutes with 2-minute intervals. Parasite extract was centrifuged (3,000 g) and dissolved in 0.3 M NaCl.

Protein concentrations of each batch of ESA or TLA were determined at 280 nm by NanoDrop ND100 (Thermo Scientific). TLA was used as antigens in ELISA and antigen-specific lymphoproliferative responses. ESA was used in immunizations.

2.3. Experimental mouse groups, immunizations, challenge

Different groups of 5 female AS/n mice were immunized as previously described (Costa-Silva et al., 2008). Immunizations consisted of 4 i. p. injection doses of 20 μg of ESA adsorbed to 0.5 mg of $\text{Al}(\text{OH})_3$ (alum) given at 0, 2, 4 and 6 weeks. These groups were designated as the “*ESA-immunized group*”. PBS (0.2 mL) plus alum were injected into another 5 female mice that were designated as the “*normal group*”. Groups of 5 female mice were orally inoculated with 10 fresh brain cysts obtained from another mice group chronically infected with *T. gondii* (ME-49 strain). These groups were designated as the “*chronic infected group*”. One week after the last immunization, blood samples were collected from the tails of

1 mice of ESA-immunized and normal groups for determination of specific antibodies, as well
2 as, opsonization experiments. Sera from the chronic infected mouse group were collected 50
3 days after *T. gondii* infection. Spleens were collected from 3 mice per group under aseptic
4 conditions for cytokine assays. The challenge experiments were done twice. One week after
5 the last immunization, mice were challenged i. p. with 1×10^3 tissue culture tachyzoites of
6 RH strain.
7
8
9

10 2.4. Spleen cell cultures and cytokine assays

11 Spleens were removed from 3 mice per group (*ESA-immunized, chronic infected and*
12 *normal*) under aseptic conditions. Preparations were obtained by crushing spleens in PBS (pH
13 7.2). Next, splenocyte suspensions were washed twice with PBS and erythrocytes were lysed
14 with ACK buffer (0.15M NH_4Cl ; 10 mM KHCO_3 ; 0.1M Na_2EDTA) for 5 min. After washing
15 two times with PBS by centrifugation at 4 °C for 10 min, the cells were resuspended in RPMI
16 1640 medium supplemented with penicillin, (50 U/mL), streptomycin (50 mg/mL) and 10%
17 heat-inactivated fetal calf serum. The viability of the cells used in the experiments was always
18 higher than 85%, as measured by trypan blue exclusion (Sigma). The cells were then plated at
19 a density of 5×10^6 cells per well in triplicate into 24-well culture plates in a final volume of
20 500 μL . Cells were then cultured with 5 $\mu\text{g/mL}$ of TLA for IFN- γ /TNF- α ; and 25 $\mu\text{g/mL}$ IL-
21 10/IL-4. Alternatively, as control for IFN- γ , IL-10 and IL-4 experiments, splenocytes were
22 stimulated with 2 $\mu\text{g/mL}$ of Concanavalin A (ConA) (Sigma) and for TNF- α , 2 $\mu\text{g/mL}$ of *E.*
23 *coli* lipopolysaccharides (LPS) (Sigma-O11:B4). Culture medium was used in all experiments
24 as negative control wells. The cultured splenocytes were maintained at 37 °C in a 5% CO_2
25 incubator and supernatants were collected after 20 to 72 h of stimulation. The supernatant was
26 analyzed after 20h for TNF α ; 48 hr for IL-4 and IL-10; and 72 h for IFN- γ activities. The
27 cytokine concentrations were determined using a commercial ELISA kit according to the
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

manufacturer's instructions (eBioscience, USA). The limit of sensitivity of the assays was IFN- γ , 62.5 pg/mL; TNF- α , 31.25 pg/mL; IL-4, 7.8 pg/mL; and IL-10, 62.5 pg/mL. The results were expressed as mean and standard error (SE) of the amount of each cytokine (in pg/mL) in three independent experiments.

