

**Marta Marques Maia**

**Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com o sistema imune de hospedeiros infectados**

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 Lúcia Pereira-Chiocola.

**SÃO PAULO**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Maia, Marta Marques

Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com o sistema imune de hospedeiros infectados / Marta Marques Maia - 2022.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientação: Profa. Dra. Vera Lúcia Pereira-Chioccola

1. Toxoplasmose. 2. *Toxoplasma gondii*. 3. Vesículas extracelulares. 4. Citocinas. 5. MicroRNAs.

SES/CCD/CD - 441/2022

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu foco e força para seguir em frente, e aos meus pais Cidinha e Milton pelo amor e apoio.

## **AGRADECIMENTO**

Quero agradecer a todos que estiveram caminhando ao meu lado nesta jornada. Acredito que nossas conquistas não são somente nossas, mas de todos aqueles que nos incentivam, nos apoiam e confiam em nosso trabalho. Agradeço a Deus por ter me colocado onde estou, por ter atendido as minhas preces, me acalmado nos momentos difíceis, oferecendo conforto e força para chegar até aqui.

Agradeço aos meus amados irmãos Neto e Murilo pela amizade, companheirismo e compreensão. Sou muito feliz por tê-los como irmão e por nos divertirmos tanto juntos. Ao meu amado marido Matheus pela paciência, amor e carinho, acreditando sempre no meu futuro profissional e dividindo os sonhos.

À minha querida orientadora professora Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccola que foi fundamental para o meu crescimento profissional, acreditou no meu potencial e me orientou. A você Vera os meus eternos agradecimentos. Você é minha inspiração. Levarei um pedacinho de você comigo.

A Cristina da Silva Meira-Strejevitch a quem admiro pela competência, carisma, coragem e profissionalismo. Levarei comigo todos os seus ensinamentos.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos Alle, Cida, Fran, Ingrid, Margarete e Ricardo, pelos momentos desafiadores, alegres e que me senti em família estando com vocês. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A Banca de Qualificação Dra. Adriana Pardini, Dra. Ana Cláudia e Dra. Gabriela Motoie, pelas contribuições que enriqueceram este trabalho.

Agradeço a todas as pessoas maravilhosas que conheci nesses anos de Instituto Adolfo Lutz, que passaram a fazer parte da minha vida e que vou me recordar para sempre.

**Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).**

**Marta Marques Maia teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).**

**“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas que dê o primeiro passo.”**

**Martin Luther King**

## RESUMO

As vesículas extracelulares (EVs) são nanopartículas produzidas e liberadas por células eucarióticas e procarióticas com propriedades biológicas. EVs desempenham um papel importante no sistema imunológico, transporte de moléculas e comunicação celular. A fim de compreender a participação das EVs na resposta imune durante a infecção por *Toxoplasma gondii*, este estudo teve como objetivo, investigar as respostas humoral e celular, em camundongos imunizados com EVs liberadas por taquizoítos e desafiados com *T. gondii*. As EVs de *T. gondii* (EVs-toxo) foram purificadas a partir de taquizoítos mantidos em culturas celulares. A seguir, um grupo de camundongos foi imunizado com as EVs-toxo e Alum como adjuvante (EV-IM). Como controles, o grupo negativo (N) recebeu somente Alum e os camundongos do grupo positivo (CHR) foram infectados com a cepa ME-49. O grupo EV-IM apresentou altos níveis de IgG1 do que IgM ou IgG2a. IgGs purificadas de soros destes camundongos foram capazes de opsonizar taquizoítos (cepa RH) e, quando os camundongos foram desafiados com a cepa RH tiveram a mortalidade atrasada em 48h. Células do cérebro e do baço deste grupo expressaram mais IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ . As EVs dos soros destes camundongos foram purificadas por ultracentrifugação. As análises das EVs de camundongo (EVs-mouse) mostraram que as concentrações de EVs liberadas de soros do grupo N foram menores que as do grupo EV-IM e a presença de exossomos foi confirmada pelo immunoblot das EVs. Esplenócitos de camundongos foram estimulados com EVs-toxo. Esplenócitos dos camundongos do grupo EV-IM expressaram mais IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e IL-17, que os do grupo N. Curiosamente, a IL-10 foi altamente expressa apenas em esplenócitos do grupo EV-IM. Os resultados da expressão gênica de microRNAs (miRNAs) mostraram que os camundongos do grupo EV-IM expressaram mais miR-155-5p, miR-29c-3p e miR-125b-5p do que os do grupo N. Todos esses dados sugerem a participação das EVs na interação *T. gondii*-hospedeiro. Além disso, os miRNAs liberados pelas EVs interagem com a modulação da resposta imune celular anti *T. gondii*. A imunização com EVs foi capaz de induzir proteção imunológica. Esses dados fornecem subsídios para propor a diferenciação entre hospedeiros infectados e não infectados pela concentração de EVs.

**Palavras Chave:** toxoplasmose, *Toxoplasma gondii*, vesículas extracelulares, citocinas, miRNA.



## ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles produced and released by eukaryotic and prokaryotic cells with biological properties. EVs play an important role in the immune system, transport of molecules and cellular communication. In order to understand the participation of EVs in the immune response during *Toxoplasma gondii* infection, this study aimed to investigate the humoral and cellular responses in mice immunized with EVs released by tachyzoites and challenged with *T. gondii*. *T. gondii* EVs (tox-EVs) were purified from tachyzoites maintained in cell cultures. Then, a group of mice was immunized with EVs-toxo and Alum as an adjuvant (EV-IM). As controls, the negative group (N) received only Alum and the mice in the positive group (CHR) were infected with strain ME-49. The EV-IM group had higher levels of IgG1 than IgM or IgG2a. IgGs purified from the sera of these mice were able to opsonize tachyzoites (RH strain) and, when mice were challenged with the RH strain, mortality was delayed by 48h. Brain and spleen cells from this group expressed more IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ . The EVs from the sera of these mice were purified by ultracentrifugation. Analysis of mouse EVs (mouse EVs) showed that the concentrations of EVs released from sera from the N group were lower than those from the EV-IM group and the presence of exosomes was confirmed by the immunoblot of EVs. Mouse splenocytes were stimulated with EVs-toxo. Splenocytes from EV-IM group mice expressed more IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  and IL-17 than those of the N group. Interestingly, IL-10 was highly expressed only in splenocytes of the EV-IM group. The results of gene expression of microRNAs (miRNAs) showed that mice in the EV-IM group expressed more miR-155-5p, miR-29c-3p and miR-125b-5p than those in the N group. participation of EVs in *T. gondii* host interaction. Furthermore, miRNAs released by EVs interact with the modulation of the cellular immune response against *T. gondii*. Immunization with EVs was able to induce immune protection. These data provide subsidies to propose the differentiation between infected and uninfected hosts by the concentration of EVs.

**Key Words:** toxoplasmosis, *Toxoplasma gondii*, extracellular vesicles, cytokines, miRNA.

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

**Aids** - Síndrome da imunodeficiência adquirida

**ACT** - Grupo agudo

**ALT** - Antígeno lisado de *Toxoplasma gondii*

**ALUM** - Hidróxido de alumínio

**CD** - “Cluster of Differentiation” - Cluster de diferenciação

**CDC** - Centro de Controle de Doenças

**cDNA** - DNA complementar

**CHR** - Grupo Crônico

**ConA** - Concanavalina A

**CT** - “Cycle threshold” - Limiar do ciclo

**DEPC** - “Diethylpyrocarbonate” - Pirocarbonato de dietila

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**D.O.** - Densidade ótica

**EDTA** - “Ethylenediamine tetraacetic acid” - Ácido etilenodiamino tetra-acético

**ELISA** - “Enzyme-linked Immunosorbent Assay” - Ensaio imunoenzimático

**et al.** - e colaboradores

**EVs** - “Extracellular Vesicle” - Vesículas Extracelulares

**g** - Aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s<sup>2</sup>)

**g** - grama(s)

**IFN-γ** - Interferon gamma

**IgG** - Imunoglobulina da classe G

**IgG2a** - Imunoglobulina da classe G e subclasse 2a

**IgM** - Imunoglobulina da classe M

**IL** - Interleucina

**IM** - intramuscular

**in vitro** - do latim, em vidro (referência utilizada para processos biológicos que são realizadas em lugares fora dos sistemas vivos)

**IP** - intraperitoneal

**kDa** - Kilodalton

**LPS** - Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* O11 B4

**MET** - Identificação por Microscopia Eletrônica de Transmissão

**mg** - miligrama(s)

**mL** - mililitro(s)

**mM** - milimolar

**mRNA** - RNA mensageiro

**miRNA** - MicroRNA

**N** - Grupo negativo

**NK** - "Natural Killer Cell" - Células exterminadoras naturais

**NTA** - Análise de Rastreamento de Nanopartículas

**NO**- Óxido nítrico

**pb** - Pares de base

**PBS** - "Phosphate buffered saline" - Tampão fosfato-salino

**PCR** - "Polimerase chain reaction" - Reação em cadeia da polimerase

**pH** - Concentração de hidrogênio iônico

**qPCR** - PCR em tempo real

**RFRR** - “Rheumatoid Factor Removal Reagent” - Reagente de Remoção de Fator Reumatóide

**RIFI** - Reação de imunofluorescência indireta

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**SFB** - Soro fetal bovino

**SNC** - Sistema nervoso central

**Taq** - *Thermophilus aquaticus*

**TGF- $\beta$**  - “Transforming growth factor-beta” - Fator beta transformador de crescimento

**Th1** - Resposta celular do tipo 1

**Th2** - Resposta celular do tipo 2

**TNF- $\alpha$**  - “Tumor necrosis factor-alpha” - Fator de necrose tumoral alfa

**TR** - Transcriptase reversa

**VERO** - Células de rim de macaco verde africano

**$\mu\text{L}$**  - Microlitro

**$\mu\text{m}$**  - Micrômetros

**$\mu\text{M}$**  - Micromolar

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo da estrutura de um taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>3</b>
<b>Figura 2.</b> Cisto retirado do cérebro do camundongo por homogeneização em solução salina. Observe a parede fina do cisto (seta) envolvendo muitos bradizoítos.....	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Esquema do processo de diferenciação dos taquizoítos nos vacúolos em bradizoítos encontrados em cistos teciduais.....	<b>5</b>
<b>Figura 4.</b> Oocisto esporulado com uma parede fina (seta grande) e dois esporocistos (pontas da seta). Cada esporocisto tem quatro esporozoítos (seta pequena).....	<b>6</b>
<b>Figura 5.</b> Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>7</b>
<b>Figura 6.</b> Ciclo de transmissão de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>8</b>
<b>Figura 7.</b> Situação Global da soroprevalência de <i>Toxoplasma Gondii</i> .....	<b>10</b>
<b>Figura 8.</b> Liberação de microvesículas e exossomos.....	<b>28</b>
<b>Figura 9.</b> Liberação de EVs de <i>Toxoplasma gondii</i> pela membrana.....	<b>31</b>
<b>Figura 10.</b> Imagens capturadas por microscopia eletrônica de transmissão de EVs de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>31</b>
<b>Figura 11.</b> Isolamento de EVs de taquizoítos da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 12.</b> Purificação de vesículas extracelulares (EVs) liberadas por taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	<b>58</b>

<b>Figura 13.</b> Índices de sobrevivência de grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn infectados com diferentes concentrações de taquizoítos.....	<b>59</b>
<b>Figura 14.</b> Índices de sobrevivência de grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn imunizados com 4 doses quinzenais de 20 µg de EVs e adjuvante ALUM por via intramuscular (IM) (A), e intraperitoneal (IP) (B).....	<b>60</b>
<b>Figura 15.</b> Níveis de anticorpos produzidos na imunização com EVs em camundongos fêmeas da linhagem A/Sn, após 3 imunizações.....	<b>61</b>
<b>Figura 16.</b> Níveis de anticorpos produzidos na imunização com EVs em camundongos fêmeas da linhagem Balb-c, após 3 imunizações.....	<b>62</b>
<b>Figura 17.</b> Análise eletroforética do ALT por SDS-PAGE e imunoblot.....	<b>63</b>
<b>Figura 18.</b> Níveis de parasitemia determinados por qPCR e porcentagem de sobrevivência de camundongos fêmeas das linhagens A/Sn e Balb-c imunizados com EVs e desafiados com 100 taquizoítos/animal.....	<b>64</b>
<b>Figura 19.</b> Osonização de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com anticorpos anti-EVs reduz a parasitemia e aumenta o índice de sobrevivência.....	<b>65</b>
<b>Figura 20.</b> A imunização com EVs de <i>T. gondii</i> ativa a resposta celular.....	<b>66</b>
<b>Figura 21.</b> Distribuição das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-17 e IL-10 no cérebro, coração, fígado, baço e células do músculo esquelético.....	<b>67</b>
<b>Figura 22.</b> Tamanho e concentração das EVs de soros de camundongos A/Sn.....	<b>69</b>
<b>Figura 23.</b> Imagens captadas por MET de preparações de EVs de soros camundongos.....	<b>70</b>
<b>Figura 24.</b> Eletroforese (SDS-PAGE 10%) corada com nitrato de prata, contendo EVs de soros.....	<b>71</b>
<b>Figura 25.</b> Produção de citocinas em esplenócitos murinos após estimulação com EVs <i>in vitro</i> .....	<b>73</b>

<b>Figura 26.</b> Valores de RQ de cada miRNA testado em soros de camundongos.....	<b>74</b>
--	-----------

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Etapas do protocolo de síntese de cDNA.....**52**

**Tabela 2** - Genes alvos utilizados como marcadores para análise de expressão gênica de miRNA.....**53**

**Tabela 3** - Análises estatísticas.....**73**



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.Histórico.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3. Taquizoítos.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4. Bradizoítos.....</b>	<b>4</b>
<b>1.5. Oocistos.....</b>	<b>5</b>
<b>1.6. Ciclo de vida.....</b>	<b>6</b>
<b>1.7. Transmissão.....</b>	<b>8</b>
<b>1.8. Epidemiologia.....</b>	<b>9</b>
<b>1.9. Toxoplasmose humana.....</b>	<b>11</b>
1.9.1. Toxoplasmose em imunocompetentes.....	12
1.9.2. Toxoplasmose ocular.....	12
1.9.3. Toxoplasmose cerebral.....	14
1.9.4. Toxoplasmose congênita.....	15
1.9.5. Toxoplasmose disseminada.....	16
<b>1.10. Diagnóstico da toxoplasmose.....</b>	<b>17</b>
1.10.1. Clínico.....	17
1.10.2. Laboratorial.....	18
1.10.2.1. Sorológico.....	18
1.10.2.2. Molecular.....	20
<b>1.11. Tratamento.....</b>	<b>21</b>

<b>1.12. Resposta imune na toxoplasmose.....</b>	<b>21</b>
<b>1.13 Organelas secretórias e antígenos de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>24</b>
1.13.1 Micronemas.....	25
1.13.2 Roptrias.....	25
1.13.3 Grânulos densos.....	27
<b>1.14 Vesículas extracelulares.....</b>	<b>26</b>
1.14.1 Classes de Evs.....	27
1.14.1.1 Exossomos.....	28
1.14.1.2 Microvesículas.....	29
<b>1.15 Vesículas extracelulares em parasitas.....</b>	<b>30</b>
<b>1.16 miRNAs.....</b>	<b>31</b>
<b>1.17 Justificativa.....</b>	<b>32</b>
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Delineamento experimental.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Considerações éticas.....</b>	<b>36</b>
<b>3.3 Animais experimentais.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4 Obtenção e manutenção de <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>3.5 Produção de antígeno lisado de taquizoítos (ALT).....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 Produção e purificação de EVs de <i>T. gondii</i> para imunizações.....</b>	<b>37</b>
<b>3.7 Identificação de tamanho e concentração de EVs pela Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....</b>	<b>39</b>

<b>3.8 Identificação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)</b>	<b>39</b>
<b>3.9 Ensaio de imunização</b>	<b>40</b>
3.9.1 Grupos de animais imunizados	40
3.9.2 Grupos controles	41
3.9.2.1 Controle negativo	41
3.9.2.2 Controle positivo	41
3.9.3 Condições de acomodação dos camundongos em fase de experimentação	41
<b>3.10 Coletas de sangue para obtenção de soro e DNA</b>	<b>42</b>
<b>3.11 Análise da resposta imune humoral</b>	<b>42</b>
3.11.1 Determinação dos níveis de Ig total, IgM e subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a por ELISA	42
<b>3.12 Desafio dos camundongos com <i>T. gondii</i></b>	<b>43</b>
<b>3.13 Extração de DNA no sangue de camundongos</b>	<b>43</b>
<b>3.14 Determinação dos níveis de parasitemia por qPCR</b>	<b>44</b>
<b>3.15 Purificação de anticorpos e transferência passiva</b>	<b>44</b>
<b>3.16 Caracterização das EVs de camundongos na infecção por <i>T. gondii</i></b>	<b>45</b>
3.16.1 Concentração das EVs de camundongos por ultracentrifugação	45
3.16.2 Análise das concentrações e diâmetro das EVs de camundongos por NTA	45
3.16.3 MET das EVs provenientes de soro de camundongos	46
3.16.4 Eletroforese vertical de proteínas (SDS-PAGE)	47
3.16.5 Immunoblot	48
3.16.6 Extração de RNA total e miRNA	48

3.16.7 Determinação das concentrações de miRNA.....	49
3.16.8 Síntese de DNA complementar (cDNA).....	50
3.16.9 qPCR.....	50
3.16.10 Quantificação de expressão gênica.....	51
<b>3.17 Resposta celular: produção das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em camundongos imunizados.....</b>	<b>54</b>
3.17.1 Obtenção de linfócitos e linfoproliferação.....	54
3.17.2. Dosagem das citocinas.....	55
<b>3.18 Dosagem de citocinas por imuno-histoquímica.....</b>	<b>55</b>
<b>3.19 Análise dos dados.....</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1 Padronizações.....</b>	<b>57</b>
4.1.1 Purificação de EVs liberadas por <i>T. gondii</i> .....	57
<b>4.2 Imunizações: padronizações.....</b>	<b>59</b>
4.2.1 Definição da concentração de inóculo com taquizoítos.....	59
4.2.2 Vias de inoculação.....	60
<b>4.3 Imunização com EVs de <i>T. gondii</i> desencadeia resposta imune humoral tipo IgG1 em camundongos.....</b>	<b>60</b>
<b>4.4 Análise eletroforética do ALT por SDS-PAGE e Immunoblot.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5 Imunização com EVs de <i>T. gondii</i> causa proteção em camundongos desafiados com a cepa altamente virulenta (RH).....</b>	<b>63</b>
<b>4.6 Participação de anticorpos anti-EVs na parasitemia e sobrevida camundongos imunizados SDS-PAGE e Immunoblot em EVs purificadas de soros.....</b>	<b>64</b>

<b>4.7 Expressão de citocinas <i>in situ</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>4.8 Investigação das EVs murinas e na infecção por <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>67</b>
<b>4.9 Morfologia das EVs de soro murino analisadas por MET.....</b>	<b>70</b>
<b>4.10 Análise eletroforética e imune das EVs purificadas de soros.....</b>	<b>70</b>
<b>4.11 EVs estimulam esplenócitos murinos vitro a produção de citocinas</b>	<b>71</b>
<b>4.12 Expressão de miRNAs em camundongos imunizados com EVs liberadas por <i>T. gondii</i>.....</b>	<b>74</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7. REFERÊNCIA.....</b>	<b>82</b>
<b>Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>106</b>
<b>Anexo 2 - Artigos Publicados.....</b>	<b>107</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa. *T. gondii* infecta vários hospedeiros, incluindo o homem, sendo um dos parasitas mais bem estudados devido à sua importância médica e veterinária (Dubey et al., 1970).

## 1.1. Histórico

Foi descrito no Brasil por Afonso Splendore, em 1908, parasitando coelhos da Faculdade de Medicina de São Paulo e simultaneamente por Nicolle e Manceaux no Instituto Pasteur da Tunísia, que trabalhando com *Leishmania* observaram um microrganismo dentro de células mononucleares do baço e fígado de *Ctenodactylus gundi*, um roedor norte-africano (Rey, 2001). Houve discussões sobre quem deveria ter o mérito da primeira descrição e, atualmente, há um consenso de que ambos os grupos merecem reconhecimento pela descoberta. Esta decisão foi tomada durante o Simpósio Internacional realizado no Rio de Janeiro, em setembro de 2008 (Martins-Duarte e Adesse, 2021).

A história da descoberta de *T. gondii* e da toxoplasmose pode ser organizada em quatro etapas: descoberta do agente etiológico, descoberta do parasita em humanos, diagnóstico e identificação do hospedeiro definitivo (Martins-Duarte e Adesse, 2021). O primeiro caso de toxoplasmose humana foi descrito por Janku, em 1923, em uma criança de 11 anos de idade que apresentava hidrocefalia e lesões oculares. Em 1937, Wolf e Cowen relataram casos em que a transmissão congênita havia ocorrido e, em seguida, os primeiros casos clínicos de toxoplasmose foram detalhados pelo mundo (Coutinho e Vergara, 2005).

No Brasil importantes contribuições foram feitas, principalmente por Torres, em 1927, quando fez as primeiras descrições anatomopatológicas da

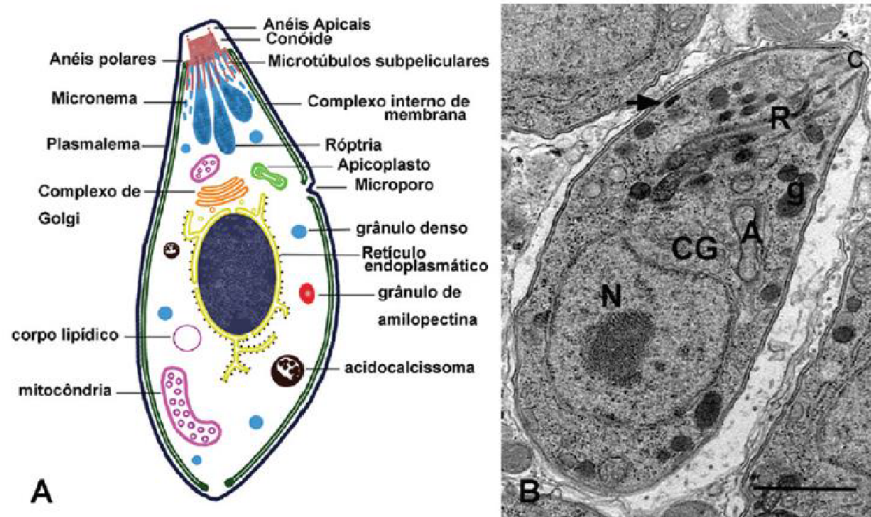
doença e por Delásio, em 1956, com detalhadas informações sobre a forma congênita. Sabin e Feldman, em 1948, desenvolveram o teste sorológico do corante, permitindo o estudo de aspectos clínicos e epidemiológicos da doença (Coutinho e Vergara, 2005). Somente na década de 1970 o ciclo biológico do parasita foi elucidado ao demonstrar os estágios infecciosos de *T. gondii* nas fezes de gatos (Dubey et al., 1970).