2.5. Determination of anti-ESA antibodies

The antibody levels from ESA-immunized, chronic infected and normal groups were determined as described before (Costa-Silva et al., 2008), using TLA as antigen in 96-well ELISA plates (flat bottom, low binding, Corning). Each plate was incubated over night at 4 °C with TLA at a concentration of 1 μ g/mL dissolved in 0.1 mL of 0.1 M NaHCO₃, pH 8.5. Unbound antigens were removed by washing the plates with PBS, pH 7.2 containing 0.05% Tween 20. The free binding sites were blocked by treating the wells with 5% skim milk-PBS. After 30 min, each serum sample in serial dilution in 5% skim milk-PBS was incubated for 60 min at 37 °C. After five washes with PBS-Tween 20, the wells were incubated for another 60 min at 37 °C with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM, IgG, anti-IgG1 or anti-IgG2a (Sigma) diluted 1:8000, 1:4,000, 1:1000 or 1:2000, respectively, in 5% skim milk-PBS. After a new wash cycle with PBS-Tween 20, substrate solution (0.1 M citric acid, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.05% *o*-phenylenediamine, 0.1% H₂O₂) was added to each well and the plates were left to stand at room temperature in the dark for 30 min. Color development was stopped by adding 50 μ L of 4 N H₂SO₄, and the absorbance was measured with an ELISA reader (Labsystems-Multiscan) with a 492-nm filter. The assays for determination of antibody levels were carried out in duplicate. The values were represented by arithmetic mean and SE of absorbance of each serum sample from 5 mice per group.

2.6. *IgG purification and opsonization experiments.*

1
2 Pooled sera collected from each mice group (ESA-immunized, chronic infected and
3 normal) were used to purify IgG antibodies. Sera were diluted twice in 20 mM sodium
4 phosphate passed through protein A agarose columns (HiTrap- 1 mL, Amersham Biosciences)
5 previously equilibrated in the same buffer. After the column's washing with 10 column
6 volumes of the buffer, the antibodies were eluted with 0.1 M citric acid (pH 3.6). Each eluted
7 fraction contained 500 μ L and was immediately neutralized by adding 50 μ L of 1.5 M
8 TrisHCl (pH 8.8). The eluted material was dialyzed twice against 1 liter of PBS. The amount
9 of protein was estimated by the absorbance at 280 nm in NanoDrop ND100. Purified IgG
10 from each group, at concentration of 2.5 μ g were incubated with 5 x 10³ tachyzoites (RH
11 strain) at 37°C for 90 min. Next, the parasites were used to infect 3 groups of five A/Sn mice.
12 The first group received parasites incubated with purified IgG from ESA-immunized mice.
13 The second group received parasites incubated with purified IgG from chronic infected; and
14 the last, from normal mice. All mice received, i. p., a mixture containing antibody (0.5 μ g)
15 plus tachyzoites (1 x10³).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

2.7. *Parasitemia and survival index*

41 Parasitemia and survival index were monitored in challenge and passive transfer experiments.
42 Parasitemia were determined by real-time PCR in DNA extracted from blood samples (20 μ L)
43 collected daily from the tails, post-infection. The survival periods were recorded daily until all
44 mice were dead. Both experiments were conducted twice to confirm the results.
45
46
47
48
49
50
51
52

2.8. *DNA purification and real-time PCR*

53 Blood samples were added to a tube containing 200 μ L of a lysis buffer (10 mM Tris-HCl,
54 pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% *N*-laurilsarcoyl, 100 μ g/mL proteinase K). The
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 DNA extractions were done by PureLink Genomic DNA Kits (Qiagen), according to the
2 manufacturer's instructions. DNA pellets were dissolved in ultra-pure water. DNA
3 concentrations and purity were determined by the ratio of O. D. at 260 and 280 nm in
4 NanoDrop ND100.
5
6
7
8

9 Each real-time PCR was carried out as described before (Mesquita et al., 2010) with
10 an Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System in a final volume of 20 μ L. The samples
11 or DNA controls (3 μ L) were added to a reaction mixture containing 10 μ L of 2X TaqMan
12 Universal PCR Master Mix and 1 μ L of the "Assay Mix" that included the forward primer, 18
13 μ M (5'-CAAGCAGCGTATTGTCGAGTAGAT-3'); the reverse primer, 18 μ M (5'-
14 GCGTCTCTTTCATTCCCACATTTT-3'); and the TaqMan MGB probe FAM dye-labeled, 5
15 μ M (5'-CAGAAAGGAACTGCATCCGTT-3'). Amplification runs contained two negative
16 controls (ultrapure water and a negative DNA for toxoplasmosis) and one positive control
17 (DNA extracted from RH strain). The thermal profile included a two-minute, 50 $^{\circ}$ C step for
18 optimal AmpliErase UNG activity and 95 $^{\circ}$ C for 10 min. Next, 40 cycles were performed at
19 95 $^{\circ}$ C for 15 sec and 60 $^{\circ}$ C for 1 min. The results were expressed in the cycle threshold value
20 (C_T) that indicated the quantity of target gene at which the fluorescence exceeds a preset
21 threshold, and was automatically determined by the equipment. The concentrations of DNA
22 were previously standardized (Mesquita et al., 2010; Reimão et al., 2011) correlating the C_T
23 value and known concentrations of tachyzoites maintained in culture.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 2.9. Statistical analysis