## **1.2. *Toxoplasma gondii***

Pertence ao Reino Protista, Sub-reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoa, Subclasse Coccidia, Ordem Coccidia, Família Sarcocystidae, Gênero *Toxoplasma* e Espécie *Toxoplasma gondii* (Levine et al., 1980). É um protozoário intracelular obrigatório, que se multiplica em células nucleadas de animais de sangue quente (Montoya et al, 2004; Dubey, 2008) e parasita, preferencialmente macrófagos teciduais. Os parasitas são encontrados, também, em secreções, células endoteliais, células nervosas e musculares. Constitui uma única espécie, *T. gondii*, com algumas cepas e com uma estrutura celular característica do filo Apicomplexa. Os parasitas apresentam um complexo de organelas citoplasmáticas secretoras, os micronemas, as roptrias, grânulos densos e o apicoplasto; cuja propriedade desse grupo é a organela envolta por quatro membranas e localizada na região anterior ao núcleo, como mostra a Figura 1 (Dubey et al., 1998). *T. gondii* apresenta uma morfologia múltipla, dependendo do habitat e do estado evolutivo em que se encontra, exibindo três formas evolutivas, os taquizoítos, bradizoítos e oocistos contendo esporozoítos (Dubey et al., 1998).

### 1.3. Taquizoítos

O termo taquizoíto vem do grego, onde *taqi* significa rápido devido a rápida multiplicação dos parasitas em diversos tipos celulares. Exibem formato de meia lua e medem cerca de 2  $\mu\text{m}$  de largura e 6  $\mu\text{m}$  de comprimento, como mostra a Figura 1. Ultra estruturalmente os taquizoítos apresentam diversos grânulos densos, micronemas, anéis apicais e polares e cinco a oito roptrias. O núcleo localiza-se na região central do corpo do parasita (Dubey et al., 1998).



**Figura 1.** Esquema representativo da ultraestrutura de um taquizoíto de *Toxoplasma gondii* (A); Micrografia eletrônica de um taquizoíto, evidenciando as estruturas (B): Conóide (C), Roptrias (R), Grânulo denso (g), Apicoplasto (A), Complexo de Golgi (CG) e Núcleo (N). **Fonte:** Souza et al., 2010.

São intracelulares obrigatórios de células nucleadas e são encontrados no interior de vacúolos parasitóforos (Hill et al., 2002). Entram em células hospedeiras por penetração ativa e, após a entrada, se tornam ovóides e envoltos pelo vacúolo parasitóforo. Assim, os taquizoítos ficam protegidos dos mecanismos de defesa do hospedeiro e multiplicam-se assexuadamente por repetidas endodiogenias, onde dois taquizoítos originam-se dentro da célula-mãe, que se degenera ao final do processo de divisão celular (Blader et al., 2015). Depois de várias replicações, os parasitas rompem a membrana da

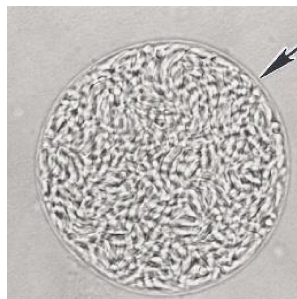


célula hospedeira e se disseminam pela corrente sanguínea para vários tecidos e esse processo continua até o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro ao parasita, estabelecendo-se à infecção após algumas divisões (Dubey et al, 1998).

Taquizoítos são responsáveis pela fase aguda da infecção, causando intensa inflamação, destruição tecidual e manifestações clínicas que podem ser graves, devido à sua eficiente capacidade reprodutiva, podendo causar infecção generalizada, que se não forem controlados pelo sistema imunológico do hospedeiro, pode ser fatal (Frenkel, 1974; Blader et al., 2009).

#### 1.4. Bradizoítos

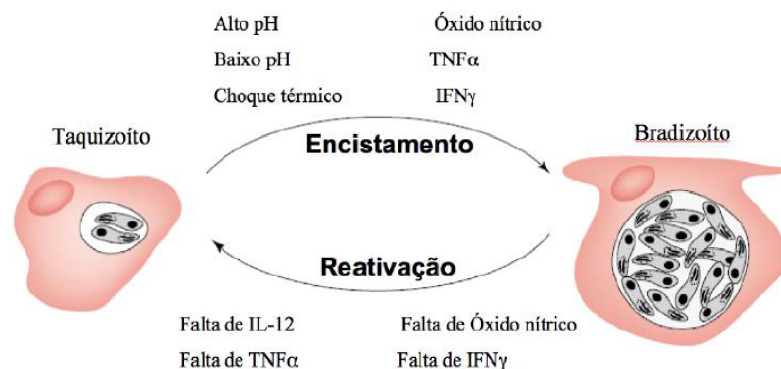
Após algumas divisões os parasitas formam os cistos teciduais que se alojam no interior dos tecidos por longos períodos ou pela vida toda do hospedeiro, sem que cause resposta inflamatória ou dano tecidual (Figura 2).



**Figura 2.** Cisto retirado do cérebro de um camundongo por homogeneização em solução salina. Observe a parede fina do cisto (seta) envolvendo muitos bradizoítos. Microscopia óptica comum, aumento de 40x com preparação a fresco. **Fonte:** Hill e Dubey, 2016.

Os cistos teciduais possuem vários bradizoítos em seu interior que são as formas de replicação mais lentas, “*brad*” no grego significa lento. Reproduzem-se lentamente no interior do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira por endodiogenia e modificam a membrana do vacúolo para a formação da parede cística dando origem ao cisto tecidual, que são encontrados, mais frequentemente, na fase crônica da infecção (Tenter et al.,

2000). Os núcleos dos bradizoítos situam-se na extremidade posterior, enquanto nos taquizoítos os núcleos estão na posição central. Embora possam se desenvolver no pulmão, fígado e rim, são mais prevalentes em tecidos musculares, no cérebro e na retina (Hill et al., 2005). Cistos teciduais variam de tamanho, os jovens podem medir cerca de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e os mais velhos podem conter centenas de estruturas, alcançando cerca de 60  $\mu\text{m}$ , dependendo da idade, do tipo da célula hospedeira e da cepa de *T. gondii* (Dubey et al., 1993). A parede cística e a matriz protegem os bradizoítos do sistema imune do hospedeiro promovendo uma barreira física (Weiss, 2000). Cistos teciduais podem se romper e com a transformação de bradizoítos em taquizoítos (interconversão), invadem outras células hospedeiras e novamente se transformam em bradizoítos formando um novo cisto tecidual, como mostra a Figura 3 (Tenter et al., 2000).

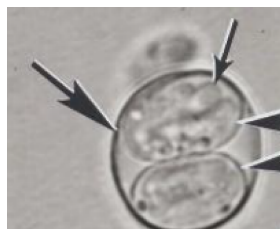


**Figura 3.** Esquema do processo de diferenciação dos taquizoítos nos vacúolos das células hospedeiras em bradizoítos encontrados em cistos teciduais. Microscopia óptica comum, aumento de 40x com preparação a fresco. **Fonte:** Lyons et al., 2002.

## 1.5. Oocistos

Os oocistos (Figura 4) são as formas infectantes resultantes do ciclo sexuado e ocorrem somente no trato gastrointestinal dos felídeos jovens. São liberados para o meio ambiente pelas fezes durante a infecção aguda por cerca de 7 a 10 dias, podendo esporular em até 6 meses. Os oocistos esporulados

podem permanecer viáveis no meio ambiente por um período de até 18 meses. Cada oocisto forma em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (Dubey, 1998; Hill et al., 2002; Montoya et al., 2004).



**Figura 4.** Oocisto esporulado com uma parede fina (seta grande) e dois esporocistos (pontas da seta). Cada esporocisto tem quatro esporozoítos (setas pequenas). **Fonte:** Hill e Dubey, 2016.

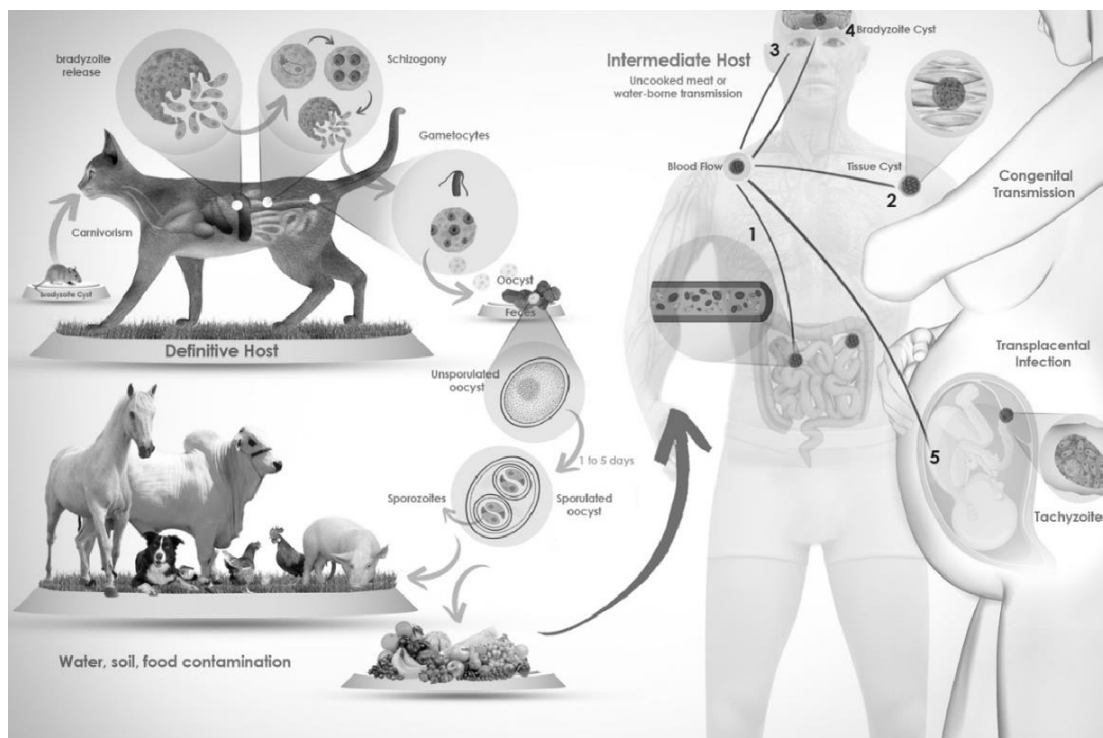
## 1.6. Ciclo de vida

*T. gondii* apresenta um complexo ciclo de vida, que foi descrito somente em 1970 por Dubey et al., demonstrado na Figura 5. O ciclo é heteroxênico tendo os felídeos, incluindo o gato doméstico, como hospedeiros definitivos e mamíferos e aves como hospedeiros intermediários (Dubey et al., 1970). Nos hospedeiros intermediários ocorre apenas a reprodução assexuada, enquanto nos hospedeiros definitivos ocorrem as reproduções sexuada e assexuada. Os hospedeiros definitivos são considerados a principal fonte de contaminação da doença, uma vez que a formação e liberação de oocistos nas fezes acontecem com grande facilidade.

A fase sexuada ocorre no felídeo não imune que adquire a infecção pela ingestão de oocistos, cistos teciduais ou taquizoítos. O ciclo sexual ocorre nas células intestinais com formação e fertilização dos gametócitos e concepção do zigoto. Este origina o oocisto imaturo que posteriormente é liberado após o rompimento celular, sendo eliminado nas fezes após uma ou duas semanas de infecção. Os oocistos imaturos, não infectantes, sob condições ideais de temperatura, umidade e oxigênio, como as que ocorrem em regiões tropicais, esporulam e podem sobreviver de 12 a 18 meses no solo desde que mantidas

tais condições, sem a luz solar direta (Rey, 2001). A transmissão é assegurada pela enorme quantidade de oocistos eliminados nas fezes de felídeos para o meio ambiente (Hill et al., 2002).

Os hospedeiros intermediários se infectam pela ingestão de oocistos maduros encontrados no solo, verduras, água contaminada ou ingerindo cistos com bradizoítos em carnes cruas ou mal cozidas (Hill et al., 2002; Montoya et al., 2004). Os parasitas penetram no intestino do hospedeiro, invadem as células epiteliais e inicia-se um processo de multiplicação assexuada por endodiogenia dentro do vacúolo parasitóforo. Estes se multiplicam rapidamente até a ruptura da célula hospedeira liberando os taquizoítos que se disseminam pela corrente sanguínea invadindo novas células nucleadas e em seguida, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos (Dubey et al., 1972; Kim e Weiss, 2008).

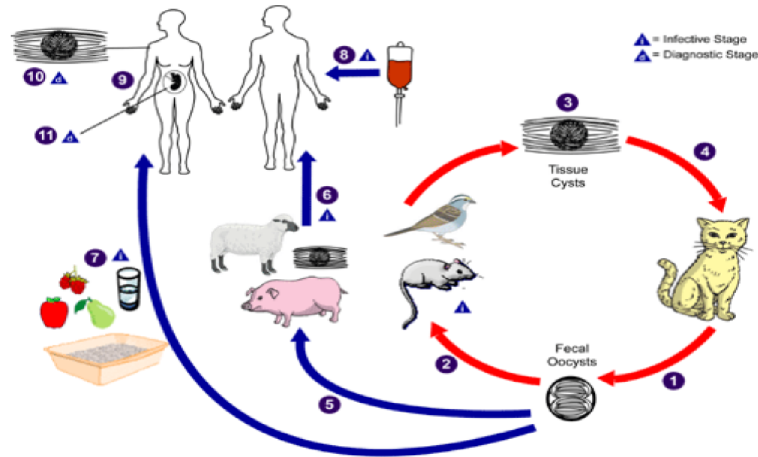


**Figura 5.** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. A fase sexual do ciclo de vida ocorre exclusivamente no intestino dos felinos (o hospedeiro definitivo). Os cistos teciduais ingeridos, no intestino, liberam bradizoítos que infectam os enterócitos. Ciclos de esquizogonia ocorrem dentro das células intestinais antes da transição para gametócitos. A fusão dos gametócitos masculinos e femininos dá origem aos oocistos. Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes e tornam-se infectantes quando esporulados após alguns dias no ambiente. A infecção

em humanos pode começar após a ingestão de carne crua contendo cistos teciduais ou alimentos e bebidas contaminadas com oocistos esporulados do meio ambiente. Dentro dos humanos, bradizoítos (de cistos) ou esporozoítos (de oocistos) infectam enterócitos no intestino delgado, onde se diferenciam em taquizoítos. Os taquizoítos atingem o sistema vascular e infectam outras células (1) – caracterizando a fase aguda da doença. Os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, que formam cistos teciduais e persistem por anos no hospedeiro sem causar qualquer manifestação clínica (fase crônica da doença). Os desfechos clínicos mais comuns correspondem a lesões oculares (3), efeitos neurológicos (4) ou malformações congênicas (5). A toxoplasmose congênita ocorre quando os taquizoítos atravessam a placenta e infectam o feto. A gravidade dos danos ao feto depende do período de gravidez. **Fonte:** Martins- Duarte e Adesse, 2021.

### 1.7. Transmissão

A transmissão do parasita ocorre pela ingestão de água ou alimentos infectados com oocistos, ou pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos (Hill e Dubey, 2002; Hill et al., 2005, Kim e Weiss, 2008). A transmissão pode ocorrer também por via transplacentária, pela amamentação durante a fase aguda da infecção, por transplante de órgãos e por transfusão sanguínea, como mostra a Figura 6.



**Figura 6.** Ciclo de transmissão de *Toxoplasma gondii*. Descrição do ciclo de vida: 1 - Oocistos não esporulados são eliminados nas fezes do gato, demoram em média cinco dias para esporular no ambiente tornando-se infeccioso. Os hospedeiros intermediários, incluindo aves e mamíferos, se infectam depois de ingerir solo, água ou alimentos contaminados com oocistos. 2 - Os oocistos se transformam em taquizoítos logo após a ingestão, vão para o tecido neural e muscular e desenvolvem-se em cistos contendo bradizoítos. 3 - Os gatos são infectados após consumir hospedeiros intermediários que abrigam cistos contendo bradizoítos no tecido. 4 - Os gatos também podem se infectar diretamente pela ingestão de oocistos esporulados. 5 - Animais criados para consumo humano também podem ser infectados com cistos teciduais após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente. Os seres humanos podem ser

infectados por qualquer uma das vias. 6 - Comendo carne crua ou mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais. 7 - Consumindo alimentos ou água contaminada com fezes de gato ou por amostras ambientais contaminadas (como terra contaminada). 8 - Transfusão sanguínea ou transplante de órgãos. 9 - Congênita passando da mãe ao feto. 10 - No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais, mais comumente no músculo esquelético, miocárdio, cérebro e olhos. Estes cistos podem permanecer durante toda a vida do hospedeiro. **Fonte:** <http://www.cdc.com>.

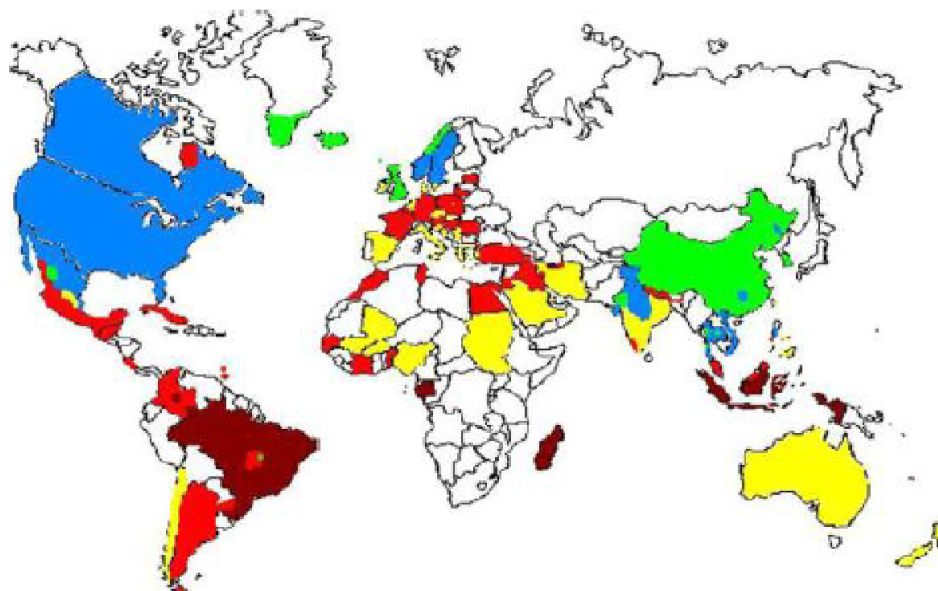
## 1.8. Epidemiologia

A toxoplasmose é uma doença cosmopolita e a soroprevalência pode variar de região para região. Na forma aguda é assintomática em 80 a 90% dos indivíduos imunocompetentes apresentando evolução benigna (Montoya et al., 2004). Afeta um terço da população mundial, acometendo aproximadamente dois bilhões de pessoas no mundo (Borges et al., 2017).

Na América Central, América do Sul e Europa estima-se que entre 30 e 90% da população esteja infectada. Enquanto nos Estados Unidos este percentual varia entre 8 e 22% (Hill e Dubey, 2016). A maioria dos estudos envolvendo países da América Latina revelam altas taxas de soropositividade. No Brasil, a prevalência sorológica de infecção por *T. gondii* é alta, variando em torno de 60 a 80% na população adulta como mostra a Figura 7 (Dubey, 2004) e na grande São Paulo a prevalência é de aproximadamente 69% (Amendoeira et al., 1999). Os felídeos são considerados os animais mais importantes na epidemiologia da toxoplasmose e são os responsáveis pela contaminação do meio ambiente através da eliminação de oocistos. A alta prevalência de infecção por *T. gondii* na América Central e do Sul é provavelmente devida a altos níveis de contaminação do meio ambiente com oocistos (Neto et al., 2000). O potencial de contaminação de produtos alimentícios é elevado devido aos níveis de contaminação nas águas superficiais, especialmente as usadas na irrigação (Hill e Dubey, 2016).

As condições gerais do clima tropical permitem a sobrevivência prolongada dos oocistos do parasita no ambiente. Os oocistos esporulados são as formas infectantes mais importantes na transmissão devido a facilidade de contaminação do solo e pela capacidade de resistência a processos de

congelamento e ambientes não favoráveis, permanecendo viáveis por até dezoito meses, facilitando sua disseminação com a capacidade de infectar animais de consumo (Dubey, 2004).



**Figura 7.** Situação Global da soroprevalência de *Toxoplasma gondii*. Em vermelho escuro a prevalência é igual ou acima de 60%, vermelha é de 40-60%, amarelo de 20-40%, azul de 10-20% e verde prevalência menor que 10%. Branco é igual à ausência de dados. **Fonte:** Pappas et al., 2009.

A água é considerada uma importante via de disseminação da toxoplasmose. Vários surtos foram relatados tendo essa via de transmissão. Na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, 113 indivíduos apresentaram sintomas da doença com possível transmissão pela água, visto que 200 gatos habitavam o local no qual ocorreu a infecção humana (Gattás et al., 2000). No norte do estado do Rio de Janeiro, águas de poços, de lagos e de riachos foram consumidas pela população e incriminadas como fonte de infecção (Bahia-Oliveira et al., 2003). Em Santa Isabel do Ivaí, estado do Paraná, de um total de 2884 indivíduos foi detectado anticorpos IgG anti-*T. gondii* e em 1255, anticorpos IgM e IgG. Este surto foi relacionado à ingestão de água em reservatórios da cidade (De Moura et al., 2006).

Em 2018, na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 931 casos de toxoplasmose foram confirmados, incluindo 146 gestantes, 3 óbitos fetais, 10

abortos e 29 casos de toxoplasmose congênita. Foi considerado o maior surto já descrito no mundo. A água também foi associada à origem desta infecção (Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, 2018; Dubey, 2021).

Surtos relacionados à ingestão de carne mal cozida também foram relatados no país (Coutinho et al., 2005). Na região de Erechim no Rio Grande do Sul, o manuseio de carne crua para confecção de linguiça e similares foi responsável pela elevada prevalência da doença, incluindo casos de retinocoroidite (Glasner et al., 1992). A presença de gatos e roedores em cerca de 90% das propriedades de criação de suínos em Erechim foi um fator importante para se relacionar com os elevados índices da toxoplasmose nesse local (Araújo et al., 2000). Nos seres humanos, a ingestão de carne mal cozida contendo cistos com bradizoítos é considerada a principal via de exposição ao *T. gondii* (Cook et al., 2000; Munoz-Zanzi et al., 2010).