52 The comparisons between experimental groups (ESA-immunized, chronic infected
53 and normal) were statistically evaluated by GraphPad Prisma 5.0 (San Diego, CA). The
54 coefficient of similarity between both groups was calculated by Unpaired Student's *t*-Test
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(two-tailed) with a 95% confidence interval. Differences were considered statistically significant when p value was <0.05 .

3. Results

We investigated whether ESA could trigger an immune response capable of recognizing all tachyzoite antigens. Thus, TLA, which is a crude antigen, was used in all experiments to evaluate the immune response of ESA-immunized mice. As such immune response is well known in infected and normal mice (Gazzinelli et al., 1992; Denkers and Gazzinelli, 1998); consequently, they were used as control groups.

3.1. ESA immunization reduces parasitemia and delays mortality of mice infected with a lethal virulent *T. gondii* strain

Firstly, the challenge experiments were made to determine the capacity of ESA to trigger a protective immune response against *T. gondii* infection. The data were compared with the immune response developed by the chronic infection where different antibodies are produced. The results were also compared to the normal mice that received only alum plus PBS. The three groups of mice were infected i.p. with a lethal and highly virulent *T. gondii* strain (1,000 tissue culture-derived tachyzoites of RH strain). Parasitemia levels were estimated daily by real-time PCR of DNA extracted from pooled blood obtained from five mice per group at day 4-8 post-infection.

Figure 1A shows the parasitemia levels. No parasite in the blood was observed after challenge in chronic infected mice re-infected with RH strain. A partial reduction of parasitemia was observed in ESA-immunized mice compared to that of normal mice. The mortality rates of these groups were also investigated (Figure 1B). All chronic mice re-infected with the RH strain survived more than 60 days after the re-infection. Even though

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

ESA-immunized and normal groups of mice were being challenged with a lethal and virulent *T. gondii* dose, the mortality of the ESA-immunized mice was delayed by 24 hours compared to the normal group.

3.2. Cytokine production from splenocytes after TLA stimulation *in vitro*.

The immunopathology of *T. gondii* infection is characterized by the synthesis of different cytokines. The immune response to TLA is well known in infected and normal mice (Denkers and Gazzinelli, 1998). Splenocytes from ESA-immunized, chronic infected and normal mice were re-stimulated *in vitro* with TLA as antigen. In parallel, as controls, the same cells were treated with ConA or LPS in the absence of antigen. There was no proliferation in splenocyte cultures in the absence of antigen, only moderate proliferation after stimulation with LPS and high proliferation after ConA activation (data not shown). Next, the cytokine levels were evaluated. IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL10 activity was determined by ELISA in the supernatant of splenocytes collected from the three groups of mice (Figure 2). Splenocytes re-stimulated with TLA from ESA-immunized and chronic infected mice produced similar IFN- γ levels (1398 pg/mL and 1548 pg/mL, respectively). Nevertheless, cells from normal mice produced low IFN- γ amounts (1116 pg/mL). The differences between normal mice and ESA-immunized or infected mice were statistically significant at $p < 0.05$ (Figure 1A).

No differences in TNF- α levels were observed between cells collected from ESA-immunized and chronic infected (535 pg/mL and 511 pg/mL, respectively). However, both values were higher than those from normal mice cells (178 pg/mL). The differences between normal mice and infected or ESA-immunized mice were statistically significant at $p < 0.0005$ (Figure 2B).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

The results shown in Figure 2C indicate an enhancement of IL-4 levels produced from cells collected from chronic infected mice (9.2 pg/mL). On the other hand, cells collected from ESA-immunized mice produced very low IL-4 levels (2.3 pg/mL). The differences between both groups were statistically significant at $p < 0.05$. No IL-4 production was detected in splenocytes collected from normal mice.

IL-10 levels are shown in Figure 2D. Splenocytes of both ESA-immunized and chronic infected mice produced high levels of IL-10 (8096 pg/mL and 10,009 pg/mL respectively), while those from normal mice produced much lower levels (3198pg/mL). The differences between the three mouse groups were statistically significant at $p < 0.0005$.

3.3. Activation of the humoral response after immunization by ESA

In parallel, IgM and IgG (IgG1, IgG2a) levels were evaluated in the three groups of mice using TLA as antigen. Figure 3 shows low IgM levels in the three groups analyzed. At the same time, ESA-immunized and chronic infected mice produced high levels of IgG after 50 day of infection. Levels of IgG1 and IgG2a subclass antibodies were also estimated. Increased IgG1 levels were detected only in ESA-immunized mice. However, IgG2a was produced in high levels in the blood of chronic infected mice, but modest in ESA-immunized ones. Differences between IgG1 and IgG2a levels of ESA-immunized and chronic infected groups were statistically significant at $p < 0.005$. Neither IgM, IgG nor isotypes were detected in normal control animals.

3.4. Effect of anti-ESA antibody on development of parasitemia and mortality

To evaluate the effect of IgG anti-ESA- antibodies in the parasitemia and mortality of *T. gondii* infection, tachyzoites (RH strain) were incubated with purified IgG from ESA-immunized, chronic and normal mice and parasitemia and mortality were monitored daily

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(Figure 4). Mice challenged with tachyzoites opsonized with IgG anti-ESA or IgG from chronic infected had decreased parasitemia compared to those from normal mice (Figure 4A). However, the opsonization of parasites with IgG anti-ESA antibody was more effective, since in this group, the mortality was delayed in 48 hours compared to those challenged with tachyzoites IgG anti- *T. gondii* or normal IgG opsonized (Figure 4B).

4. Discussion

T. gondii pooled secreted/excreted proteins regulate the immune and inflammatory response eliciting an immune protective reaction involving humoral and cellular responses. Here, we investigated the participation of ESA in the immune response development and control of *T. gondii* infection. To better understand such a response capable of reducing the levels of tachyzoites in blood, groups of susceptible mice were immunized with ESA.

The challenge experiments showed the parasitemia levels, determined by real time PCR and the survival index. Immunization with ESA contributed to control the infection by reducing parasitemia and mildly increasing the animal's survival compared to normal mice. As expected, the normal group had greater parasitemia and earlier mortality than ESA-immunized group. In addition the chronic infected group had no parasitemia and mortality. These data suggest that the protective immune response in the chronic infection was efficient in controlling the host against infection caused by other *T. gondii* strain, and ESA participates in this process, which includes humoral and cellular responses.

IFN- γ and TNF- α levels were produced in similar concentrations by lymphocytes from ESA-immunized and chronic infected mice. These data suggest that during the active infection, when tachyzoites and consequently, ESA are released, the host immune system produce IFN- γ and TNF- α . Both cytokines were involved in the control of the infection. IFN- γ induces TNF- α synthesis in infected cells with intention to control *T. gondii* infection

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(Suzuki et al, 2000). Since both cytokines act synergistically during the infection, it is possible that ESA could help in the infection control. TNF- α plays an important role in the generation of reactive nitrogen intermediates as mediators of host resistance to early *T. gondii* infection (Denkers and Gazzinelli 1998; Vercammen et al., 2000; Leng et al., 2009; Dziadek et al, 2009; Rosemberg et al, 2009).

ESA, also, activated cells from immunized mice to produce IL-4 and IL-10 in lower levels compared to those cells collected from chronic mice but sufficient to modulate IL-12, IFN- γ and TNF- α synthesis, avoiding an excessive immune response that could cause extensive inflammation and host tissue damage (IL-10) (Gazzinelli et al. 1996; Anderson et al., 2007; Jankovic et al, 2007; Sun et al., 2009). Simultaneously IL-4, which is produced by Th2 cells could, also, suppresses Th1 development and secretion of IFN- γ by Th1 cells (Swain et al., 1990; Brinkmann et al, 1993).