### **1.9. Toxoplasmose humana**

*T. gondii* no hospedeiro humano comporta-se como agente dotado de alta infectividade e de baixa patogenicidade. A fonte de infecção (cistos, oocistos ou taquizoítos), assim como o tamanho do inóculo, o estado imunológico do hospedeiro e a linhagem da cepa são fatores que influenciam na determinação do quadro mais ou menos severo da doença (Dubey et al., 2012). Tradicionalmente a toxoplasmose adquirida é considerada uma doença autolimitada em indivíduos saudáveis, sendo o tratamento considerado desnecessário, uma vez que muitos pacientes não desenvolvem complicações mais severas. Trabalhos mostram que indivíduos com toxoplasmose adquirida apresentam o risco de desenvolver tardiamente lesões oculares que comprometem de forma irreversível a visão (Silva, 2008). Sendo assim, a toxoplasmose, enquanto doença pode ser dividida em quatro formas clínicas: a adquirida em pacientes imunocompetentes; a reativada em indivíduos imunocomprometidos, a forma congênita e a doença ocular (Amato et al., 1995; Remington et al., 1995).



### **1.9.1. Toxoplasmose em imunocompetentes**

Em imunocompetentes, formas assintomáticas da infecção constituem a maioria dos casos com acometimentos benignos, geralmente de cura espontânea (Mele et al., 2002). Contudo, cerca de 10-20% dos indivíduos infectados apresentam algum tipo de sintomatologia. A manifestação clínica mais típica consiste em linfadenopatia isolada, com linfonodos rígidos, não supurados e discretos, podendo ocorrer febre. A doença é geralmente autolimitada, observando-se em poucas semanas o desaparecimento dos sintomas (Montoya et al., 2004). A maioria das pessoas imunocompetentes quando infectadas pelo *T. gondii* não apresentam sintomas, mas os cistos teciduais podem persistir no hospedeiro e reativar a doença em estados de imunossupressão (Martins- Duarte e Adesse, 2021).

### **1.9.2. Toxoplasmose ocular**

A toxoplasmose ocular pode ser de origem congênita ou adquirida, como resultado da infecção aguda ou reativação, e em ambas o acometimento ocular pode ser precoce ou tardio (Montoya e Liesenfeld, 2004). A infecção ocular acomete primariamente a retina e leva a um quadro de uveíte posterior (retinocoroidite) acompanhada frequentemente de uveíte anterior, sendo que no Brasil, tais sintomas são responsáveis por 70% dos casos (de Amorim et al., 2004).

O grave impacto social da toxoplasmose ocular deve-se ao fato de levar à perda acentuada da visão. A lesão mais frequente é a retinocoroidite focal, granulomatosa, necrosante, de coloração branco-amarelada e de bordas mal definidas. Frequentemente encontra-se lesão satélite e outras cicatrizes antigas hiperpigmentadas e atróficas, sendo este achado característico da toxoplasmose ocular. Os sintomas primordiais incluem diminuição da visão pelo edema, inflamação ou necrose retiniana e opacidades (nuvens) no campo

visual, hiperemia conjuntival e ciliar, dor e fotofobia. As recidivas frequentes decorrem, provavelmente, da ruptura do cisto e liberação dos parasitas (Amato et al.,1995; Remington et al.,1995). Em pacientes imunocompetentes é responsável por 30 a 50% dos casos (Villard et al., 2003; Copeland et al., 2006). Algumas complicações da toxoplasmose ocular incluem catarata, glaucoma, edema macular cistóideo, desprendimento de retina, atrofia do nervo óptico e nova vasculatura coroidal em estádios avançados (Garweg e Candolfi, 2009).

Os fatores que controlam a ocorrência, a gravidade e a recorrência da doença ocular não são bem compreendidos, embora uma variedade de componentes, incluindo a susceptibilidade genética do hospedeiro, o estado do sistema imune, a carga parasitária e o genótipo do parasita têm sido sugeridos como possivelmente envolvidos na infecção. Os parâmetros imunológicos e genéticos podem desempenhar papéis significativos na patogênese da doença ou na eliminação de *T. gondii* dos tecidos infectados (Holland, 2008; Cordeiro et al., 2008). Um dos fatores importantes para a resistência dos pacientes à toxoplasmose ocular está associado à capacidade de produzir IFN- $\gamma$  contra antígenos parasitários, pois essa citocina é responsável pela distribuição de *T. gondii* nos olhos. Pacientes com toxoplasmose ocular apresentaram níveis de IFN- $\gamma$  menores quando comparados a assintomáticas (Meira et al., 2014; Maia et al., 2017).

### **1.9.3. Toxoplasmose cerebral**

Devido ao caráter oportunista do parasita, outro grupo seriamente afetado pela doença é o de indivíduos em uso de drogas imunossupressoras como os transplantados, pacientes com doenças linfoproliferativas e com deficiência na imunidade celular como os portadores do vírus da

imunodeficiência humana (HIV) (Liesenfeld et al., 1999; Ferreira, 2000, Dunay et al., 2018).

A toxoplasmose cerebral ocorre principalmente com a reativação da infecção latente, produzindo ruptura dos cistos e proliferação dos taquizoítos, devido à imunidade baixa (Yenilmez e Çetinkaya, 2019). Essa reativação da infecção se resalta em pessoas com deficiência imunológica, o que acontece em pacientes soropositivos para HIV, que foram parasitados previamente com *T. gondii*. Isso ocorre quando a imunodepressão celular é intensa, cuja contagem de linfócitos T CD4 é inferior a 100/mm<sup>3</sup>, podendo ocorrer à toxoplasmose cerebral como primeira manifestação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids) (Hernández- González et al, 2002).

Em pacientes com aids, a toxoplasmose costuma ser a infecção oportunista mais comum do sistema nervoso central (SNC) e as lesões neurológicas são evidenciadas em até 90% dos casos de aids submetidos à necropsia, sendo a toxoplasmose cerebral a causa de óbito frequente (Camara et al, 2003; Pereira-Chiocola et al., 2009).

O SNC é o local mais afetado pela infecção, no qual a encefalite toxoplásmica é a mais importante manifestação da doença, causando severos danos ao paciente (Pereira-Chiocola et al., 2009; Connolly et al., 2017). A apresentação clínica da encefalite por toxoplasma classicamente apresenta-se como um processo subagudo, porém cerca de 10% dos casos podem se manifestar agudamente. Manifestações clínicas incluem mudanças no estado mental, apreensões, déficits motores focais, distúrbios de nervos cranianos, anomalias sensoriais, desordens de movimento e achados neuropsiquiátricos. O achado focal mais típico é hemiparesia e alterações de fala (Bowen et al., 2016; Ruiz, 2016). As manifestações clínicas dependem principalmente da topografia e número de lesões e na ausência de tratamento, a progressão de anormalidades neurológicas pode ser fatal (Vidal, 2019). No estado de São Paulo, 25,4% de 71 pacientes soropositivos morreram devido à toxoplasmose, durante os anos de 1998 a 2002 (Nogueira, 2005).

#### **1.9.4. Toxoplasmose congênita**

A infecção congênita se caracteriza pela transmissão do parasita ao feto via placenta. Esta forma de infecção ocorre geralmente quando a mulher desenvolve infecção primária durante a gestação, que apesar da parasitemia temporária, raramente tem sintomas (Hill et al., 2005). Entretanto, quando este contato se efetua num período anterior ao acontecimento da concepção, anticorpos são formados e dificilmente o feto será infectado (Kravetz e Federman, 2005).

A gravidade da toxoplasmose congênita está relacionada com o período de infecção. A infecção adquirida durante o primeiro trimestre é mais severa do que aquela adquirida no segundo e terceiro trimestre (Remington et al., 1995). Um amplo espectro clínico ocorre na infecção congênita, levando a um conjunto de manifestações, variando entre coriorretinite branda, que pode se apresentar muitos anos após o nascimento, a quadros mais severos com o aparecimento da tetrade de Sabin. A clássica tetrade de Sabin, composta por alterações do volume craniano (hidrocefalia ou microcefalia), coriorretinite (geralmente bilateral, macular ou perimacular, simétrica), calcificações intracranianas e retardamento mental. A toxoplasmose congênita pode permanecer latente por vários anos e mais adiante reativar. Destas, a doença ocular é a seqüela mais comum e a hidrocefalia a mais rara, porém, mais significativa (Carruthers, 2002; Kravetz e Federman, 2005; Petersen, 2007).

#### **1.9.5. Toxoplasmose disseminada**

Uma das formas mais graves é a toxoplasmose disseminada, que é definida quando a infecção acomete mais de dois sistemas de órgãos (Medeiros et al., 2001). Como múltiplos sistemas são envolvidos, qualquer órgão pode ser acometido e podem ocorrer quadros semelhantes à sepse ou

choque séptico (Barbosa et al., 2007). Apesar de infrequente, está associada a um pior prognóstico (Schmidt, 2013). A disseminação geralmente ocorre devido à exposição aguda ao *T. gondii* e pode ocorrer em grupos de pacientes com diferentes causas de imunossupressão (Medeiros et al., 2001; Botterel et al., 2002; Weiss e Dubey, 2009). Entretanto, os óbitos causados pela toxoplasmose disseminada são atribuídos ao acometimento SNC (Al-Kassab et al., 1995). Formas fulminantes são descritas e com diagnóstico muitas vezes confirmado apenas por autópsia. Os órgãos mais acometidos incluem o cérebro, os pulmões, o coração e o sistema músculo esquelético (Medeiros et al., 2001; Schmidt, 2013).

A apresentação clínica pode incluir sintomas gripais, linfadenomegalias, febre, artralgia, mialgia, fadiga, hepatoesplenomegalia e rash maculopapular. O paciente apresenta inicialmente rash maculopapular e 15 dias depois tosse não produtiva, com estertores crepitantes bilaterais e sinais de insuficiência respiratória aguda. Pode haver ainda mialgia e aumento de creatinofosfoquinase, aumento do lactato desidrogenase e plaquetopenia (Bossi et al., 2000).

Pacientes infectados com HIV que apresentem quadros sépticos com febre de origem indeterminada e com as características apresentadas devem ser investigados quanto à possibilidade de quadro de disseminação de *T. gondii* (Albrecht et al., 1995). Poucos dados são disponíveis sobre a magnitude da toxoplasmose disseminada em pacientes infectados com HIV, nem dos doentes com toxoplasmose cerebral, que também apresentavam comprometimento de outros órgãos por *T. gondii* (Gadea et al., 1995; Bastos da Silva et al., 2016).

Nos pacientes com HIV, a maioria dos casos são diagnosticados apenas por autópsias, para o melhor entendimento da evolução natural da doença e da acurácia do diagnóstico clínico estabelecendo-se diagnóstico diferencial com outras infecções oportunistas (Albrecht et al., 1995; Arnold et al., 1997; Barbosa et al., 2007). O diagnóstico depende de um conjunto de sintomas clínicos, radiológicos e laboratoriais. Todavia, requer um alto índice de

suspeição devido à inespecificidade do quadro clínico, laboratorial e a possível confusão com outras doenças oportunistas (Mastroianni et al., 1997).

Estudos de séries de autópsias demonstraram a relevância e gravidade desta patologia nos pacientes com HIV/aids. Estudos mostram que grande parte dos pacientes com HIV/aids que foram à óbito por toxoplasmose possuíam também comprometimento pulmonar (Liu et al., 1995; Gadea et al., 1995). Estes dados sugerem que pacientes inicialmente diagnosticados como toxoplasmose cerebral podem ter quadros disseminados da doença. Muitos desses casos de acometimento pulmonar não tinham sintomas clínicos respiratórios evidentes (Gadea et al., 1995). Após o envolvimento do SNC, os órgãos mais frequentemente danificados são os pulmões e o miocárdio (Rabaud et al., 1994; Liu et al., 1995). Existem ainda casos descritos de doença disseminada com acometimento do fígado, estômago, cólon, pâncreas, rins e testículos (Rabaud et al., 1994).

## **1.10. Diagnóstico da toxoplasmose**

### **1.10.1. Clínico**

Na toxoplasmose adquirida, a manifestação clínica mais comum na criança e/ou adulto imunocompetente é um quadro semelhante à mononucleose infecciosa, com adenopatias acompanhadas de febre baixa e o quadro é de evolução benigna na maioria dos casos, com resolução espontânea (Frenkel, 2010). Os sintomas da toxoplasmose aguda em gestantes podem ser transitórios, inespecíficos e subclínicos. A possibilidade de transmissão fetal é remota quando a toxoplasmose é adquirida antes da concepção. Os distúrbios oculares e neurológicos são exemplos comuns observados neste tipo de reativação clínica (Amato et al., 1995). Em imunodeprimidos, essas manifestações clínicas são encontradas com frequência, provavelmente pela reativação das formas latentes dos cistos contendo bradizoítos. Tal processo revela ser *T. gondii* um agente de caráter oportunista.

## **1.10.2. Laboratorial**

O diagnóstico laboratorial da toxoplasmose é baseado na pesquisa de anticorpos contra por testes sorológicos e pela detecção do DNA do parasita.

### **1.10.2.1. Sorológico**

A resposta imune à toxoplasmose pode ser natural ou adquirida. Quando um hospedeiro se infecta com o parasita, após a multiplicação, segue-se a sua disseminação por todo o organismo através de vasos sanguíneos e linfáticos. Durante este período inicia-se a formação de anticorpos específicos e o desenvolvimento de mecanismos celulares de defesa. Portanto, os exames sorológicos são os mais utilizados no diagnóstico da toxoplasmose. Estes se baseiam principalmente na detecção de anticorpos específicos e a presença desses anticorpos durante a infecção permite a análise de perfis sorológicos característicos quer seja na infecção recente (fase aguda) ou infecção tardia (fase crônica) (Contreras et al., 2000).

As técnicas mais utilizadas no diagnóstico sorológico da toxoplasmose atualmente são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Ambos os testes apresentam boa especificidade e sensibilidade nas fases aguda (pesquisa de anticorpos IgM) e crônica (pesquisa de anticorpos IgG) (Montoya et al., 2004).

O ELISA trouxe um grande avanço para o diagnóstico da doença. Além de elevada sensibilidade e especificidade, tem como vantagem a rapidez, simplicidade da técnica, versatilidade e objetividade de leitura. Detecta quantidades extremamente pequenas de anticorpos, podendo ter elevada precisão se os reagentes e os parâmetros do ensaio forem bem padronizados (Sanchez, 2001; Camargo, 2001).

O diagnóstico da toxoplasmose aguda é baseado na demonstração de um aumento significativo no nível de anticorpos IgG e/ou na presença de anticorpos IgM. Entretanto, a elevada prevalência de anticorpos IgG entre indivíduos saudáveis na maioria da população e a persistência de anticorpos IgM por longos períodos em algumas pessoas têm complicado a interpretação dos testes sorológicos quando há suspeita de toxoplasmose aguda (Remington et al.,1995).

Hedman et al. (1989) introduziram o teste ELISA-avidez de IgG com objetivo de diagnosticar uma infecção recentemente adquirida. Para a avaliação da avidez, a técnica se baseia na 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, utilizadas para diluir o soro teste ou adicionadas após a formação do complexo antígeno-anticorpo. O tratamento com ureia é considerado o mais simples e eficiente na medida da avidez dos anticorpos IgG. É um método altamente sensível e específico na identificação de infecção primária aguda por *T. gondii* durante a gravidez (Jenum et al., 1998).

A RIFI é considerada de boa especificidade e sensibilidade. Essa reação tem a vantagem de utilizar parasitas preservados, fixados em lâminas de microscopia, tornando-a muito mais prática e segura para a rotina laboratorial. Esse teste permite a identificação dos anticorpos segundo as classes de imunoglobulinas. Pode apresentar resultados falsos-positivos de anticorpos IgM pela interferência de fatores reumatóides, eventualmente presentes no soro. Para minimizar esses resultados falsos, são indicados os métodos que usam o princípio de captura de IgM e o RFRR (Rheumatoid Factor Removal Reagent) na RIFI (Camargo et al.,2001).



### 1.10.2.2. Molecular

A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser utilizada para detecção de alterações genéticas ou infecções por diferentes agentes etiológicos. Estudos sobre o genoma de *T. gondii* tornou possível a utilização da PCR para a detecção do parasita (Bastien, 2002). Estudos têm demonstrado a aplicabilidade da PCR convencional (PCR) ou PCR em tempo real (qPCR) no diagnóstico da toxoplasmose utilizando diferentes alvos de PCR, como os genes de taquizoítos que codificam proteínas específicas, gene B1 e P30, genes de DNA ribossômico 529-bp e o REP-529. (Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005; Mesquita et al., 2010; Murat et al., 2013; Anselmo et al., 2014; Robert-Gangneux e Belaz, 2016; Camilo et al., 2017). Os métodos moleculares são importantes ferramentas para complementar o diagnóstico da toxoplasmose. A PCR revolucionou o diagnóstico pré-natal da toxoplasmose congênita, uma vez que limita o uso de métodos invasivos no feto (Remington et al., 2004). Também tem a capacidade de amplificar fragmentos específicos de DNA a partir de fluidos corporais diferentes, tais como sangue, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, humor aquoso, fluido de lavado bronco-alveolar, dentre outros (Vidal et al., 2004; Colombo et al., 2005). A PCR pode ser utilizada em todas as formas de toxoplasmose sintomática. Tal diagnóstico é rápido e tem proporcionado, também, um tratamento preciso e específico, evitando ou reduzindo graves danos causados por *T. gondii* (Vidal et al., 2004).

### 1.11. Tratamento

O tratamento da toxoplasmose normalmente inclui combinações de dois antimicrobianos, mais frequentemente inibidores da diidrofolato reductase (DHFR) (pirimetamina e trimetoprima) e diidropteroato sintetase (sulfonamidas, como sulfadiazina, sulfametoxazol e sulfadoxina), que bloqueiam a síntese de ácido fólico. A pirimetamina, um inibidor chave de DHFR, é a droga mais eficaz contra *T. gondii*. O padrão-ouro inclui pirimetamina e sulfadiazina, porém a

pirimetamina pode ser combinada com clindamicina, atovaquona, claritromicina ou azitromicina (Dunay et al., 2018).

### **1.12. Resposta imune na toxoplasmose**

A resposta imune a um microrganismo pode ser inata ou adquirida. A imunidade inata é responsável pela proteção inicial contra as infecções, estando preparada para bloquear a entrada de microrganismos e eliminar rapidamente aqueles que conseguem entrar nos tecidos do hospedeiro. As células que representam a imunidade inata são os macrófagos, células natural killer (NK) e os polimorfonucleares. A imunidade adquirida se desenvolve mais lentamente e proporciona uma defesa mais especializada e mais eficaz contra as infecções, pois requer a expansão e a diferenciação de linfócitos em resposta a microrganismos antes que ela possa oferecer uma defesa eficaz, isto é, ela se adapta à presença dos invasores microbianos. A imunidade inata é filogeneticamente mais antiga, e o sistema imunológico adaptativo mais especializado evoluiu posteriormente (Abbas, 2001).

*T. gondii* induz resposta imune hospedeira consistente e duradoura buscando o controle da proliferação dos taquizoítos. Quando a infecção é adquirida, ela ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados com *T. gondii*, onde oocistos esporulados ou cistos contendo bradizoítos são liberados seguindo a ação combinada de ácidos biliares, tripsinas, pH e outros componentes presentes no sistema digestório (Besteiro, 2019). Após a digestão do oocisto ou da parede do cisto contendo bradizoítos, os parasitas são liberados no lúmen do intestino delgado. Esporozoítos ou bradizoítos invadem os enterócitos do intestino delgado, onde se diferenciam em taquizoítos e replicam rapidamente. A adesão e invasão na célula hospedeira são eventos cruciais para o estabelecimento da infecção. Inicialmente, por meio do polo anterior (conóide) o parasita estabelece contato com a superfície da célula hospedeira desencadeando a invaginação da membrana celular, o processo de invasão se inicia por meio de adesão sobre a superfície da célula

hospedeira e a exocitose de proteínas presentes nos micronemas e nas roptrias (Carruthers et al., 1997; Alexander et al., 2005).

Após a invasão dos enterócitos, quimiocinas são liberadas pelos enterócitos infectados, resultando no recrutamento de uma variedade de leucócitos em resposta à infecção parasitária (Buzoni-Gatel et al., 2001; Mennechet et al., 2002). Uma vez que *T. gondii* chega à lâmina própria, os parasitas encontram tanto as células imunes residentes como as recrutadas que auxiliam na produção de citocinas e apresentação de antígenos (Buzoni-Gatel et al., 2006).

Os mecanismos de defesa ativados nesta fase precoce da infecção são inespecíficos, porém importantes para a organização da resposta específica. Algumas citocinas têm um papel importante nessa fase. A interleucina-12 (IL-12) tem uma variedade de efeitos nas células imunes, incluindo a produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), citotoxicidade mediada por células NK, proliferação e diferenciação celular (Kobayashi et al., 1989). As células NK estão envolvidas na imunidade inata durante a infecção aguda por *T. gondii* (Ivanova et al., 2019). Os neutrófilos e os monócitos inflamatórios são as primeiras células que vão para o lúmen do intestino delgado de camundongos infectados (Gregg et al., 2013; Coombes et al., 2013). Os neutrófilos são reconhecidos como principais componentes da resposta ao *T. gondii* por sua contribuição na eliminação de parasitas por uma série de mecanismos de migração e liberação de citocinas (Debierre-Grockiego et al., 2020). No local da infecção os monócitos inflamatórios podem se diferenciar em macrófagos ou em células dendríticas (Muller et al., 1999). Estas células ajudam na eliminação do parasita fagocitando, recrutando e estimulando a apresentação de antígenos (Bliss et al., 2000; Wang, Jin-Lei et al., 2019). Assim como as células dendríticas, *T. gondii* também possui a capacidade de modificar o fenótipo de monócitos e macrófagos infectados, aumentando sua mobilidade, marginalização e extravasamento (Da Gama et al., 2004; Ueno et al., 2014). IL-12 estimula as NK a produzirem IFN- $\gamma$ , que por sua vez estimulam a atividade microbicida dos macrófagos (Cordeiro et al., 2008).

A imunidade celular mediada pelos linfócitos T atua como mecanismo de defesa contra microrganismos que sobrevivem dentro de células infectadas, onde estão protegidos de anticorpos. Em resposta à estimulação antigênica, os linfócitos TCD4 liberam citocinas que estimulam a proliferação e a diferenciação de linfócitos T, linfócitos B e macrófagos. Os linfócitos T citotóxicos eliminam células infectadas por microrganismos intracelulares. Os linfócitos Th são divididos em Th1, Th2 e Th17. Linfócitos T CD4 são essenciais em ambas às respostas, as quais medeiam tanto à resposta imune celular, quanto a humoral respectivamente e diferem de acordo com as citocinas que sintetizam. Células Th1 produzem IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . As células de perfil Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 e são responsáveis pela defesa contra infecções por helmintos, artrópodes e por reações alérgicas (Cordeiro et al., 2008). A diferenciação de linfócitos Th17 é estimulada por TGF $\beta$ , IL1 e IL6. Eles exercem um efeito pró-inflamatório, no entanto, as funções dos linfócitos Th17 não são totalmente compreendidas. A IL17 é a principal citocina da subpopulação de linfócitos Th17 (Gaffen, 2011). Na toxoplasmose, a citocina chave para a resistência é a IFN- $\gamma$  envolvendo as atividades das células T CD4 e T citotóxicas, caracterizando resposta tipo Th1.