Different antigens can induce different immune responses. DNA vaccines induce a Th1 response, a heterogeneous IgG response with high levels of IgG2a and low IgG1. Some recombinant antigens lead to a mixed Th1/Th2 response with high titers of antigen-specific IgG1 and IgG2a antibodies. Others produce a typical Th1 response with high titers of IgG, IgM and IFN- γ (Leyva et al., 2001; Liu, et al., 2006; Dziadek et al, 2009).

After 6 weeks, ESA-immunized AS/n mice had lower IgM levels as did chronic mice with 50 days of infection. At the same time, both groups of mice produced high IgG levels. However, ESA elicited a great IgG1 concentration and low IgG2a. It is known that chronic infection induces high IgG antibodies levels. Chronic infected AS/n mice had high IgG2a levels and failed to produce IgG1. Thus we can suppose that ESA could have elicited a combined Th1 and Th2 profile since a predominant IgG1, IFN- γ and TNF- α occurred, but with a balance including the production of IL10 and IL-4. The opsonization experiments suggested that anti-ESA IgG antibodies participate in the earlier activation of the complement

1
2 system, in order to facilitate phagocytosis, and consequently, the clearance of the parasitemia
3 and parasitism in the tissue cells.

4
5 Summarizing, these results suggest that the protective immune response in the chronic
6 infection was efficient in protecting the host against infection caused by other *T. gondii* strain
7 by humoral and cellular immune response and ESA participating in this process. The
8 immunization assays showed that ESA could elicit high IgG1, IFN- γ and TNF- α production
9 and, a lower amount of IgM, IL-10 and IL-4, suggesting a mixed Th1/Th2 profile.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 19 *Acknowledgments*

20
21 This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do
22 Estado de São Paulo, Brazil). Proc-2011/13939-8. T.A.C.S. was supported by fellowship from
23 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil). V.L.P.C.
24 was supported by a fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento
25 Científico e Tecnológico, Brazil) Produtividade em Pesquisa, Proc. 301531/2009-9.
26
27
28
29
30
31
32
33
34 AcademicEnglishSolutions.com proofread the text.
35