As células dendríticas controlam a magnitude e a qualidade da resposta Th1 com a produção de IL-12 (Scott e Hunter, 2002). A IL-27 também induz a produção de IFN- $\gamma$ , podendo atuar em sinergia com a IL-12, aumentando essa atividade. Tanto parasitas íntegros quanto antígenos solúveis são capazes de induzir a produção de IL-12 e, desta forma estimular células efetoras como linfócitos T e NK a produzir IFN- $\gamma$  (Buzoni-Gatel et al., 2006).

Os receptores de IL-17 estão presentes em várias células, incluindo células imunes. Sua estimulação induz a expressão de várias citocinas e quimiocinas, levando ao recrutamento e maturação de neutrófilos. A IL-17 também atua em células não imunes, como fibroblastos, células epiteliais e induz a produção de Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) e prostaglandinas, aumentando a maturação dos granulócitos e do processo inflamatório (Chen, et al., 2008). Além disso, a IL-17 também desencadeia o recrutamento e ativação de neutrófilos, monócitos e células NK para o local da infecção através da produção de IL-8, IL-6 e de NO (Ye et al., 2001; Cua et al., 2010).

A secreção de IL-6 representa importante fator de resistência contra a infecção precoce (Jebbari et al., 1998). As células Th2 participam da regulação da resposta imune pela secreção de IL-4 (Roberts et al., 1996) e IL-10 que modulam a síntese tanto de IL-12 quanto de IFN- $\gamma$ . Assim, respostas imunes excessivas que predisõem a sérias inflamações e as lesões teciduais podem ser evitadas (Neyer et al., 1997). Por outro lado, o fator beta transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) e IL-10 podem diminuir a atividade de macrófagos e células NK levando a exacerbação da infecção (Hunter et al., 1995).

Dessa forma, a ativação do sistema imune acontece por vários mecanismos. Além do reconhecimento de antígenos de *T. gondii*, a lesão celular e citólise geram sinais não específicos que alertam as células fagocitárias da presença do agressor (Scott et al., 2002). Como parasita intracelular obrigatório, a imunidade mediada por células é a principal defesa do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii*.

### **1.13 Organelas secretórias e antígenos de *T. gondii***

Os componentes imunogênicos de *T. gondii* estão predominantemente distribuídos na membrana plasmática compreendendo os antígenos de superfície (SAG) e compartimentalizados nas organelas secretórias, sendo liberadas no momento da invasão celular. A superfície celular externa dos taquizoítos é recoberta com proteínas de peso molecular variando de 22 a 43 kDa, que ancoradas na membrana por pontes de glicosilfosfatidilinositol (Tomavo et al., 1993). Coletivamente estes antígenos são conhecidos como superfamília de proteínas SRS (sequências 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 (Grimwood e Smith, 1995). A expressão dessas proteínas é regulada de acordo com a fase do desenvolvimento biológico do parasita. As proteínas SAG1, SAG2A e SAG3 (P43) são exclusivamente produzidas por taquizoítos (Gross et al., 1996).

De maneira geral, *T. gondii* excreta/secretora uma grande variedade de proteínas. Várias já foram descritas e exercem importantes funções na invasão, replicação e manutenção dos parasitas na célula hospedeira (Carruthers, 1999). A estas proteínas ou antígenos denominam-se de excreção/secreção ou ESAs, sua expressão e consequente estimulação do sistema imune hospedeiro constituem em um importante elemento de estudo na toxoplasmose (Costa-Silva et al., 2008; Meira et al., 2008; Pereira-Chiocola et al., 2009).

### **1.13.1 Micronemas**

Os micronemas são estruturas cilíndricas localizadas no terço anterior do corpo do parasita (Carruthers, 1999). Promovem motilidade, ligação e interação parasita-hospedeiro pela produção de antígenos de excreção/secreção. A produção destes antígenos é regulada por estas interações parasita-hospedeiro e por níveis de cálcio intracelular do parasita (Wan et al., 1997; Carruthers e Sibley, 1999). As proteínas dos micronemas pertencem à família TRAP (proteína anônima relacionada à trombospondina) que se caracteriza por exibir um domínio transmembrana que age como uma âncora molecular para o movimento de *gliding* do parasita. Esse domínio corresponde ao tipo EGF (fator de crescimento epidermal) e confere a essas proteínas funções adesivas e de interações receptor-ligante (Kappe et al., 1999).

### **1.13.2 Roptrias**

As roptrias são organelas secretórias eletrodensas delimitadas por membranas (Perkins, 1992). Suas proteínas participam do processo de ataque e invasão das células hospedeiras por taquizoítos e de processos de biogêneses de vacúolos parasitóforos (Carruthers, 1999). A secreção destas proteínas ocorre no momento da união apical, antes da penetração na célula hospedeira (Carruthers e Sibley, 1997). Ensaios de imunocitoquímica revelam

que os conteúdos das roptrias não são homogêneos. Algumas proteínas se localizam na região basal da organela e outras na porção apical (Blackman e Bannister, 2001).

### **1.13.3 Grânulos densos**

Os grânulos densos são organelas esféricas distribuídas pelo citoplasma do parasita com uma média de diâmetro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Carruthers, 1999). Sua matriz é eletrodensa devido à alta concentração de proteínas (Souza, 2006). Carruthers e Sibley (1997) mostraram que a secreção de proteínas dos grânulos densos ocorre após a invasão do parasita. Diferentemente da secreção dos micronemas e roptrias que ocorre na região apical, a secreção de grânulos densos ocorre nas regiões laterais do protozoário (Souza, 2006). Pouco é o conhecimento sobre a função precisa das proteínas dos grânulos densos (Adjogble et al., 2004), sabe-se que as proteínas secretadas associam-se com a membrana do vacúolo parasitóforo e com a rede membranosa vacuolar derivada do parasita (Souza, 2006). Estas proteínas (GRA) promovem a replicação intracelular, possivelmente por meio do transporte e processamento de nutrientes que são retirados da célula hospedeira (Carruthers, 1999).

### **1.14 Vesículas extracelulares**

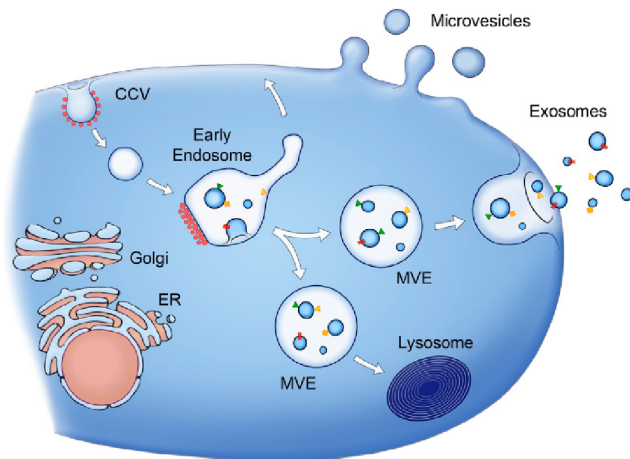
Vesículas extracelulares (EVs) são partículas liberadas por células procarióticas e eucarióticas, delimitadas por uma bicamada lipídica e que não são capazes de replicar (Théry et al., 2018). Organismos pluricelulares são capazes de se comunicar pela transferência destas moléculas secretadas. Essa comunicação é mediada por hormônios, citocinas e células neurológicas com o objetivo de sincronizar as atividades metabólicas. Tais funções são fundamentais para a sobrevivência e estabilidade celular (Raposo e Stoorvogel, 2013). Um dos mecanismos de comunicação que não implica a aderência

celular e envolve a comunicação intercelular é a transferência das EVs. As células liberam para o meio extracelular diversos tipos de partículas vesiculares de origem endossomal ou produzidas na membrana, tanto de forma fisiológica quanto por ativação celular ou apoptose (Hristov et al., 2004), sendo um processo que parece ser preservado ao longo da evolução (Colombo et al., 2014). As EVs podem ser classificadas em três categorias principais de acordo com o tamanho, conteúdo e biogênese: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Théry et al., 2018).

#### **1.14.1. Classes de Evs**

As EVs circulam através de muitos fluidos corporais, incluindo plasma, sangue e urina (Arraud et al., 2014; Panteleev et al., 2017; Merchant et al., 2017), por isso são alvos de biomarcadores (Raposo e Stoorvogel, 2013). As microvesículas e exossomos são distintas, tanto em tamanho quanto em mecanismo de formação. A biogênese das microvesículas envolve o tráfico vertical de carga molecular para a membrana plasmática, uma redistribuição de lipídios da membrana, e o uso do maquinário na superfície para permitir a compressão das vesículas (D'Souza-Schorey e Clancy, 2012). Os exossomos são derivados de membranas endossomal, são semelhantes em tamanho ao seu endossomo e precursores da vesícula intraluminal, sendo observados por microscopia eletrônica (Harding et al., 1983; Colombo et al., 2014). As microvesículas são formadas por brotação direta da membrana plasmática, não possuindo um limite de tamanho e podem chegar a microns de diâmetro (Colombo et al., 2014) como mostra a Figura 8.





**Figura 8.** Liberação de microvesículas e exossomos. As microvesículas são EVs liberadas pela membrana plasmática e os exossomos são provenientes de endossomos multivesiculares. As microvesículas (MVS) surgem pelo brotamento de vesículas enquanto os exossomos são pequenas vesículas de diferentes tamanhos formados pelo brotamento de endossomos precoces. São liberados pela fusão de corpos multivesiculares (MVEs) com a membrana plasmática. Outros MVEs também podem se fundir com os lisossomos. Os ligantes e proteínas associadas às membranas são identificados como triângulos, quadrados e retângulos coloridos na figura. **Fonte:** Raposo e Stoorvogel, 2013.

### 1.14.1.1 Exossomos

Exossomos compõem a classe de vesículas que deriva do compartimento endossomal e apresentam entre 30 a 100 nanômetros (nm) e são geralmente isolados por ultracentrifugação (Stoorvogel et al., 2002; Théry et al., 2006). Elas se formam dentro de canais intraluminais que são geradas dentro de corpos multivesiculares, fazendo parte do complexo endocítico celular. Os corpos multivesiculares podem se fundir com os lisossomos para degradação ou viajar para a membrana plasmática, onde as moléculas podem ser liberadas para o espaço extracelular (Adell et al., 2014). Apresenta proteínas como integrinas, tetraspaninas (proteínas transmembranas), com o envolvimento de CD9, CD63, CD81 e CD82 (cluster of differentiation), que desempenham um papel na classificação proteica para os exossomos (Cocucci et al., 2009). A presença de integrinas, grupamento de diferenciação e outros receptores e moléculas de adesão permitem a interação dessas vesículas com

as células (Théry et al., 2009). A universalidade dos exossomos e suas numerosas aplicações possíveis na medicina (diagnósticos ou tratamento) lhes renderam uma visibilidade especial. Evidências indicam que eles desempenham papéis funcionais em vários tipos de câncer, doenças metabólicas, doenças autoimunes, distúrbios neurológicos, doenças Molecularcardiovasculares, dentre outros (Van der Pol et al., 2012; Bellingham et al., 2012; Raposo e Stoorvogel, 2013).

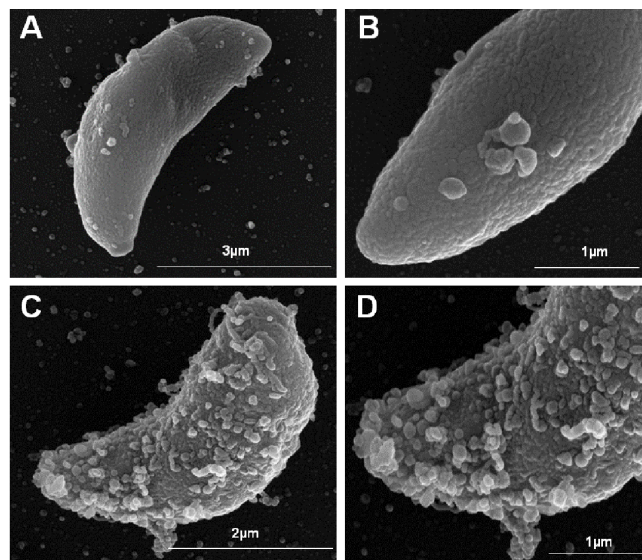
Tanto os exossomos, quanto as microvesículas participam de diferentes funções como transferência de macromoléculas, biomarcadores que podem interagir com moléculas específicas do sistema imunológico e outras (Schwab et al., 2015; Xu et al., 2016).

#### **1.14.1.2 Microvesículas**

Microvesículas são capazes de encapsular e transferir múltiplas formas de carga, incluindo proteínas, RNA, microRNAs (miRNAs) e podem transferir ou reportar funções para células receptoras na forma de DNA plasmidial (Kanada et al., 2015). O derramamento, ou “*shedding*” das microvesículas é um fenômeno fisiológico que acompanha a ativação e o crescimento celular, estimulada por eventos que levam a injúria da célula como estresse físico ou químico (Ratajczak et al., 2006). A membrana plasmática sofre vários rearranjos moleculares nos locais de origem das microvesículas, que resultam no brotamento da membrana, incluindo mudanças na composição lipídica, protéica e nos níveis de cálcio (Piccin et al., 2007; Pan et al., 2009). São maiores que os exossomos, geralmente entre 100 nm e 1000 nm de diâmetro. Um marcador eficiente na indicação de microvesículas é a fosfatidilserina (Théry et al., 2009).

#### **1.15 Vesículas extracelulares em parasitas**

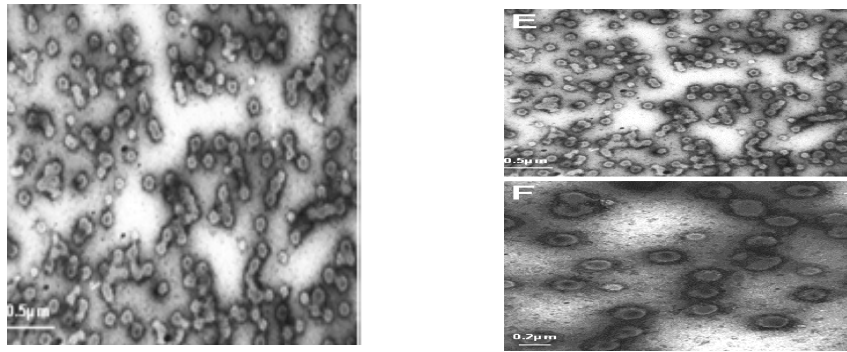
A produção de EVs foi descrita em diversos parasitas. Comparando a descrição das EVs liberadas por células humanas, há um número menor de publicações sobre EVs de parasitas. As EVs de alguns protozoários foram descritas, como *Leishmania spp* (Schnitzer et al., 2010; Cronemberger-Andrade et al., 2013), *Trypanosoma cruzi* (Troccoli Torrecilhas et al., 2009), *Plasmodium spp* (Campos et al., 2015), *Trichomonas vaginalis* (Twu et al., 2013) e *T. gondii* (Silva et al., 2018). Nas Figuras 9 e 10, é possível visualizar as EVs liberadas por *T. gondii* por microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, respectivamente. Os exossomos produzidos por parasitas auxiliam na sua entrada na célula hospedeira interferindo nos aspectos imunológicos (Bhatnagar et al., 2007; Mantel et al., 2013; Coakley et al., 2015).



**Figura 9.** Liberação de EVs de *Toxoplasma gondii* pela membrana. Os quadros de A a D mostram imagens capturadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de tachizoítos da cepa RH liberando EVs após incubação em meio de cultura durante 2 h (A e B) e 24 h (C e D). Ampliação: (A) 54.619; (B) 104.767; (C) 76.191 e (D) 108.169. **Fonte:** Silva et al., 2018.

**A**

**B**



**Figura 10.** Imagens capturadas por microscopia eletrônica de transmissão de EVs de *Toxoplasma gondii*. Ampliação 25.000 (E) e 60.000 (F). **Fonte:** Silva et al., 2018.

### 1.16 microRNA (miRNA)

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes de proteínas que apresentam em média 22 nucleotídeos (Bartel, 2004). O primeiro miRNA descrito foi o lin-4, um gene conhecido por controlar o tempo de desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans* que não codificava uma proteína, mas um par de pequenos RNAs. Assim, o lin-4 foi reconhecido como o fundador de uma classe abundante de pequenos RNAs reguladores chamados miRNAs, exercendo um papel importante na expressão gênica em células de eucariontes (Bartel, 2004). São altamente conservados entre as espécies e modulam a expressão gênica através da inibição traducional ou degradação de RNAs mensageiros (mRNA) (Bartel, 2009). O bloqueio traducional do mRNA ocorre pelo incompleto pareamento de bases e a degradação por exonucleases acontece quando a complementaridade é completa ou quase completa. O mecanismo de clivagem do mRNA pode ser irreversível, diferentemente do bloqueio traducional (Wu et al., 2006, Cowland et al., 2007). Um único miRNA pode atingir centenas de mRNAs, regulando assim redes inteiras de proteínas (Sobolewski et al., 2015; Gjorgjieva et al., 2019). Os papéis reguladores dos miRNAs foram identificados não apenas no tempo de desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação e apoptose, mas também na tumorigênese e nas interações patógeno-hospedeiro (Cai et al., 2009). Eles também são liberados das células em vesículas extracelulares, como os exossomos, permitindo que os miRNAs participem da comunicação

intercelular e devido a essa característica o papel dos miRNAs nos exossomos está ganhando cada vez mais atenção (Bayraktar et al., 2017).

### 1.17 Justificativa

O sucesso do parasitismo está relacionado à capacidade do parasita em manter seu ciclo de vida e causar uma infecção duradoura através de estratégias de organização e escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Por outro lado, a relação entre o parasita e hospedeiro possui natureza complexa, pois ao longo do processo de infecção, ocorre uma intensa troca de sinais entre *T. gondii* e a célula hospedeira que regulam reciprocamente processos celulares/metabólicos em ambos os organismos. O parasita, desde o processo de penetração celular, modifica as estruturas celulares, altera a regulação da transcrição gênica e do ciclo celular das células infectadas. As mudanças na célula hospedeira, particularmente as de expressão gênica, auxiliam a sobrevivência e viabilidade de *T. gondii* (Blader e Saeij, 2009).

Diversos fatores são importantes na regulação da expressão gênica. Um deles são os microRNAs (miRNA), que exercem importante papel na regulação da expressão gênica em células de eucariontes (Bartel, 2004). Os miRNAs são carregados de uma célula para outra através das EVs juntamente com o seu conteúdo (miRNA, proteínas, DNA, lipídios e outros), quando se fundem com a membrana plasmática e em momentos de estresse celular. É cada vez mais evidente que as EVs têm funções especializadas e desempenham um papel chave na coagulação, sinalização intercelular, a gestão de resíduos e sistema imune (Keller et al., 2006).

Estudos recentes mostram que nos parasitas a liberação de EVs pode estar envolvida na interação patógenos hospedeiros, modulando a expressão gênica e na resposta imune do hospedeiro. Provavelmente, as EVs são os primeiros componentes dos parasitas a interagir com células hospedeiras ou microbiota e devem participar ativamente no processo de infecção. Pope e Lasser (2013) demonstraram que fibroblastos humanos

infectados com *T. gondii* liberam EVs, contendo miRNA. Portanto, é possível que *T. gondii* possa liberar diferentes moléculas presentes ou expressas nas EVs para as células e/ou corrente sanguínea de seus hospedeiros. Uma vez que a importância das EVs e/ou exossomos no mecanismo da infecção por *T. gondii* ainda não está totalmente elucidada, justifica-se estudar o papel destas vesículas na patogênese da toxoplasmose.

## 2. OBJETIVO

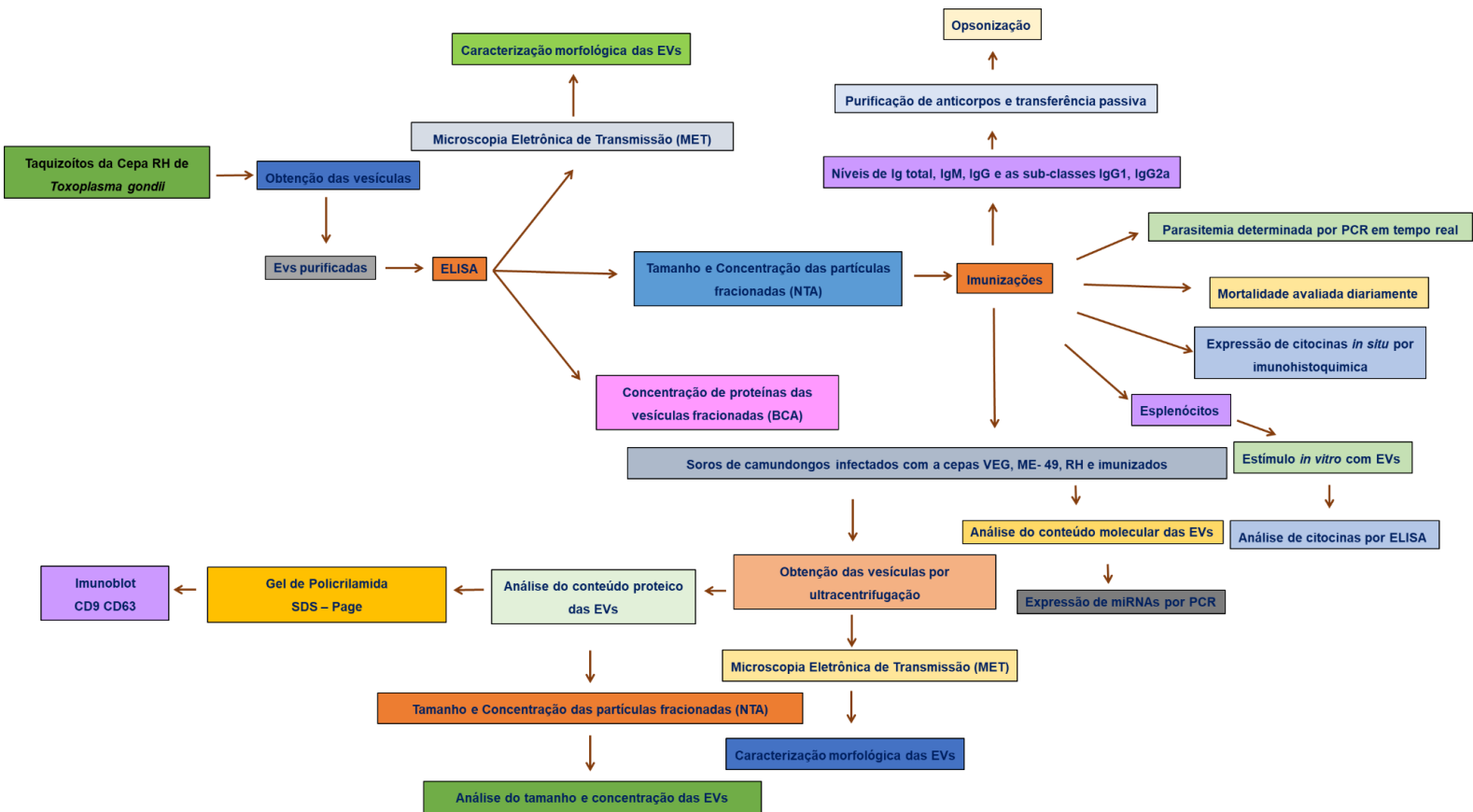
Investigar a participação das EVs de *Toxoplasma gondii* na estimulação das respostas imune humoral e celular na toxoplasmose murina.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir EVs de taquizoítos adaptados às culturas celulares.
2. Imunizar camundongos A/Sn com EVs-toxo.
3. Detectar a classe de anticorpos IgM e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) envolvidas na imunoproteção.
4. Investigar a produção das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em camundongos imunizados.
5. Avaliar os índices de parasitemia e de sobrevida após o desafio com *T. gondii*.
6. Realizar os testes de expressão gênica para os miRNAs: miR-155-5p, miR-29c-3p, miR-125b-5p, miR-9-5p, miR-21-5p, miR-146a-5p nas amostras de soro de camundongos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental





### **3.2 Considerações éticas**

Este trabalho foi aprovado na Plataforma Brasil/CTNBio (CEPIAL) sob parecer 2.922.263 e foi parte do projeto de Pesquisa Regular/Fluxo Contínuo da (FAPESP: 2018/04709-8) com título “Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com o sistema imune em hospedeiros infectados”. (Anexo 1).

### **3.3 Animais experimentais**

Foram utilizados como animais experimentais camundongos isogênicos, fêmeas com idade entre 25 e 30 dias das linhagens A/Sn e Balb/c, provenientes do Biotério de Experimentação do Instituto Adolfo Lutz. Cada grupo de no máximo 5 camundongos foi acondicionado em uma gaiola durante todo o período de experimentação com ração e água. Os animais foram usados para os ensaios de imunização e transferência passiva conforme descrito previamente (Costa-Silva et al., 2008).

### **3.4 Obtenção e manutenção de *T. gondii***

As cepas de *T. gondii* utilizadas neste trabalho foram RH, ME-49 e VEG, que foram mantidas por passagens seriadas em camundongos da linhagem A/Sn.

Também foram utilizados taquizoítos da cepa RH mantidos em culturas de células no Laboratório de Cultura de Células e Parasitas do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

As garrafas de cultura contendo células VERO (células de rim de macaco verde africano) foram mantidas em meio 199 com 10% de soro fetal bovino (SFB), infectadas com  $1 \times 10^5$  de taquizoítos provenientes de outra

garrafa de cultura infectada e mantidas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. A liberação dos taquizoítos nos sobrenadantes das culturas foi observada a cada 24 h com auxílio do microscópio invertido. A seguir, os sobrenadantes foram recolhidos e o número de parasitas foi estimado em câmara de Neubauer e a concentração acertada para 1x10<sup>8</sup> de taquizoítos. Os parasitas foram utilizados para a produção de antígeno lisado, purificação das vesículas/exossomos (EVs), para infecção de outras garrafas de células VERO, para o desafio de camundongos imunizados e para transferência passiva.

A cepa ME-49 é cistogênica e dificilmente é encontrada em forma de taquizoíto no modelo animal. Os animais foram infectados por via oral com cistos provenientes de outros animais infectados.

### **3.5 Produção de antígeno lisado de taquizoítos (ALT)**

O ALT foi purificado como descrito previamente (Colombo et al., 2005; Costa- Silva et al., 2008; Meira et al., 2008). Taquizoítos coletados de culturas de células VERO (1x10<sup>7</sup> taquizoítos/mL) foram sonicados por 10 ciclos a 1,0 A/min, por 5 min com 2 min de intervalo. A seguir, o lisado foi dissolvido em 0,3 M de NaCl e a concentração protéica determinada em espectrofotômetro NanoDrop ND100 (Thermo Fisher Scientific).

### **3.6 Produção e purificação de EVs de *T. gondii* para imunizações**

As EVs foram purificadas a partir de sobrenadantes de culturas de células Vero contendo taquizoítos. Os parasitas foram lavados com 10 ml de PBS a 3000 rpm por 10 min por 5 vezes para a retirada do meio de cultura com 10% SFB. A seguir, os parasitas foram contados e concentrados em 1 mL de meio RPMI sem SFB e incubados por 2 h a 37° C em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Ao final da incubação a solução foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm, o sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0,22 µm para remover

quaisquer detritos celulares foi adicionado inibidor de protease a cada amostra de EVs e estas foram mantidas a -20° C até o momento do uso.

As purificações dos sobrenadantes de cultura contendo EVs foram feitas por cromatografia de exclusão em gel empregando-se a coluna Sepharose CL-4B (1 × 30 cm, GE Healthcare, Piscataway, NJ) pré-equilibrada com acetato de amônio 100 mM, pH 6,5. A seguir, a coluna foi eluída com o mesmo tampão a uma taxa de fluxo de 0,5 mL/min. O produto eluído (cerca de 20 mL) foi coletado em alíquotas de 1 mL.

Alíquotas contendo EVs de *T. gondii* (EVs-toxo) foram selecionadas por ELISA usando como anticorpo um “pool” de 5 soros humanos positivos para toxoplasmose. Para controle negativo, um conjunto de 5 soros humanos negativos para toxoplasmose foi incluído. As reações foram realizadas em placas de microtitulação de poliestireno (Corning), e foram incubadas “overnight” a 4 °C com 50 µL de cada alíquota. Após lavagem com 0,05% de Tween 20-PBS, as placas foram bloqueadas com 5% de PBS - leite. Após 60 min, 50 µL de soro humano, diluído 1:50 em tampão PBS-leite desnatado a 5%, foram incubados por 60 min a 37°C. Após cinco lavagens com solução PBS-Tween 20 a 0,05%, as placas foram incubadas por mais 60 min a 37°C com anticorpo anti-IgG humana produzida em cabra conjugada à peroxidase (Sigma) diluída 1: 20.000 em tampão PBS-leite desnatado a 5% . Em seguida, um novo ciclo de lavagem com solução PBS-Tween 20 a 0,05%, adicionou-se substrato composto por uma mistura de ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M, o-fenilenodiamina 0,05% e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,1%. As placas foram deixadas em repouso à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min. O desenvolvimento da cor foi interrompido pela adição de 100 µL de 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e a absorbância foi medida com um leitor de ELISA com um filtro de 492 nm. Um antígeno lisado de *T. gondii* (ALT), preparado conforme descrito antes, foi utilizado na concentração de 1µg/mL como antígeno de controle.

EVs-toxo foram quantificadas utilizando-se o kit BCA Protein Assay (Pierce, Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante, usando albumina de soro bovino como concentração padrão de proteína. Em seguida, EVs-toxo foram solubilizadas em tampão de lise (SDS a 2%, glicerol a 10%,

2-mercaptoetanol a 5%, Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol a 0,002%), fervidas em termobloco e processados em gel de poliacrilamida-SDS a 10%. A investigação das proteínas de EVs foi realizada após coloração com prata.

### **3.7 Identificação de tamanho e concentração de EVs pela Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)**

A concentração (partículas /mL) e o tamanho das partículas (nm) de EVs-toxo foram avaliados pelo NTA usando o instrumento NanoSight NS300 (Malvern - NanoSight NTA 3.0) do Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental da Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal do Estado de São Paulo. O NanoSight calcula o tamanho e o número de partículas com base no movimento browniano. A produção de EVs foi descrita anteriormente em 3.6. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão de três gravações de vídeo de 30 a 60 seg por amostra. Como o NTA é preciso entre as concentrações de partículas na faixa de  $2 \times 10^7$  a  $2 \times 10^9$  / mL, as amostras de EV foram diluídas antes da análise em PBS filtrado e a concentração relativa calculada de acordo com o fator de diluição.

### **3.8 Identificação por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

As amostras de EVs foram analisadas por MET para caracterização morfológica. Esse experimento foi realizado em colaboração com as pesquisadoras do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Gislene Mitsue Namiyama e Noemi Nosomi Taniwaki.

Para a microscopia as EVs de *T. gondii* foram previamente fixadas em paraformaldeído a 2%/PBS (v:v) por 1 h. Uma gota de suspensão foi colocada na grade e foi realizada a técnica de coloração negativa com 2% de fosfotungstato de potássio a pH 6,8, como descrito anteriormente por Silva et

al. (2018) e Cruz et al. (2020). As grades foram observadas sob um microscópio eletrônico de transmissão JEOL (modelo JEM1011) (JEOL/Massachusetts /EUA) operando a 80 kV. As imagens foram gravadas com uma câmera Gatan 785 ES1000W Erlangshen.

### **3.9 Ensaios de imunização**

#### **3.9.1 Grupos de animais imunizados**

As imunizações foram realizadas como descrito previamente (Costa-Silva et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012). Camundongos A/Sn fêmeas com quatro semanas de idade foram usados para os experimentos de imunização.

Para confirmar a capacidade das EVs-toxo em estimular o sistema imune, também foram realizados ensaios de imunização em um grupo de camundongos Balb / c, com 5 fêmeas de quatro semanas de idade. Os Balb/c foram testados apenas quanto à produção de anticorpos anti-EV, parasitemia e índice de sobrevivência.

O grupo imunizado (EV-IM) foi constituído de 5 camundongos A/Sn, imunizados por via intramuscular com 3 doses quinzenais de 100 µg de EVs-toxo acoplada ao adjuvante ALUM 10 mg de hidróxido de alumínio por animal, dissolvidos em 100 µL de PBS estéril pH 7.2.

### **3.9.2 Grupos controles**

#### **3.9.2.1 Controle negativo**

O grupo controle negativo (N) foi constituído de 5 camundongos A/Sn saudáveis inoculados por via intramuscular, com 3 doses quinzenais de adjuvante ALUM (10 mg de hidróxido de alumínio por animal) dissolvidos em 100 µL de solução salina estéril pH 7.2. As doses foram administradas no mesmo período do que no grupo imunizado.

#### **3.9.2.2 Controle Positivo**

O grupo controle positivo (CHR) foi constituído de 5 camundongos A/Sn infectados com a cepa ME-49. Foram inoculados por via intramuscular com 3 doses quinzenais de 100 µg de EVs acoplada ao adjuvante ALUM 10 mg de hidróxido de alumínio por animal, dissolvidos em 100 µL de solução salina estéril pH 7.2.

Quando necessário a comparação de controle positivo, foram utilizados grupos de camundongos infectados com as cepas RH, VEG ou ME-49. Os camundongos foram utilizados para os experimentos de resposta celular e humoral.

### **3.9.3 Condições de acomodação dos camundongos em fase de experimentação**

Cada grupo de 5 camundongos foi acondicionado em uma gaiola durante todo o período de experimentação com ração e água no Laboratório de Experimentação Animal do Instituto Adolfo Lutz.

### **3.10 Coletas de sangue para obtenção de soro e DNA**

Cada animal foi colocado numa caixa pequena onde somente a cauda ficava para fora. No primeiro dia, uma pequena incisão na ponta da cauda foi realizada com auxílio de uma tesoura cirúrgica esterilizada para coleta de aproximadamente 20-25 µL de sangue com uma pipeta automática. A seguir, a ponta da cauda foi levemente pressionada com o auxílio de uma gaze para que o sangue fosse coagulado. As coletas seguintes, o procedimento foi o mesmo, exceto que, a cicatriz do corte foi suavemente retirada, também, com auxílio da tesoura cirúrgica esterilizada (não foi retirada mais nenhuma parte da cauda dos animais). Este procedimento durou aproximadamente 5 min para cada camundongo.

As coletas foram realizadas após 15 dias de cada imunização. Para as análises sorológicas, as amostras de sangue coletadas foram colocadas em tubos de 1.5 mL, centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e os soros foram retirados. Para as análises moleculares, as amostras de sangue coletadas foram colocadas em tubos de 1.5 mL contendo 20µL de 0,1 mM EDTA pH 7.3 e, posteriormente, utilizadas para extração de DNA. Após o procedimento, todas as amostras foram estocadas a -20° C até o momento do uso. Os soros dos camundongos infectados crônicos foram coletados 50 dias após a infecção por *T. gondii*.

### **3.11 Análise da resposta imune humoral**

#### **3.11.1 Determinação dos níveis de Ig total, IgM e subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a por ELISA detalhar mais**

Com objetivo de avaliar as classes e subclasses de anticorpos produzidos pelos camundongos imunizados com as EVs-toxo, os soros foram avaliados por ELISA utilizando como antígeno o ALT. Como controles foram incluídos nas reações soros de camundongos negativos e de camundongos infectados com a cepa ME-49. Para cada grupo, os soros foram diluídos 1:50.

Depois dos ciclos de lavagens as placas receberam 50 µL/orifício de anticorpos anti- Ig total, IgM e subclasses de IgG: IgG1 e IgG2a de camundongo conjugadas a peroxidase.

### **3.12 Desafio dos camundongos com *T. gondii***

Após 15 dias depois da última imunização, os camundongos dos grupos imunizados e controle negativo foram desafiados com  $1 \times 10^3$  taquizoítos da cepa RH por animal. Após o primeiro dia de infecção, diariamente foi observada a mortalidade dos grupos de camundongos. A partir do 3º dia pós-desafio foi coletado sangue pela veia caudal de cada grupo de animais para extração de DNA com a finalidade de estimar os níveis de parasitemia nos camundongos por qPCR.

### **3.13 Extração de DNA no sangue de camundongos**

Para a extração de DNA, as amostras de sangue foram retirado da veia caudal e centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para retirada de plasma. A fim de realizar a lise de hemácias foi adicionado o tampão ACK (150 mM cloreto de amônio; 1 mM bicarbonato de potássio; 0,1 mM EDTA pH 7.3). Os tubos foram incubados por 10 min sob agitação, à temperatura ambiente. Após uma nova centrifugação por 10 min a 3000 rpm, os sobrenadantes contendo restos de hemácias foram desprezados. A seguir os sedimentos das amostras foram processadas por colunas de afinidade (kit de purificação de DNA Qiagen) conforme instruções do fabricante. As concentrações e qualidade das amostras de DNA foram avaliadas por espectrofotometria em Nanodrop em comprimento de onda 260 e 280 nm e utilizadas na concentração de até 100 ng/µL.



### **3.14 Determinação dos níveis de parasitemia por qPCR**

Após a extração de DNA das amostras de sangue, a presença e a quantificação de parasitas foram realizadas por qPCR como descrita previamente (Camilo et al., 2017). As amplificações foram realizadas utilizando-se o conjunto de iniciadores moleculares para qPCR REP-529, que amplifica uma sequência de 112 pb do genoma de *T. gondii*. Para confirmar a ausência de inibidores da Taq DNA polimerase foi incluído em paralelo, uma reação contendo um conjunto de iniciadores moleculares que amplifica uma região do gene 18S rRNA de eucariotos. As reações foram realizadas no equipamento AriaMx Real-time PCR System em volume final de 20 µL por reação. Os DNAs teste e controles foram adicionados a mistura contendo 10 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix e os iniciadores moleculares (1.25 µL de um “Assay Mix” contendo 18 µM de cada iniciador molecular e 5 µM da sonda). Em todas as reações foram adicionados um controle negativo e um controle positivo cepa RH.

### **3.15 Purificação de anticorpos e opsonização**

Soros em “pool” foram coletados de cada grupo de camundongos (imunizados, crônicos e negativos) e utilizados para purificação em coluna de proteína A. Os soros foram diluídos separadamente em 20 mM de fosfato de sódio 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 0.1 M de ácido cítrico (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 dialisado contra um litro de PBS. A quantificação das proteínas foi estimada pela absorbância a 280nm em NanoDrop ND100. Os anticorpos purificados de cada grupo, na concentração de 2.5µg foram incubados com  $1 \times 10^3$  taquizoítos (cepa RH) à 37°C por 90 min. 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 livres de infecção. Todos os animais receberam o inóculo pela via intraperitoneal contendo os anticorpos (0.5µg) e taquizoítos ( $1 \times 10^3$ ). Alíquotas de sangue dos camundongos foram coletadas nos 4º, 5º e 6º dias pós-infecção para determinação dos níveis de parasitemia por qPCR, conforme descrito abaixo e os índices de sobrevivência observados diariamente. Os experimentos foram realizados duas vezes para confirmar os resultados.

### **3.16 Caracterização das EVs de camundongos na infecção por *T. gondii***

#### **3.16.1 Concentração das EVs de camundongos por ultracentrifugação**

Amostras de soros dos camundongos foram diluídas e centrifugadas a 3000 rpm por 15 min, para remoção dos sedimentos, contendo células mortas e detritos. Dos sobrenadantes foram coletados 250 µL de soro os quais foram filtrados em filtros 0.22 µm. Posteriormente, cada filtrado foi transferido para tubo Ultra-Clear (tubo de 6 mL para rotor SW-55), (Beckman Coulter) e o volume completado até 6 mL com PBS filtrado. As amostras foram ultracentrifugadas a 27000 rpm por 60 min a 25 ° C em uma ultracentrífuga Beckman® Coulter L8-80 M. Em seguida, cada sobrenadante foi descartado e o sedimento, contendo as vesículas recebeu 100 µL de PBS. As amostras foram acondicionadas a -20 °C para posterior análise em NTA e MET.

#### **3.16.2 Análise das concentrações e diâmetro das EVs de camundongos por NTA**

As concentrações e diâmetros das EVs purificadas de soros de camundongos (EVs-mouse) foram determinadas por NTA usando o aparelho NanoSight NS3000 (Malvern®). As análises de cada amostra foram realizadas após as purificações das partículas por ultracentrifugação. As amostras foram

diluídas 1:50 em PBS previamente filtrado em membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Um total de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi inoculado no aparelho para leitura em triplicata. O programa de computador do equipamento expressa os resultados por valores e gráficos de tamanho/dispersão e partículas por mL.

### **3.16.3 MET das EVs provenientes de soro de camundongos**

As amostras de EVs provenientes de soro de camundongos (EVs-mouse) foram analisadas por MET, para caracterização morfológica. Esse experimento foi realizado em colaboração com as pesquisadoras do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, Gislene Mitsue Namiyama e Noemi Nosomi Taniwaki. Um volume de 3  $\mu\text{L}$  da suspensão das EVs foi fixado com 100  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 2%. A mistura (2  $\mu\text{L}$ ) foi transferida a 2 grades revestidas com Formvar de carbono para microscopia eletrônica. As membranas foram cobertas por 20 min. Uma gota de 100  $\mu\text{L}$  de PBS foi colocada em uma folha de parafilme e as grades transferidas com o lado da membrana contendo a amostra voltada para baixo. As grades foram mantidas úmidas no lado da membrana durante todas as etapas, mas seco no lado oposto. As grades foram transferidas para uma gota de 50  $\mu\text{L}$  de 1% de glutaraldeído durante 5 min antes de transferir para uma gota de 100  $\mu\text{L}$  de água destilada durante 2 min. Essa etapa foi repetida 7 vezes para um total de 8 lavagens de água. Para contrastar as amostras, as grades foram transferidas para uma solução de 50  $\mu\text{L}$  de solução de uranil-oxalato, pH 7, durante 5 min antes de ser transferido para uma gota de 50  $\mu\text{L}$  de metilcelulose-A (4% de acetato de uranilo e 2% metil celulose numa proporção de 100  $\mu\text{L}$ /900  $\mu\text{L}$ , respectivamente) durante 10 min, colocando as grades em um prato de vidro coberto com parafilme em gelo. As grades foram removidas com aço inoxidável e o excesso de fluido foi recolhido suavemente no papel de filtro Whatman no.1. As grades foram secas e armazenadas em caixas. A seguir, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão, modelo JEM 1.011 a 80 kV. (JEOL/Massachusetts/USA). As imagens foram captadas em uma câmera (model 785 ES1000W, Gatan, USA) e analisadas no programa de computador "Gatan versão 1.6".

### 3.16.4 Eletroforese vertical de proteínas (SDS-PAGE)

EVs-mouse derivadas dos soros dos camundongos foram solubilizadas em um tampão de lise (2% SDS, glicerol a 10%, 2-mercaptoetanol a 5%, Tris-HCl 60 mM, pH 6,8 e azul de bromofenol 0,01%), e incubadas a 100°C por 10 min. A eletroforese vertical foi realizada em gel de acrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) como descrito previamente (Laemmli, 1970), no equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, USA®). Em todos os ensaios, os géis foram confeccionados na espessura de 1,5 mm. O gel de separação (Tris-HCl 0,75 M; SDS 0,2%, pH 8,8) e gel de empilhamento (Tris-HCl 0,25 M; SDS 0,2%, pH 6,8), foram utilizados na concentração de 10% de acrilamida. Foram aplicados 40 µL de amostra por poço no gel. Em todos os experimentos foram utilizados 15 µL de peso molecular padrão para proteínas (Thermo Scientific®). Os eletrodos foram mergulhados em tampão contendo Tris-HCl 0,025 M; glicina 0,192 M; SDS 0,1% e aplicados numa voltagem constante de 200 V.

Para a coloração, os géis foram mergulhados em solução de formaldeído (50% de metanol, 0,15% de formaldeído e 12% de ácido acético), aquecidas por 30 seg em forno micro-ondas e mantidas sob agitação por 5 min em temperatura ambiente, para fixação das proteínas. Em seguida, lavados com etanol 35%, nas mesmas condições. Após a lavagem, os géis foram imersos em solução de tiosulfato de sódio (0,02%), também aquecida em micro-ondas, sob agitação por 5 min. Então, novamente foram lavados, desta vez com H<sub>2</sub>O ultrapura (2 vezes) e, finalmente, corado com nitrato de prata (0,2%). Em ambos os processos ocorre aquecimento e agitação. Para a revelação foi aplicado uma solução contendo carbonato de sódio, formaldeído e tiosulfato de sódio. Para interromper a reação foi utilizado solução com 50% de metanol e 12% de ácido acético.

### 3.16.5 Immunoblot

Os géis contendo as EVs-mouse foram transferidos para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm de diâmetro (BioRad®) no equipamento TE70X Semi-Dry Transfer Uni (Hoefer). A transferência ocorreu em voltagem constante de 15 V por 30 min, as membranas, juntamente com os géis foram embebidos em tampão (Tris-HCl 25 mM; glicina 0,192 M; metanol 20%, pH 8.2). Posteriormente, as membranas foram incubadas com PBS-leite desnatado (5%) por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação, para bloqueio, seguido de 3 lavagens com PBS (5 min cada). Anticorpos Anti-CD63 e Anti-CD9 (Invitrogen®) foram diluídos em PBS-leite desnatado 5% (1: 500) e incubados por 18 h a 4° C. Após mais três lavagens com PBS (15 min), as membranas foram incubadas por 1 h a temperatura ambiente, sob agitação com um anticorpo secundário de IgG de cabra anti-IgG-mouse conjugada a peroxidase (Sigma®), diluído (1:500) em PBS-leite desnatado 5%. Seguindo, então, um novo ciclo de lavagens. A revelação das bandas foi efetuada cobrindo-se as membranas com substrato comercial Pierce ECL para Immunoblotting (Thermo Scientific) e registradas em gel documentador com filtro para quimiluminescência Blot Scanner (C-DiGit®).