36 37 38 39 *References*

- 40
41
42
43 Anderson, C.F, Oukka, M., Kuchroo, V.J., Sacks, D., 2007. CD4(+)/CD25(-)/Foxp3(-) Th1
44 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous
45 leishmaniasis. *J Exp Med* 19, 285-297.
46
47
48
49
50 Araújo, P.R., Ferreira, A.W., 2010. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of
51 multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in
52 acute toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 52, 63-68.
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Bojar, I., Szymańska, J., 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 17, 209-214.
- Brinkmann, V., Geiger, T., Alkan, S., Heusser, C.H., 1993. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4 + T cells. *J Exp Med* 178, 1655–1663.
- Buxton, D., Innes, E.A., 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110, 11–16.
- Buxton, D., 1998. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary research* 29, 289-310.
- Carruthers, V.B., 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 81, 111-22.
- Castagnini, M., Bernazzali, S., Ginanneschi, C., Marchi, B., Maccherini, M., Sioulpas, C., Tanganelli, P., 2007. Fatal disseminated toxoplasmosis in a cardiac transplantation with seropositive match for *Toxoplasma*: should prophylaxis be extended? *Transpl Immunol* 18, 193-7.
- Céréde, O., Dubremetz, J.F., Soète, M., Deslée, D., Vial, H., Bout, D., Lebrun, M., 2005. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J Exp Med* 201, 453–463.
- Cesbron-Delauw, M.F., Capron, A., 1993. Excreted-secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: their origin and role in the host-parasite interaction. *Res Immunol* 144, 41-44.
- Costa-Silva, T.A., Meira, C.S., Ferreira, I.M., Hiramoto, R.M., Pereira-Chioccola, V.L., 2008. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 120, 227-234.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Costa-Silva, T.A., Meira, C.S., Frazzatti-Gallina, N., Pereira-Chioccola, V.L., 2012. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of tachyzoites cultivated in Vero cell maintained in serum free medium. *Exp Parasitol* 130, 463–469.
- Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T., 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 11, 569–588.
- Denkers, E.Y., 2003. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 39, 193-203.
- Dubey, J.P., 1998. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 28, 1019-1024.
- Dubey, J.P., 2008. The History of *Toxoplasma gondii*-The First 100 Years. *J Eukaryot Microbiol* 55, 467–475.
- Dziadek, B., Gatkowska, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dzitko, K., Długonska, H., 2009. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 123, 81-89.
- Elmore, S.A., Jones, J.L., Conrad P.A., Patton S., Lindsay D.S., Dubey J.P., 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends in Parasitology* 26, 190-196.
- Gazzinelli, R., Xu Y., Hieny S., Cheever A., Sher A., 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 149, 175–180.
- Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Kersten, T., Cheever, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchieri, G., Sher, A., 1996 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. *J Immunol* 157, 798-805.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Hill, D., Dubey, J.P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. Clin Microbiol Infect. 8, 634-640.
- Jankovic, D., Kullberg, M.C., Feng, C.G., Goldszmid, R.S., Collazo, C.M., Wilson, M., Wynn, T.A., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Sher, A., 2007. Conventional T⁺bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. J Exp Med. 204, 273-83.
- Johnson, L. L., 1992. A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. Infect. Immun. 60, 1979-1985.
- Leng, J., Butcher, B.A, Egan, C.E, Abdallah, D.S., Denkers, E.Y., 2009. *Toxoplasma gondii* prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. J Immunol 182, 489-497.
- Leyva, R., Hérion P., Saavedra, R., 2001. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. Parasitol Res 87, 70-9.
- Liu, C.H., Fan, Y.T., Dias, A., Esper, L., Corn, R.A., Bafica, A., Machado, F.S., Aliberti, J., 2006. Cutting edge: dendritic cells are essential for *in vivo* IL-12 production and development of resistance against *Toxoplasma gondii* infection in mice. J Immunol 177, 31-5.
- Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., Trinchieri G., 1996. The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. J Exp Med 183, 147-57.
- Mattos, C.C., Meira, C.S, Ferreira, A.I, Frederico, F.B, Hiramoto, R.M., Jr, G.C, Mattos, L.C., Pereira-Chioccola, V.L., 2011. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. Diagn Microbiol Infect Dis 70, 362-6.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Meira, C.S., Costa-Silva, T.A., Vidal, J.E., Ferreira, I.M., Hiramoto, R.M., Pereira-Chiocola V.L., 2008. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol.* 57, 845-50.
- Meira, C.S., Vidal, J.E., Costa-Silva, T.A., Frazatti-Gallina, N., Pereira-Chiocola, V.L., 2011. Immunodiagnosis in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis and HIV-infected patients using *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71, 279-85.
- Mesquita, R.T., Ziegler, A.P., Hiramoto, R.M., Vidal, J.E., Pereira-Chiocola, V.L., 2010. Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. *J Med Microbiol* 59, 641-647.
- Noor, S., Habashy, A.S., Nance, J.P., Clark, R.T., Nemati, K., Carson, M.J., Wilson, E.H., 2010. CCR7-Dependent Immunity during Acute *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect Immun.* 78, 2257-2263.
- O'Garra, A., Vieira, P., 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7, 425-8.
- Pereira-Chiocola, V.L., Vidal, J.E., Su, C., 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 4, 1363-79.
- Prigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslée, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M.F., Pistoia, V., 2000. T cell clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol* 164, 3741- 3748.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chioccola, V.L., Tempone, A.G., 2011. *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Exp Parasitol* 128, 111-5.
- Rosenberg, C., De Craeye, S., Jongert, E., Gargano, N., Beghetto, E., Del Porto, P., Vorup-Jensen, T., Petersen, E., 2009. Induction of partial protection against infection with *Toxoplasma gondii* genotype II by DNA vaccination with recombinant chimeric tachyzoite antigens. *Vaccine* 27, 2489-2498.
- Scharton-Kersten, T.M., Wynn, T.A., Denkers, E.Y., Bala, S., Grunvald, E., Hieny, S., Gazzinelli, R.T., Sher, A., 1996. In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to *Toxoplasma gondii* while failing to control acute infection. *J Immunol* 157, 4045-54.
- Seder, R.A., Gazzinelli, R.T., Sher, A., Paul, W.E., 1993. IL-12 acts directly on CD41 T cells to enhance priming for IFN-g production and diminishes IL-4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10188-10194.
- Sun, J., Madan, R., Karp, C.L., Braciale, T.J., 2009. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 15, 277-84.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806.
- Vercammen, M., Scorza, T., Huygen, K., De Braekeleer, J., Diet, R., Jacobs, D., Saman, E., Verschueren, H., 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and Immunity* 68, 38-45.
- Vidal, J.E., Hernandez, A.V., de Oliveira, A.C., Dauar, R.F., Barbosa, S.P.Jr., Focaccia, R., 2005. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and