### 3.16.6 Extração de RNA total e miRNA

Esses ensaios foram conduzidos para identificar se os camundongos experimentais expressam o mesmo grupo de miRNAs já descrito na literatura em infecção humana. RNAs totais, incluindo miRNAs, foram purificadas a partir de 250 µL de amostras de soro de camundongo, usando o kit miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segundo as recomendações do fabricante. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 rpm para retirada de detritos celulares. Em seguida, adicionou-se 1 mL de QIAzol ao sobrenadante de cada amostra. Após agitação em vórtex, as amostras foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente. A seguir, foram acrescentados 5 µL da molécula sintética de miRNA de *Caenorhabditis elegans* (cel-mir-39) na concentração de 25 fmol (como controle exógeno), homogeneizou-se e acrescentou-se 200 µL

de clorofórmio. Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos, permanecendo em temperatura ambiente por 3 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 14000 rpm durante 15 min separando-se em três fases: a superior, aquosa e incolor (contendo o miRNA), uma interfase branca, e a fase inferior vermelha contendo o material orgânico. Então foram transferidos 600 µL da fase superior incolor para um novo tubo de 2 mL, evitando a transferência de qualquer material da interface. Seguiu-se uma nova etapa onde foram acrescentados 900 µL de etanol 100% e após a homogeneização, foram acrescentados 700 µL de cada amostra em colunas RNeasy MinElute. Após centrifugação por 15 seg a 10000 rpm, o filtrado foi descartado e repetiu-se a etapa anterior com o restante da amostra. A seguir, adicionaram-se 700 µL do tampão RWT na coluna RNeasy MinElute e centrifugou-se a 10000 rpm por 15 seg, sendo descartado o filtrado. Em seguida, foram adicionados 500 µL do tampão RPE à coluna e centrifugou-se a 10000 rpm por 15 seg. Após o descarte do filtrado, foram adicionados 500 µL de etanol 80% e centrifugou-se a 10000 rpm por 2 min. A coluna foi colocada em um novo tubo coletor e realizou-se uma centrifugação a velocidade máxima durante 5 min para secar a membrana. Em seguida a coluna foi colocada em um novo tubo de 1,5 mL, adicionando-se 30 µL de água livre de DNase (DEPC) para a eluição do RNA total contendo os miRNAs após centrifugação de 1 min a velocidade máxima. O filtrado foi passado novamente pela coluna para obter um melhor rendimento do material.

### **3.16.7 Determinação das concentrações de miRNA**

Após a extração, as amostras foram quantificadas pelo espectrofotômetro Nanodrop ND100 (Thermo Fisher Scientific®). A pureza das moléculas de RNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorbância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de 1.8 foi interpretada como RNA livre de impurezas. A seguir, as amostras foram armazenadas a -70°C até o momento do uso.

### **3.16.8 Síntese do DNA complementar (cDNA)**

As fitas de cDNA foram sintetizadas a partir de 2 µL de RNA total contendo os miRNAs utilizando o Kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis kit (Life Technologies) conforme instruções do fabricante. O protocolo consiste em quatro etapas mostradas em detalhes na Tabela 1.

A TR foi realizada em termociclador Veriti 96-Well (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante, em quatro etapas e nas seguintes condições térmicas: 45 min a 37 °C, 10 min a 65°C para reação de inserção da cauda poli (A); 60 min a 16 °C para reação de ligação; 15 min a 42 °C, 5 min a 85°C para a reação de transcrição reversa; 5 min a 95 °C, seguido por 14 ciclos de 95 °C por 3 seg e 60°C por 30 seg; pare a reação a 99 °C por 10 min para a reação miR-Amp. Todas as amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até o uso.

### **3.16.9 qPCR**

A expressão gênica de miRNAs foi realizada usando 6 genes alvo (Thermo Fisher Scientific) conforme especificações descritas na Tabela 2. Os miRNAs escolhidos foram: miR-155- 5p (ID: 477927\_miR); miR-29c-3p (ID: 479229\_miR); miR-125b- 5p (ID: 477885\_miR); miR-9- 5p (ID: 478214\_miR); miR-21\_5p (ID: 477975\_miR) e miR-146a\_5p (ID: 478399\_miR). O cel-miR39 (ID: 478293\_miR) foi usado como controle externo.

Após a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas 1:10, conforme instruções do fabricante e, em seguida foi, realizada a qPCR em ensaio customizado e produzido pela Applied Biosystems®. O mix de amplificação de qPCR continha 5 µL de TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0,5 µL do ensaio TaqMan Advanced miRNA Assays (ambos Applied Biosystems) para os miRNAs descritos na Tabela 2, cDNA (2,5 µL) e 2 µL de água livre de RNase. As reações foram realizadas em duplicatas num volume final de 10 µL. Para cada reação foi adicionado um controle negativo, compondo-se somente do mix de amplificação. A análise da expressão dos miRNAs foram realizadas no

equipamento StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) utilizando a seguinte ciclagem: 95 °C por 20 seg; 40 ciclos de 95°C por 1 seg; 60°C durante 20 seg (modo Fast).

### 3.16.10 Quantificação de expressão gênica

A quantificação da expressão gênica foi avaliada pelo método do “CT comparativo” ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ), segundo Livak e Schmittgen (2001). Para a realização desta fórmula, primeiramente foi feita a correção da variação entre as amostras, subtraindo-se o valor obtido de CT de cada amostra em relação ao CT do gene endógeno, obtendo-se valor de  $\Delta CT$ . Após a obtenção desses valores, foi realizado o cálculo de  $\Delta\Delta CT$ . Para tal, os valores obtidos de  $\Delta CT$  das amostras foram subtraídos do valor de  $\Delta CT$  da amostra calibradora. A utilização de uma amostra calibradora é recomendada para descrever quantas vezes o miRNA de estudo está sendo mais ou menos expresso em relação a este calibrador. Recomendam-se como calibradores da reação, amostras do tempo zero do estudo ou amostras controles (sem nenhum tratamento).

Os miRNAs extraídos dos grupos de camundongos negativos (N) foram considerados como calibradores para cálculos de expressão de miRNA de grupos imunizados com EVs (EV-IM), grupo positivo infectados com a cepa crônica ME-49 (CR) e infectados com a cepa aguda RH (RH). De acordo com o método comparativo de CT, os valores de expressão dos calibradores foram considerados 1,0.

Após a determinação dos valores de  $\Delta\Delta CT$ , aplicou-se a fórmula de quantificação relativa dada por:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Os resultados foram descritos em média de quantificação relativa (RQ).

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}, \text{ onde } \Delta CT = CT_{\text{alvo}} - CT_{\text{endógeno}}, \text{ e} \\ \Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{amostra}} - \Delta CT_{\text{do calibrador}}$$



**Tabela 1. Etapas do protocolo de síntese de cDNA**

	<b>Componente</b>	<b>Volume</b>	<b>Condições da Ciclagem</b>	
<b>1) Reação de Adição da cauda poli A</b>	10 X Poly (A) Buffer)	0,5 µL	Poliadenização	37°C- 45 min
	ATP	0,5 µL	Reação de Parada	65°C- 10 min
	Poly A Enzyme	0,3 µL	Hold	4°C- ∞
	H <sub>2</sub> O RNase free	1,7 µL		
<b>2) Reação de Ligação dos Adaptadores</b>	5X DNA Ligase Buffer	3 µL	Ligação	16°C-60 min
	50% PEG 8000	4,5 µL	Hold	4°C- ∞
	25X Ligation Adaptor	0,6 µL		
	RNA Ligase	1,5 µL		
	H <sub>2</sub> O RNase free	0,4 µL		
<b>3) Reação de transcrição reversa</b>	5X RT Buffer	6 µL	Transcrição reversa	42°C- 15 min
	dNTP mix (25 mM cada)	1,2 µL	Reação de Parada	85°C- 5 min
	20X Universal RT primer	1,5 µL	Hold	4°C- ∞
	10X RT Enzyme Mix	3 µL		
	H <sub>2</sub> O RNase free	3,3 µL		
<b>4) Reação de miR-Amp</b>	2X miR-Amp Master Mix	25 µl	Ativação da Enzima	95°C- 5 min
	20X miR-Amp Primer Mix	2,5 µl	14 ciclos de Desnaturação	95°C- 3 seg
	H <sub>2</sub> O RNase free	17,5 µl	14 ciclos de Anelamento/Extensão	60°C- 30 seg
			Reação de Parada	99°C- 10 min
			Hold	4°C- ∞

**Tabela 2. Genes alvos utilizados como marcadores para análise de expressão gênica de miRNA**

miRNA	Gene	Nº de acesso	Ensaio ID <sup>1</sup>	Localização no cromossomo	Sequência de nucleotídeos
<b>miR-155</b>	hsa-miR-155-5p	MI0000681	477927_miR	Chr.21: 25573980 - 25574044 [+] on Build GRCh38	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
<b>miR-146a</b>	hsa-miR-146a-5p	MI0000477	478399_miR	Chr.5: 160485352 - 160485450 [+] on Build GRCh38	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
<b>miR29-c</b>	hsa-miR-29c-3p	MI0000735	479229_miR	Chr.1: 207801852 - 207801939 [-] on Build GRCh38	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
<b>miR-21</b>	hsa-miR-21-5p	MI0000077	477975_miR	Chr.17: 59841266 - 59841337 [+] on Build GRCh38	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
<b>miR-125b</b>	hsa-miR-125b-5p	MI0000446	477885_miR	Chr.11: 122099757 - 122099844 [-] on Build GRCh38	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
<b>mir – 9</b>	2hsa-miR-9-5p	MI0000466	478214_mir	Chr.1: 156420341 - 156420429 [-] on Build GRCh38	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
<b>Cel-miR-39 Exógeno</b>	cel-miR-39-3p	MIMAT0000010	478293_miR	-	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG

Fonte: <http://www.thermofisher.com>

### **3.17 Resposta celular: produção das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em camundongos imunizados**

#### **3.17.1 Obtenção de linfócitos e linfoproliferação**

Baços de 9 camundongos pertencentes aos grupos imunizados, negativo e crônico foram retirados de forma estéril com o auxílio de tesoura e pinça e adicionados em placas de petri, macerados entre duas lâminas para aquisição de esplenócitos. A seguir, foram incubadas com 100 µg de EVs-toxo. Dois poços foram estimulados com proliferadores mitóticos (ConA ou LPS). Após a coleta dos sobrenadantes foram dosadas as produções das citocinas IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-17. Total de camundongos – 9 (3 imunizados com EVs, 3 negativos (limpos) e 3 crônicos infectados com ME-49).

Os linfócitos obtidos foram distribuídos em placas de 24 poços e incubados com EVs-toxo na concentração de 100 µg/ poço. 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 foram considerados como controle negativo. Os outros dois poços foram estimulados com proliferadores mitóticos (ConA ou LPS), sendo considerados controles positivos. ConA - Sigma (2 µg/mL) foi utilizado como controle de produção das citocinas: IL-10, IL-17 e IFN-γ e LPS de *Escherichia coli* O11 B4 (2 µg/mL) – Sigma para TNF-α. ConA e LPS são indutores da formação destas citocinas.

#### **3.17.2 Dosagem das citocinas**

Os sobrenadantes das culturas de esplenócitos foram coletados após 24h e 48h. Foram feitos pelo menos três experimentos *in vitro* para cada grupo de animais (imunizados e controles: positivo e negativo). Após os experimentos *in vitro* as citocinas IFN-γ, IL-17, TNF-α e IL-10 foram dosadas nos

sobrenadantes coletados com o auxílio de kits específicos (Thermo Fisher Scientific) por ELISA, segundo as instruções do fabricante. A absorbância foi mensurada em um leitor de ELISA (Multiscan) 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- $\gamma$  62,5 pg/mL, IL-4 7,8 pg/mL, IL-10 foi de 62,5 pg/mL e TNF- $\alpha$  31,25 pg/mL.

### **3.18 Expressão de citocinas por imuno-histoquímica**

Foram coletados cérebro, coração, fígado, baço e o músculo de 3 camundongos imunizados, 3 do grupo positivo e 3 do grupo negativo. Esses órgãos foram fixados em formol e enviados ao centro de Patologia do Instituto Adolfo Lutz para o processamento das amostras. Os órgãos foram emblocados em parafina. Foram feitos cortes no bloco a 3 $\mu$ m em lâminas silanizadas (ou carga positiva), lâminas para hematoxilina-eosina e lâminas para imuno-histoquímica. As lâminas foram desparafinizadas em xilol, re-hidratadas e foram lavadas em etanol e em água destilada. A recuperação de epítomos foi realizada com calor úmido em pH neutro (Ácido cítrico 10mM/ pH6,0). O bloqueio foi feito com peroxidase endógena em água oxigenada 20V (solução aquosa de peróxido de hidrogênio a 6%). O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com solução bloqueadora proteica. As lavagens foram feitas em solução PBS-tween 20. Os anticorpos primários foram diluídos em BSA nas concentrações: IFN- $\gamma$  1:500; TNF- $\alpha$  1:1000; IL-17 1:500; IL-10 1:1000, *T. gondii* 1:2000 e incubados a 4°C *overnight*. Em seguida foram feitas novas lavagens em PBS-tween 20 e a incubação com sistema de amplificação baseado em micro polímeros conjugados com anti-imunoglobulinas de coelho e de camundongo e enzima peroxidase (kit REVEAL Biotin-Free Polyvalent HRP – Spring Bioscience, Pleaseton-CA, USA). Uma nova sequência de lavagens foi realizada e a revelação foi feita com o cromógeno Diaminobendizina (DAB chromogen – Spring Bioscience, Pleasetin-CA, USA). A contracoloração foi

realizada com hematoxilina de Mayer e a montagem com lamínula em meio permanente (Entellan, Merck, Germany).

### **3.19 Análise dos dados**

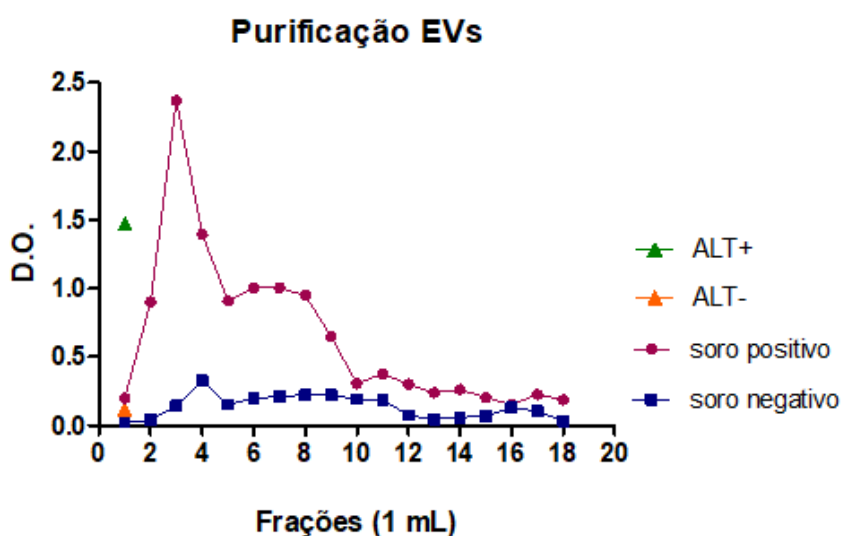
As comparações das parasitemias entre os grupos experimentais (EV-IM e N); comparações de concentração de EVs e a produção de citocinas entre os grupos experimentais; e as comparações de concentrações e tamanhos de EVs foram avaliadas estatisticamente pelo GraphPad Prism 6.0 Software Inc. (San Diego, CA, EUA). O coeficiente de similaridade entre os dois grupos foi calculado pelo teste de Mann Whitney (teste t de Student não pareado-unicaudal) com intervalo de confiança de 95%. As diferenças entre os grupos também foram testadas, comparando cada uma delas pela análise one-way por ANOVA. Diferenças ou semelhanças em ambas as análises estatísticas foram consideradas estatisticamente significativas para valor de  $p \leq 0,01$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Padronizações

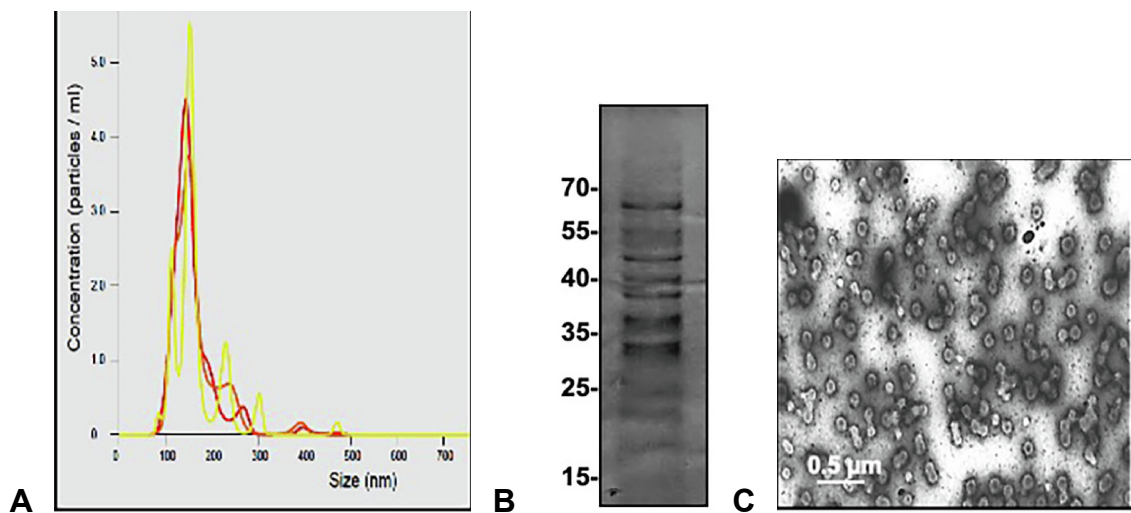
#### 4.1.1 Purificação de EVs liberadas por *T. gondii*

As EVs-toxo liberadas pelos taquizoítos ( $1 \times 10^9$ ) foram purificadas para uso nos experimentos de imunização. Os taquizoítos liberaram EVs-toxo durante a incubação em meio RPMI a 37 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> por 2 h. Foram purificadas por cromatografia de exclusão de tamanho e em seguida foram feitas alíquotas de 1 mL para a execução do ELISA. A Figura 11 mostra as frações reativas para soro humano positivo (*pool*) para toxoplasmose, correspondendo ao pico da curva, que contém EVs-toxo. No controle negativo, as alíquotas não eram reativas para soro humano negativo (*pool*) para toxoplasmose. A qualidade das reações foi verificada usando ALT (antígeno usado como controle positivo).



**Figura 11.** Isolamento de EVs de taquizoítos (EVs-toxo) da cepa RH de *T. gondii* (duas purificações). Reatividade das frações eluídas por cromatografia em gel-exclusão (Sepharose CL-4B). A metodologia utilizada foi ELISA utilizando um “*pool*” de soros humanos reagentes para toxoplasmose (círculos) e um “*pool*” de soros humanos não reagentes para toxoplasmose (quadrados). Os resultados representam a absorvância de cada fração na densidade óptica (D.O.) de 492 nm.

A Figura 12A mostra os dados originais do NTA (em leituras em triplicata) da distribuição gráfica produzida pelo equipamento NanoSight. O gráfico inclui o tamanho (nm) e a concentração (partículas / mL) de EVs-toxo purificados. O tamanho médio e a concentração  $\pm$  EP dos EVs foram:  $163,2 \pm 2,7$  nm (população de 163 nm majoritária) e  $2,55 \times 10^9 \pm 8,96 \times 10^7$  partículas / mL. O perfil eletroforético das EVs-toxo purificadas foi investigado por SDS-PAGE que apresentava um espectro de 15 a 70 kDa Figura 12B. Igualmente, as EVs-toxo foram investigadas pela MET, cujas imagens capturadas de alíquotas mostraram numerosas vesículas Figura 12C.



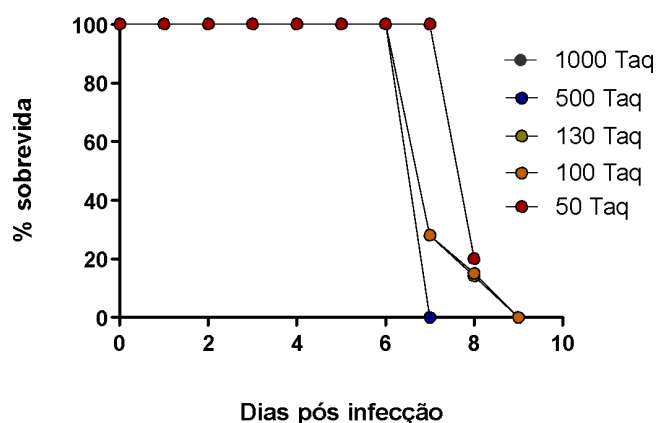
**Figura 12.** Purificação de vesículas extracelulares (EVs-toxo) liberadas por taquizoítos de *T. gondii*. (A) O tamanho de partícula (nm) e a concentração (partículas / mL) foram avaliadas por análise de rastreamento de nanopartículas. O gráfico original foi produzido usando equipamento NanoSight. Os dados representam as três leituras de uma amostra contendo EVs-toxo de  $1 \times 10^9$  taquizoítos que liberaram as EVs por 2 h. (B) Proteínas de EVs-toxo liberadas por taquizoítos, separadas por gel a 10% SDS-PAGE e coradas com prata. (C) A imagem foi adquirida por microscopia eletrônica com numerosas EVs-toxo após purificação por cromatografia. Ampliação: 25.000.

## 4.2 Imunizações: padronizações

### 4.2.1 Definição da concentração do inóculo com taquizoítos

Os primeiros experimentos foram realizados para determinar o menor número de parasitas necessários para causar mortalidade nos animais infectados com a cepa RH de *T. gondii*. Grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn foram infectados por via intraperitoneal (IP) com 1000, 500, 130, 100 e 50 taquizoítos/grupos provenientes de cultura celular. A seguir, os índices de sobrevivência foram acompanhados diariamente. Como mostra a Figura 13, com 100 taquizoítos em cerca de 9 dias todos animais foram a óbito. Na infecção com 50 taquizoítos, um camundongo (20%) sobreviveu à infecção. Assim, optou-se por desafiar os animais infectados com concentrações de 100 parasitas/animal.