1 predictors of treatment response in the HAART era. AIDS Patient Care STDS 19, 626-
2 34.
3

4
5 Yap, G., Pesin, M., Sher, A., 2000. IL-12 is required for the maintenance of IFN- production
6
7 in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*.
8
9 J Immunol 165, 628-631.
10

11
12 Zenner, L., Estaquier, J., Darcy, F., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F., 1999.
13
14 Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of
15
16 excreted-secreted antigens as vaccine components. Parasite Immunol 21, 261-72.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Legend for figures and tables

Figure 1. ESA immunization reduces parasitemia and delays mortality of mice infected with a lethal and highly virulent strain.

Three groups of 5 female A/Sn mice: ESA-immunized (circles); chronic infected (squares); and normal (triangles) were infected (i. p.) with 1×10^3 tachyzoites of RH strain. Parasitemia levels (A) were estimated daily by real-time PCR. *T. gondii* DNA molecules were determined by a molecular marker from the B1 gene described in Material and Methods section. DNA samples were extracted from blood (20 μ L) from five mice per group at day 4, 5, 6, 7 and 8. Cycle threshold value (C_T) is indicative of the quantity of tachyzoite target gene present in blood of *T. gondii*-infected mice. The number of parasites was correlated with 3 μ L DNA (around 300 ng). Mice survival rates after *T. gondii* infection per group (B): ESA-immunized (circles), chronic infected (squares) and normal mice (triangles).

Figure 2. Cytokine production from splenocytes after TLA stimulation *in vitro*.

Splenocytes (2×10^6 /well) from ESA-immunized (green columns), chronic infected (black columns); and normal (white columns) mice were re-stimulated with TLA, 5 μ g/mL for IFN- γ (A) and TNF- α (B); or 25 μ g/mL for IL-4 (C) and IL-10 (D). Supernatant were collected after 20, 48 or 72 hours and cytokine levels were determined by ELISA. Splenocytes were collected from spleens of 3 mice (per experiment). The values represent mean and SE of each cytokine (pg/mL) amount, of three independent experiments with 3 animals per experiment.

IFN- γ level differences between normal mice and infected or immunized mice were statistically significant at $*p < 0.05$. IL-4 level differences between immunized and chronic infected groups were statistically significant at $*p < 0.05$. TNF- α level differences between normal mice and infected or immunized mice were statistically significant at $***p < 0.0005$.

IL-10 level differences between the three mice groups were statistically significant at *** $p < 0.0005$.

Figure 3. Activation of the humoral response after immunization by ESA

Sera from ESA-immunized (gray columns), chronic infected (black columns) and normal mice (white columns) were used for determination of IgM, IgG, IgG1 and IgG2a, using TLA as antigen. The values represent the mean and SE of the absorbance (D.O.) of individual serum samples of 5 mice per group. Differences between IgG1 and IgG2a levels of ESA-immunized and chronic infected mouse groups were statistically significant at $p < 0.005$.

Figure 4. The opsonization of tachyzoites with anti-ESA antibodies reduces parasitemia and delays mortality of mice infected with a virulent and lethal *T. gondii* strain.

Three groups of 5 female A/Sn mice were infected (i. p.) with 1×10^3 tachyzoites of RH strain opsonized, for 90 min at 37 °C, with purified IgG (0.5µg) from ESA-immunized mice (circles); chronic infected mice (squares); and normal mice (triangles). Parasitemia levels (A) that were estimated daily by real-time PCR. *T. gondii* DNA molecules were determined by a molecular marker from B1 gene described in Material and Methods section. DNA samples were extracted from blood (20 µL) obtained from five mice per group at day 4, 5, 6 and 7. The cycle threshold value (C_T) is indicative of the quantity of the tachyzoite target gene present in blood of *T. gondii*-infected mice. The number of parasites was correlated with 3 µL DNA (around 300 ng). Survival rates (B) of mice groups infected with opsonized tachyzoites with purified IgG antibodies from ESA-immunized (circles), chronic infected (squares) and normal (triangles) mice.