Teste de inóculo de taquizoítos cepa RH *T. gondii*

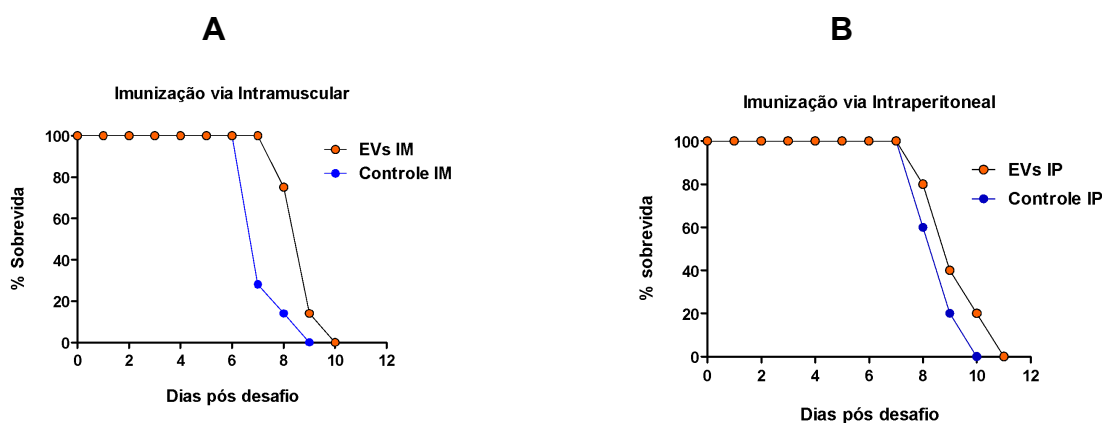


**Figura 13.** Índices de sobrevivência de grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn infectados com diferentes concentrações de taquizoítos



### 4.2.2 Vias de inoculação

Quanto às imunizações foram testadas as vias de inoculação. Foram imunizados 4 grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn. Um grupo recebeu 20 µg de EVs-toxo com ALUM por via IP em 4 doses quinzenais. O segundo grupo recebeu nas mesmas datas as mesmas quantidades de EVs por via intramuscular (IM). O terceiro e quarto grupos receberam nas mesmas datas, solução salina tamponada com fosfatos, pH 7.2 (PBS) e a mesma quantidade de ALUM, por via IM e IP, respectivamente. Estes dois últimos grupos formaram os grupos controle. Como mostra a Figura 14, os índices de sobrevivência foram muito semelhantes, porém, os animais inoculados por via IM ficam menos debilitados. Assim optamos pelo uso do inóculo das EVs-toxo por via intramuscular.



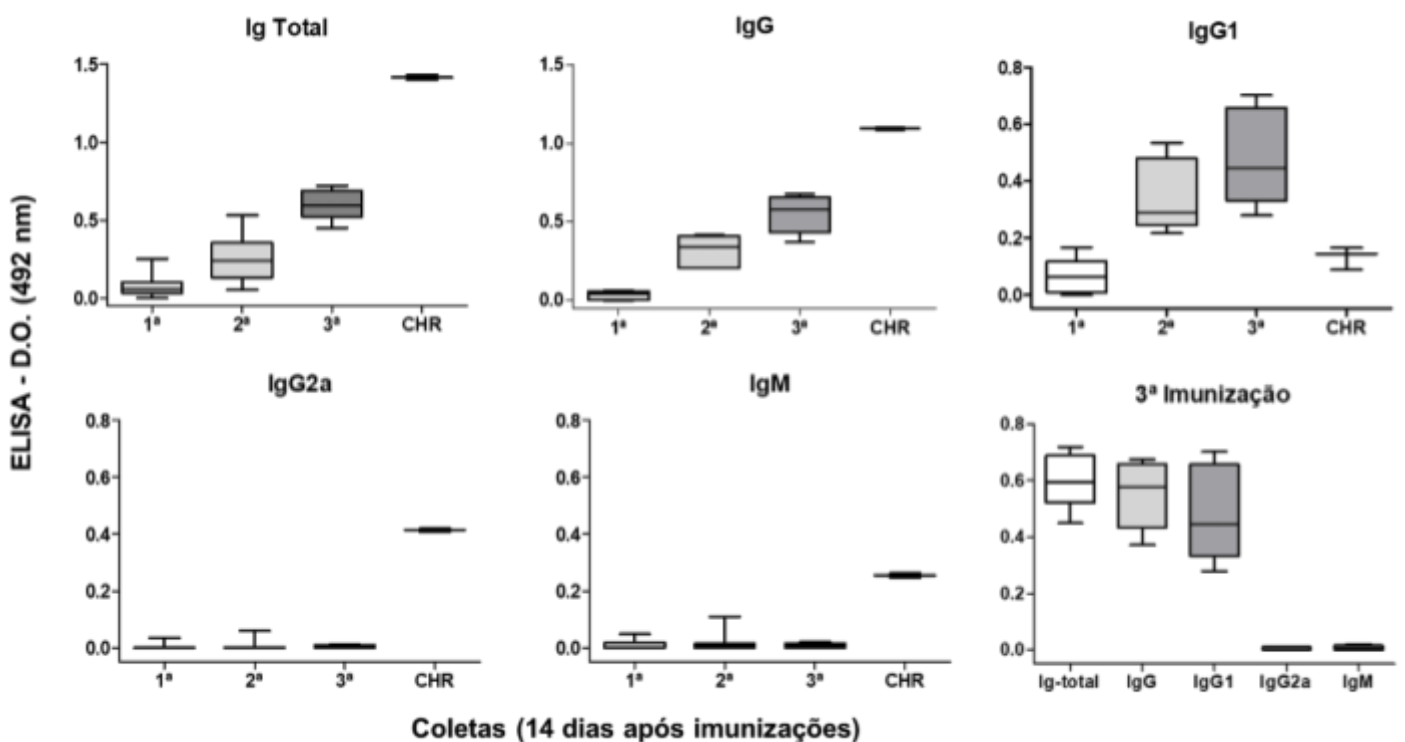
**Figura 14.** Índices de sobrevivência de grupos de 5 camundongos fêmeas da linhagem A/Sn imunizados com 4 doses quinzenais de 20 µg de EVs-toxo e adjuvante ALUM por via intramuscular (IM) (A), e intraperitoneal (IP) (B). Os grupos controles receberam somente o ALUM e PBS.

### 4.3 Imunização com EVs de *T. gondii* induz uma resposta imune humoral tipo IgG1 em camundongos

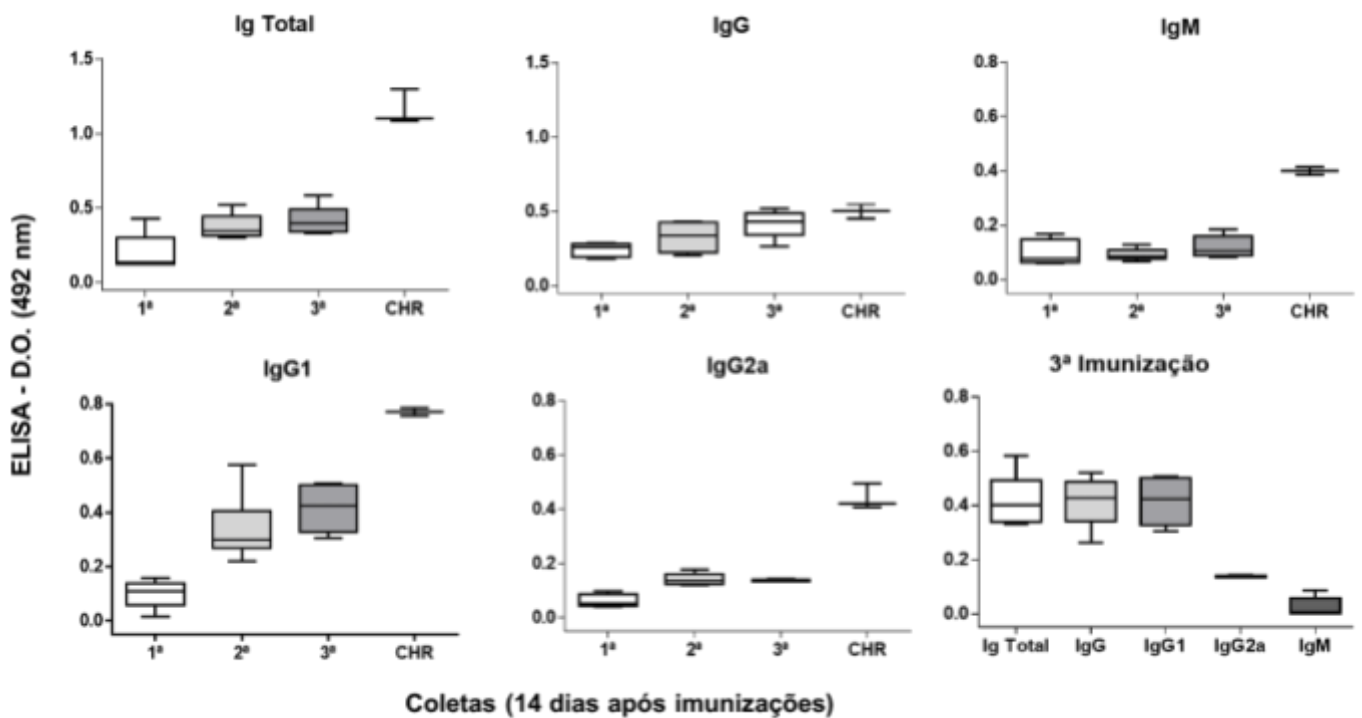
Camundongos fêmeas das linhagens A/Sn e Balb/c (EV-IM) foram imunizados como descrito acima com 100 µg de EVs-toxo purificadas de taquizoítos da cepa RH. Após as coletas de sangue para investigação dos

níveis de anticorpos até a última imunização, os animais foram desafiados com 100 taquizoítos provenientes de culturas de células. A seguir a parasitemia diária foi avaliada por qPCR e os índices de sobrevivência avaliados diariamente. Em todos os ELISAs foram utilizados o ALT como antígeno. Para análise dos dados foram incluídos os experimentos dos grupos controles. (Um positivo, animais infectados cronicamente com a cepa ME-49 (CHR) e outro negativo (N), animais sem infecção). Como visto na Figura 15, os níveis de anticorpos foram crescentes com as imunizações e as EVs induziram em camundongos A/Sn na produção de anticorpos do tipo IgG1 e fraca produção de IgG2a. Níveis baixos de IgM foram detectados em todos os soros analisados.

Na linhagem Balb/c, os resultados foram semelhantes, porém os níveis de anticorpos detectados foram um pouco mais baixos, por isso a linhagem A/Sn foi escolhida, Figura 16. Assim, os resultados demonstram que EVs-toxo desencadeiam preferencialmente a resposta imune de IgG1 em ambas as linhagens de camundongos. Análises por imunoblot confirmaram que os soros dos camundongos imunizados EV-IM reconheciam antígenos de taquizoítos.



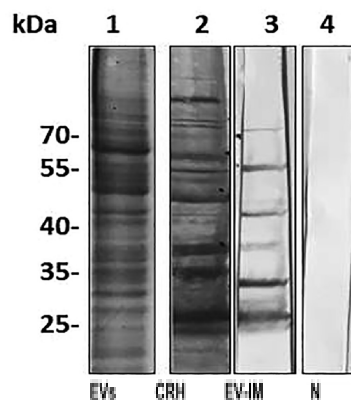
**Figura 15.** Níveis de anticorpos produzidos na imunização com EVs-toxo em camundongos fêmeas da linhagem A/Sn, após 3 imunizações. Os valores foram comparados a um “pool” de soros de camundongos infectados com a cepa ME-49 (CHR).



**Figura 16.** Níveis de anticorpos produzidos na imunização com EVs-toxo em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, após a 1ª, 2ª e 3ª imunização. Os valores foram comparados a um “pool” de soros de camundongos infectados com a cepa ME-49 (CHR).

#### 4.4. Análise eletroforética do ALT por SDS-PAGE e Imunoblot

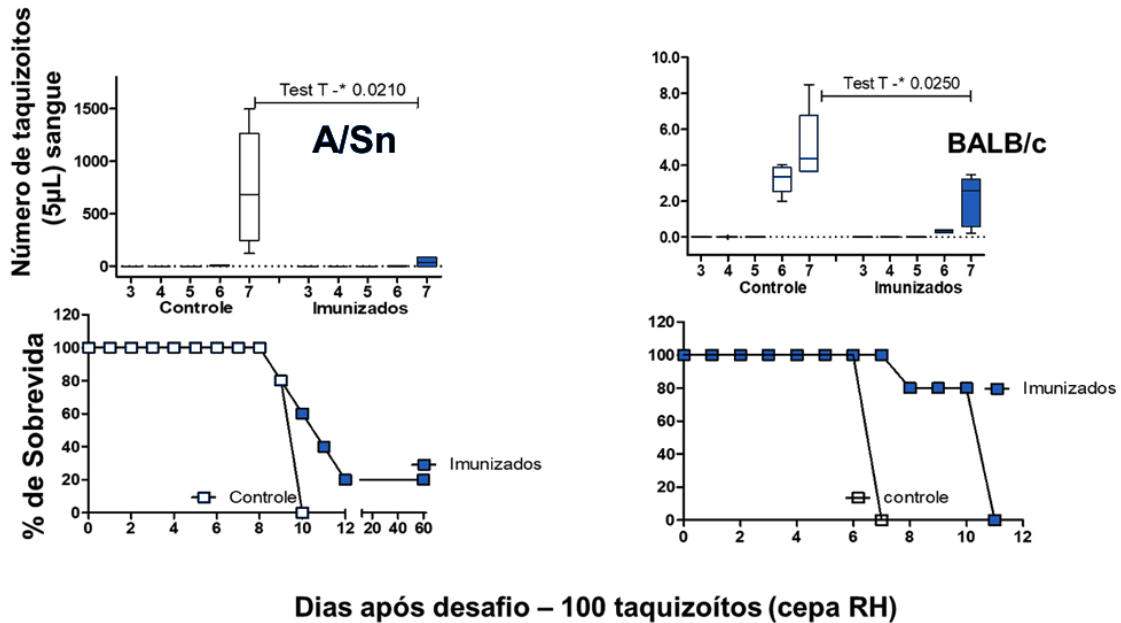
Como mostra a figura 17, a análise eletroforética de ALT foi realizada por SDS-PAGE 10%. A seguir, as proteínas foram transferidas para tiras de nitrocelulose (Figura 17-1:EVs) e incubadas com “pool” de soros de camundongos crônicos (Figura 17-2:ME-49); imunizados (Figura 17-3:EV-IM); e negativos (Figura 17-4:N). A análise por imunoblot confirmou que o “pool” de soros de camundongos imunizados foi reagente para os antígenos parasitários.



**Figura 17.** Análise eletroforética do ALT por SDS-PAGE e imunoblot (1:EVs). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para tiras de nitrocelulose e incubadas com “pools” de soros de camundongos crônicos (2:ME-49); imunizados (3:EV-IM); e negativos (4:N).

#### **4.5 Imunização com EVs de *T. gondii* causa proteção em camundongos desafiados com a cepa altamente virulenta (RH)**

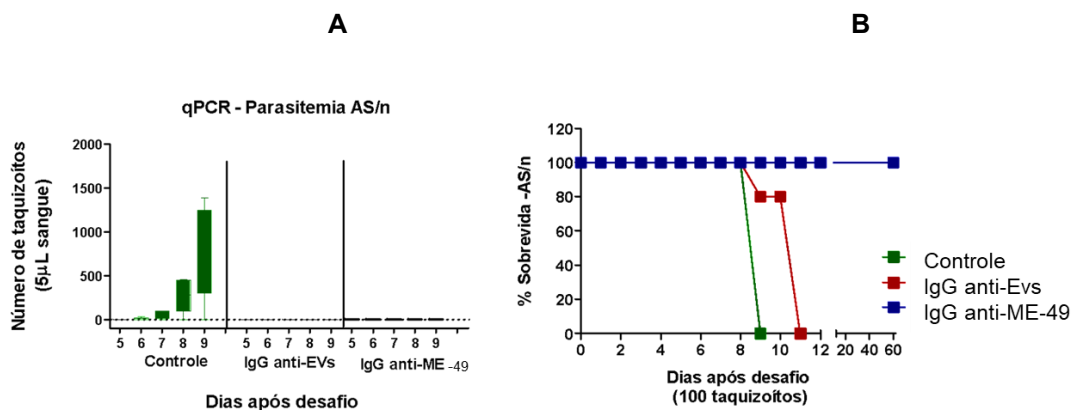
A seguir, os animais imunizados e os controles (de ambas as linhagens) foram desafiados com 100 taquizoítos/animal. A Figura 18 mostra os resultados dos níveis de parasitemia diários determinados por qPCR e os índices de sobrevivência. Os níveis de parasitemia foram estatisticamente mais altos nos grupos controle do que nos imunizados, em ambas as linhagens. Da mesma forma, os índices de sobrevivência foram superiores nos animais imunizados quando comparados ao grupo controle. Os experimentos de imunização e desafio foram realizados por duas vezes e com resultados similares.



**Figura 18.** Níveis de parasitemia determinados por qPCR e porcentagem de sobrevida de camundongos fêmeas das linhagens A/Sn e Balb/c imunizados com EVs e desafiados com 100 taquizoitos/animal.

#### 4.6 Participação de anticorpos anti-EVs na parasitemia e sobrevida de camundongos imunizados

Em seguida, experimentos de opsonização foram realizados em camundongos A/Sn, para verificar se os anticorpos anti-EVs foram capazes de neutralizar a infecção. Taquizoitos incubados com IgG purificada de camundongos imunizados com EVs foram utilizados para infectar um grupo de 5 camundongos. Em seguida, os índices de parasitemia e sobrevida foram monitorados diariamente. O grupo controle negativo recebeu, nos mesmos dias, taquizoitos incubados com IgG purificada de camundongos negativos. O grupo controle positivo recebeu taquizoitos opsonizados com IgGs purificadas de camundongos crônicos (infectados com a cepa ME-49). Os camundongos desafiados com taquizoitos opsonizados com IgG anti-EVs apresentaram diminuição na parasitemia, estatisticamente significativa, quando comparados aos camundongos do grupo controle negativos (Figura 19A). Da mesma forma, esses camundongos tiveram um aumento de sobrevida de 48 h, quando comparados aos desafiados com taquizoitos com IgG normal (Figura 19B).

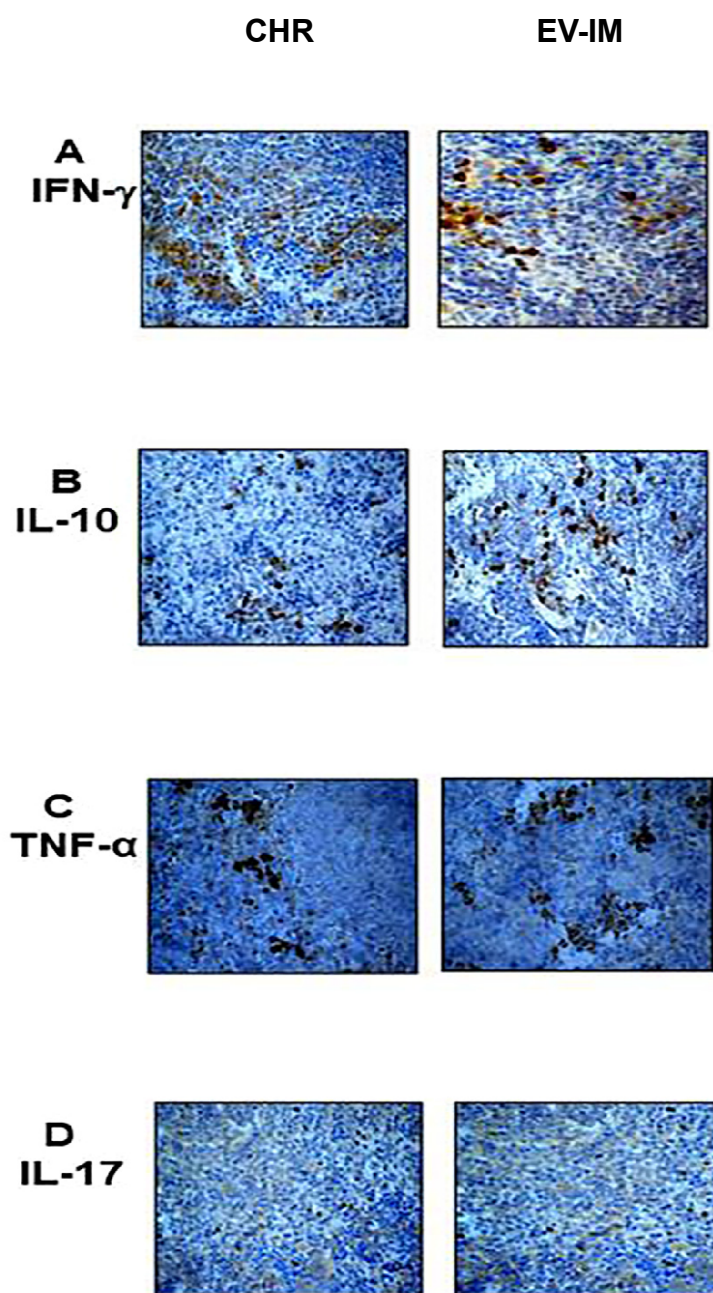


**Figura 19.** Oponização de taquizoítos de *T. gondii* com anticorpos anti-EVs reduz a parasitemia e aumenta o índice de sobrevivência de camundongos infectados com uma cepa altamente virulenta e letal (cepa RH). (A) Níveis de parasitemia de camundongos A/Sn infectados ip com 100 taquizoítos opsonizados com IgGs purificadas (2,5 mg) de camundongos imunizados com EVs (10 min a 37°C) (IgG anti-EVs). O grupo controle negativo recebeu taquizoítos opsonizados com IgGs purificadas de camundongos negativos. O grupo controle positivo recebeu taquizoítos opsonizados com IgGs purificadas de camundongos crônicos (infectados com a cepa ME-49) (IgG anti-ME-49). Os níveis de parasitemia foram estimados diariamente pela qPCR. Os resultados foram obtidos originariamente em CT e transformados em números de taquizoítos após o cálculo de produtos amplificados no qPCR. Diferenças nos números de taquizoítos entre os dois grupos foram estatisticamente diferentes pelo teste de Mann-Whitney, valor P unicaudal. (B) Taxas de sobrevivência dos camundongos infectados com taquizoítos opsonizados com IgGs purificadas de camundongos imunizados (anti-EVs), negativos (controle) e crônicos (anti-ME-49).