Figure 1 - Costa-Silva et al.

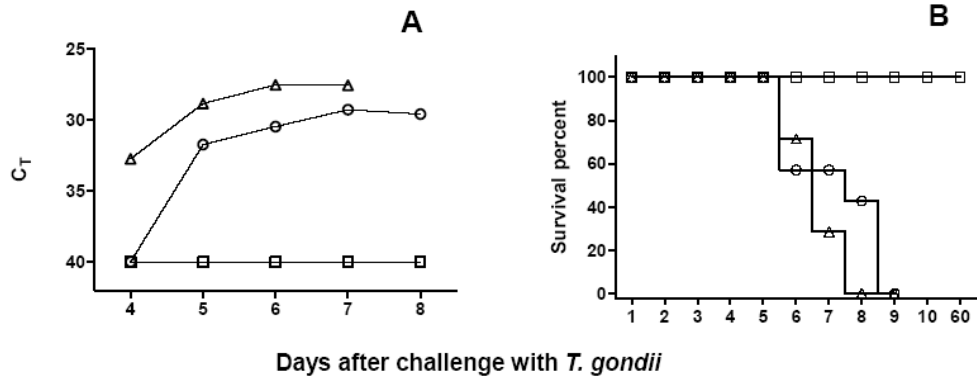


Figure 2 - Costa-Silva et al.

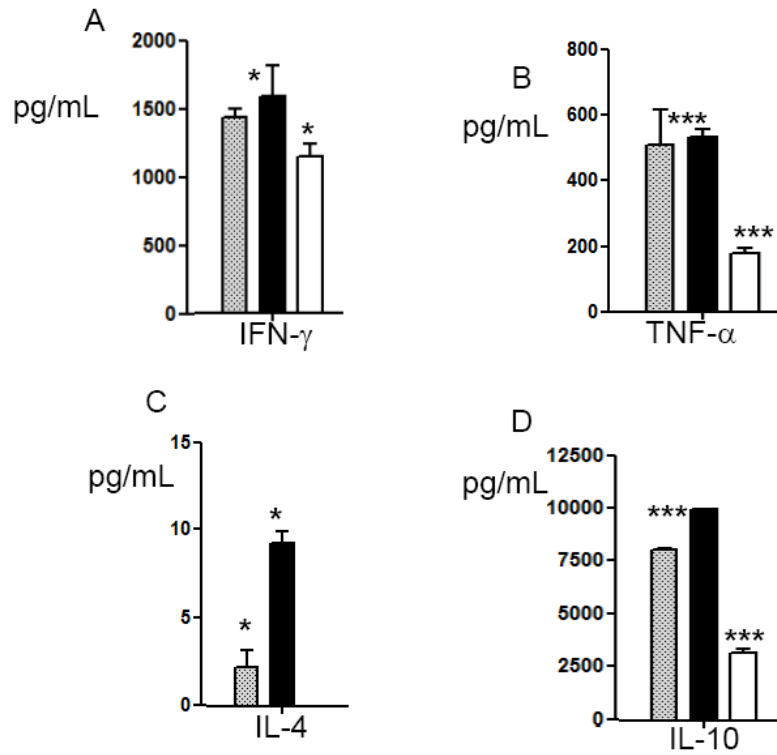


Figure 3 - Costa-Silva et al.

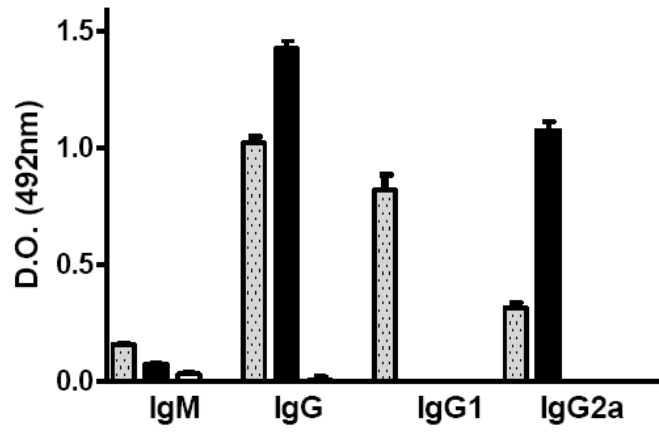


Figure 4 - Costa-Silva et al.