#### 4.7 Expressão de citocinas *in situ*

As análises histopatológicas do cérebro, coração, fígado, baço e músculo esquelético mostraram que os camundongos do grupo crônico apresentaram alterações histopatológicas típicas na infecção crônica causada por *T. gondii*, incluindo a presença de cistos, principalmente no cérebro. Esses resultados já foram descritos em diferentes estudos (Ferguson et al., 1991; Fuentes-Castro et al., 2017). Não foram identificadas alterações histopatológicas nos tecidos de camundongos dos grupos sem infecção e imunizados com EVs.

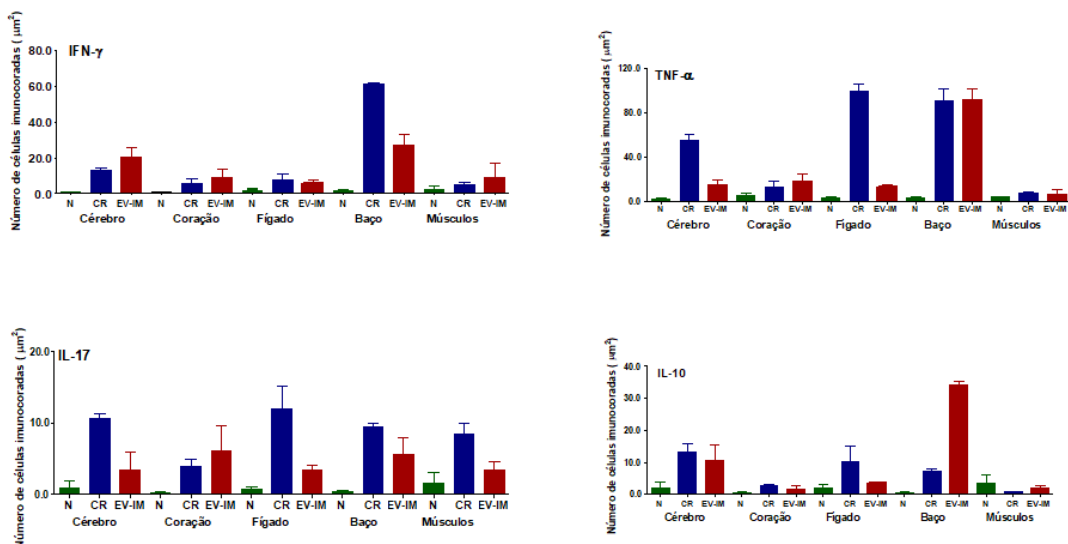
Em relação às análises de imuno-histoquímica, a Figura 20 mostra as imagens microscópicas de células do baço coletadas de camundongos crônicos (CHR) e imunizados com EVs (EV-IM). As imagens indicam expressões *in situ* de IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$  (C) e IL-17 (D) como células manchadas de marrom.



**Figura 20.** A imunização com EVs de *T. gondii* ativa a resposta celular. Expressão *in situ* de IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$  (C) e IL-17 (D) de células do baço de camundongos crônicos (CHR) e camundongos imunizados com EVs (EV- IM) foram corados por análise histopatológica e imunohistoquímica (IHQ). Ampliações 400 x.

A Figura 21 mostra todos os resultados em forma de gráfico, uma vez que as avaliações microscópicas foram feitas no cérebro, coração, fígado, baço e músculo esquelético separadamente. Os valores de células imunomarcadas foram expressos como média  $\pm$  SEM. No grupo crônico (CHR) as citocinas

estudadas foram superexpressas quando comparadas aos do grupo controle negativo (N). Esses resultados são amplamente conhecidos na literatura (Zenner et al., 1999; Brandão, et al., 2009; Costa-Silva et al., 2008, 2012). As células dos camundongos do grupo imunizados com EVs (EV-IM) expressaram IFN- $\gamma$  e IL-10 em células do cérebro e do baço. TNF- $\alpha$  foi expresso em células do baço.



**Figura 21.** Distribuição das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-10 no cérebro, coração, fígado, baço e células do músculo esquelético. Amostras de camundongos negativos (N: colunas verdes), crônicos (CHR: colunas azuis) e imunizados (EV-IM: colunas vermelhas). Os valores indicam a média  $\pm$  SEM. de três camundongos por grupo.

#### 4.8 Investigação das EVs de camundongos na infecção por *T. gondii*

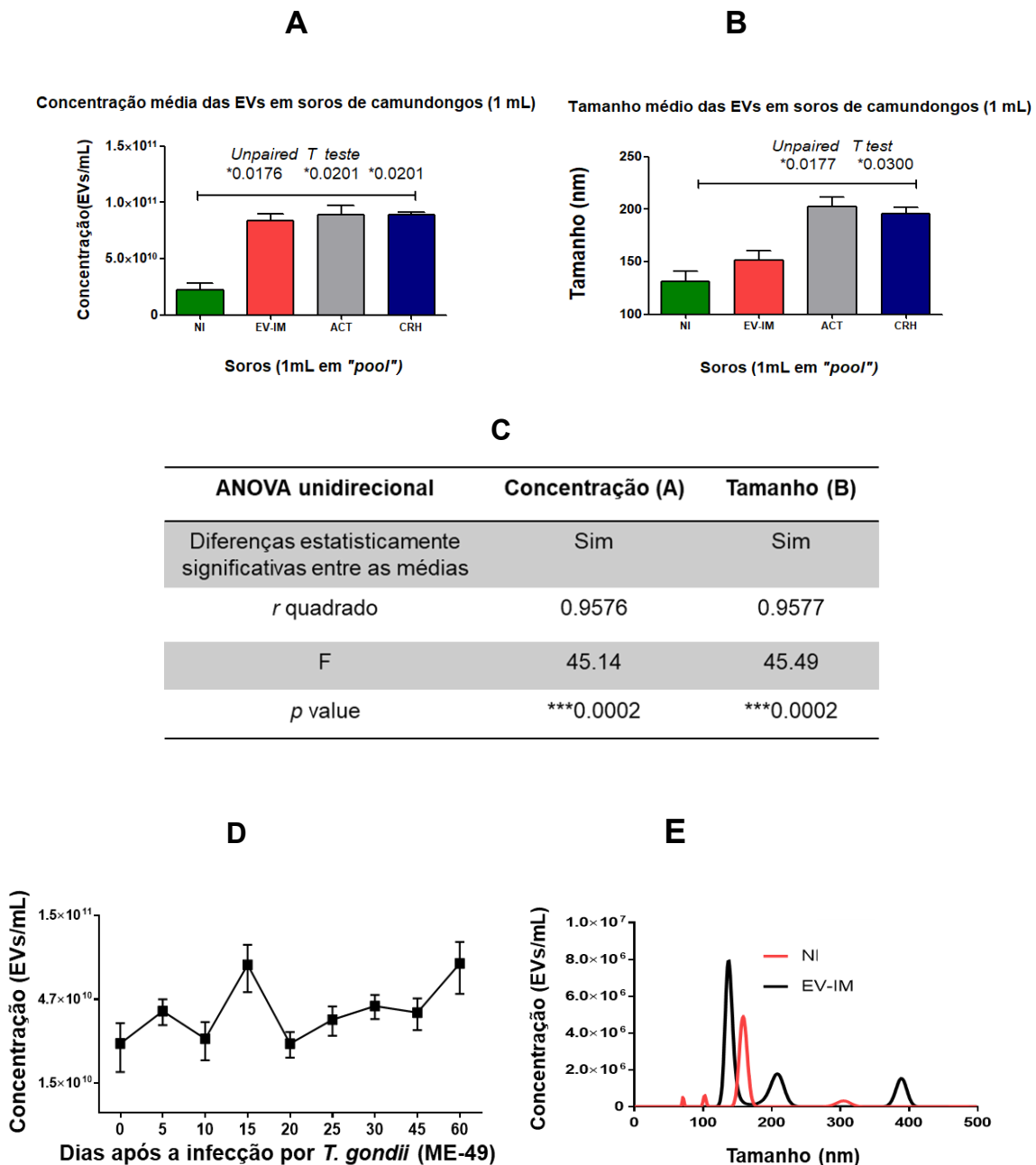
As EVs-mouse foram concentradas por ultracentrifugação e, em seguida, o tamanho e a concentração de EVs foram determinados no NanoSight. A Figura 22A mostra as médias e a concentração de EVs-mouse em *pool* (1 mL) de 5 camundongos por grupo. A concentração de EVs-mouse do grupo N (média:  $2,22 \times 10^{10}$  EVs/mL) foi estatisticamente menor do que o grupo EV-IM (média:  $8,40 \times 10^{10}$  EVs/mL), grupo da infecção aguda (ACT) (média:  $8,92 \times 10^{10}$  EVs/mL) e grupo CHR (média:  $8,93 \times 10^{10}$  EVs/mL), em  $p = 0,0176$ ,  $p = 0,0201$  e  $p = 0,0201$ , respectivamente. Em paralelo, os tamanhos de partículas também foram investigados pelo NTA.



A Figura 22B mostra a comparação entre as médias  $\pm$  SEM do tamanho das EVs-mouse dos grupos: N (média:  $131 \pm 7,2$  nm), EV-IM (média:  $153 \pm 5,5$  nm), ACT (média:  $202 \pm 6,4$  nm) e CHR (média:  $193 \pm 12,2$  nm). Os grupos ACT e CHR tiveram tamanho das EVs estatisticamente maior do que o grupo N em  $p = 0,0177$  e  $p = 0,0300$ , respectivamente. A Figura 22C mostra as análises realizadas por ANOVA.

As diferenças entre todos os grupos para concentração e tamanho de EVs foram estatisticamente significativas em  $p = 0,0002$  e  $p = 0,0002$ , respectivamente. Embora em todas as amostras, EVs com tamanho correspondente a exossomos tenham sido mostrados no NTA, a média mostra que grande parte das EVs derivadas de soro de camundongos infectados eram microvesículas. A evolução das EVs-mouse no curso da infecção por *T. gondii* também foi investigada. No início da infecção ( $T = 0$ ) o valor foi de  $2,58 \times 10^{10}$  EVs/mL. Durante a infecção aguda, por volta do 15º dia, a concentração aumentou para  $7,6 \times 10^{10}$  EVs/mL e os valores foram semelhantes até o 60º dia, durante a infecção crônica ( $7,57 \times 10^{10}$  EVs/mL) (Figura 22D).

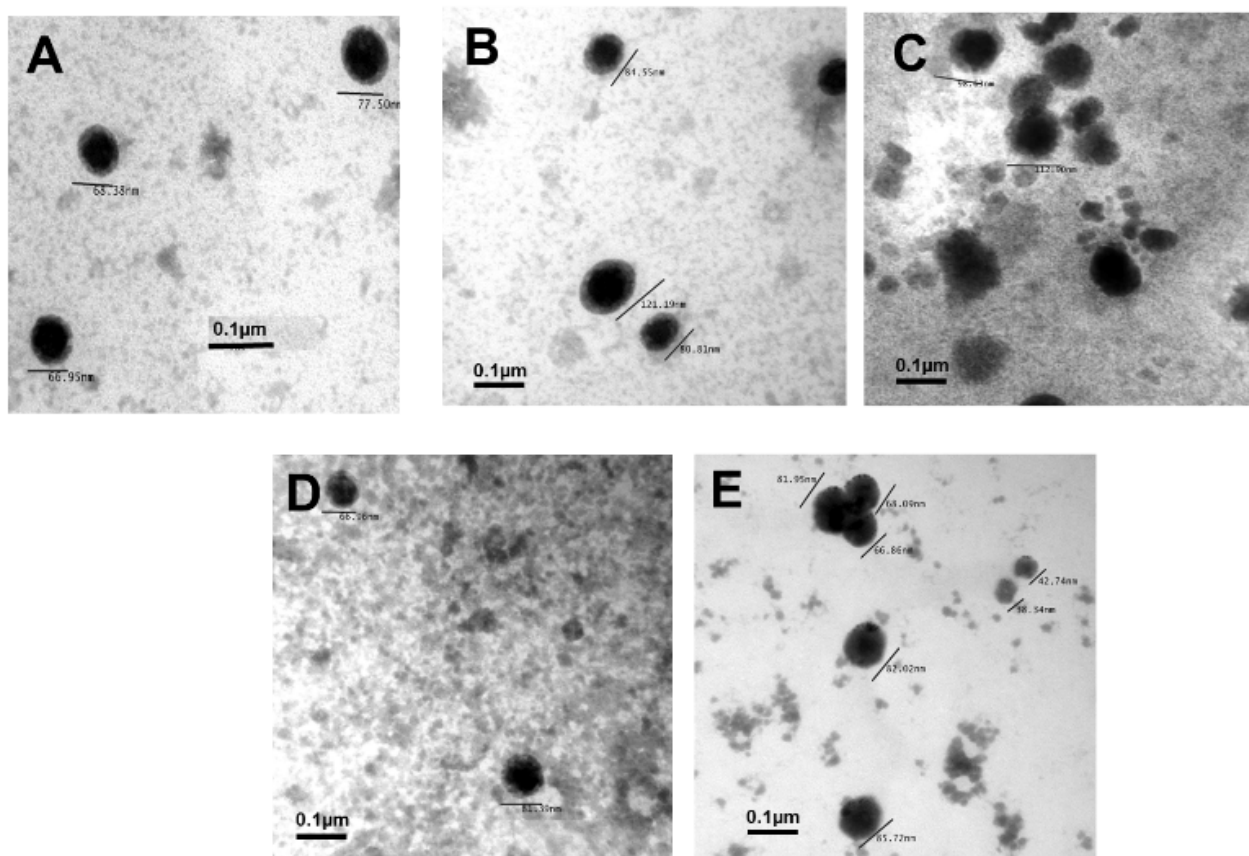
Com a intenção de ilustrar a produção de EVs-mouse derivados de soro após a imunização com EVs-toxo, a Figura 22E mostra a diferença entre as concentrações de EVs-mouse dos grupos EV-IM e N.



**Figura 22.** Tamanho e concentração das EVs de soros de camundongos A/Sn (1 mL). As medições foram determinadas por NanoSight. (A) Concentração das partículas/mL e (B) médias dos tamanhos das partículas (nm), nos seguintes grupos: EVs provenientes soros de camundongos negativos (N); imunizado com EVs-toxo (EV-IM); infectado pela cepa RH (ACT) e infectado crônico pela cepa ME-49 (CHR). (D) mostra a evolução de EVs-mouse após infecção por *T. gondii* (cepa ME-49). (E) mostra EVs derivadas de soro do grupo N (linha vermelha) e do grupo EV-IM (linha preta). Os dados dos quatro gráficos representam três leituras por amostra. Esses experimentos foram realizados 3 vezes para confirmar os resultados. As diferenças entre os grupos foram calculadas estatisticamente pelo Teste *t* de Student não pareado (unicaudal) e ANOVA unidirecional ©.

#### 4.9 Morfologia das EVs de soro murino analisadas por MET

As EVs-mouse foram analisadas por MET para caracterização morfológica. Os resultados determinados pelo NTA foram confirmados microscópicamente, mostrando a presença das EVs. (Figura 23). Nestas imagens observam-se vesículas com tamanhos característicos de exossomos (120 nm).

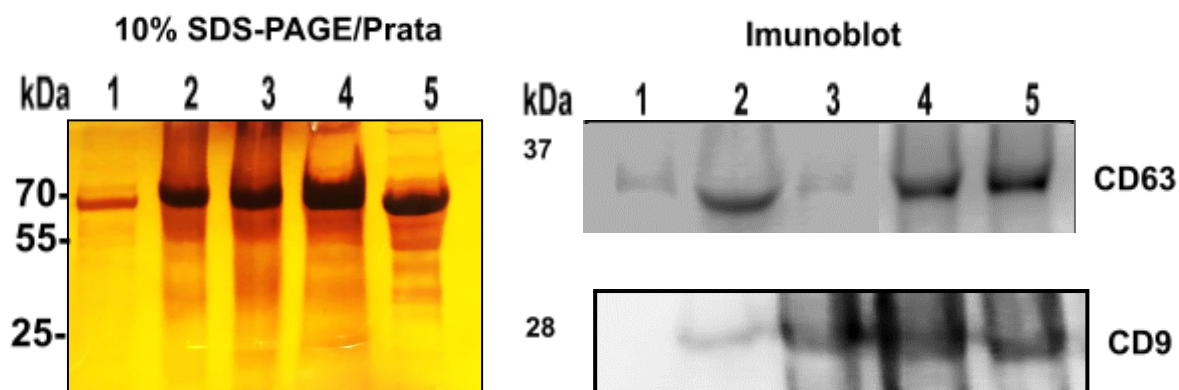


**Figura 23.** Imagens captadas por MET de preparações de EVs de soros “pool” de camundongos infectados com as cepas ME-49 (A), RH (B) e VEG (C). As imagens D e E mostram as EVs purificadas de soros de camundongos não infectados e imunizados com EVs, respectivamente. Aumento de 150 000 vezes.

#### 4.10 Análise eletroforética e imune das EVs purificadas de soros

O perfil eletroforético das EVs-mouse proveniente de soros de camundongos foi analisado por SDS-PAGE-10%. A seguir foram avaliados a presença das tetraspaninas (proteínas transmembranas, características de exossomos) CD-9 e CD-63. A Figura 24 mostra as marcações de ambos os

anticorpos, indicando a presença de exossomos nos purificados das EVs e a intensa marcação nas provenientes de soros dos animais infectados e dos imunizados.



**Figura 24.** Eletroforese (SDS-PAGE10%) corada com nitrato de prata, contendo EVs de soros. Imunoblot indicando as tetraspaninas CD63 e CD9, de 37 kDa e 28 kDa, respectivamente. As EVs analisadas foram provenientes de “pool” de soros de camundongos negativos (1); imunizados com EVs (2); infectados com a cepa RH (3); infectados com a cepa ME-49 (4); e infectados com a cepa VEG (5).

#### 4.11 EVs estimulam esplenócitos de camundongos *in vitro* a produção de citocinas

Esplenócitos de camundongos dos grupos N, EV-IM e CHR foram reestimulados *in vitro* com EVs liberadas por *T. gondii*. Em seguida, a produção das citocinas de IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17 foram determinadas por ELISA no sobrenadante dos esplenócitos coletados dos três grupos de camundongos. Em paralelo, os controles também foram avaliados nas mesmas condições. As células tratadas com Con A ou LPS tiveram uma excelente proliferação. Não houve proliferação nos controles negativos, que continham culturas de esplenócitos na ausência de antígeno (Figura 25).

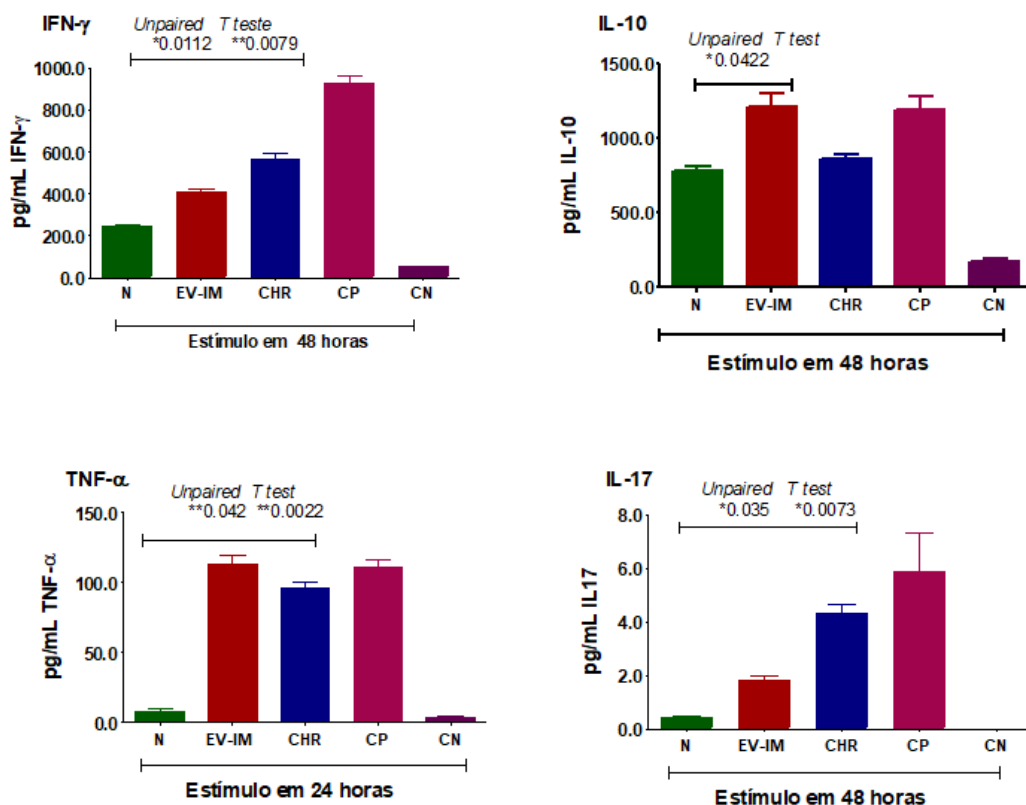
Esplenócitos dos grupos EV-IM e CHR estimulados com EVs de *T. gondii*, por 48 h produziram níveis semelhantes de IFN- $\gamma$  (406,8 pg/mL e 566,6 pg/mL, respectivamente). Os esplenócitos de camundongos do grupo N produziram baixas quantidades de IFN- $\gamma$  (246,8 pg/mL). As diferenças entre o grupo N dos grupos EV-IM ou CHR foram estatisticamente significativas em  $p = 0,0112$  e  $p = 0,0079$ , respectivamente.

Os esplenócitos do grupo EV-IM estimulados com EVs de *T. gondii*, por 48h produziram níveis elevados de IL-10 (1214,55 pg/mL) quando comparados aos dos grupos CHR e N (867,35 pg/mL e 782,9 pg/mL), respectivamente. A diferença entre os grupos N e EV-IM foi estatisticamente significativa ( $p=0,0422$ ).

Níveis de TNF- $\alpha$  determinados em esplenócitos murinos, estimulados com EVs produzidos por *T. gondii* por 24 h, nos grupos EV-IM e CHR foram 113,6 pg/mL e 96,6 pg/mL, respectivamente. Ambos os valores foram superiores aos do grupo N (7,5 pg/mL). As diferenças entre o grupo N dos grupos EV-IM ou CHR foram estatisticamente significantes ( $p = 0,0042$  e  $p=0,0022$ , respectivamente).

Igualmente, os níveis de IL-17 em esplenócitos murinos dos grupos EV-IM e CHR foram de 1,82 pg/mL e 4,32 pg/mL, respectivamente. Ambos os valores foram superiores aos do grupo N (0,41 pg/mL).

Tanto no grupo N, quanto no grupo EV-IM ou CHR houve diferenças estatisticamente significantes ( $p = 0,035$  e  $p = 0,0073$ , respectivamente) (Tabela 3). Comparações entre todos os grupos para IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17 mostraram-se estatisticamente significativas com  $p = 0,0001$ ,  $p = 0,003$ ,  $p = 0,0001$  e  $p = 0,0053$ , respectivamente.



**Figura 25.** Produção de citocinas em esplenócitos murinos após estimulação com EVs *in vitro*. Esplenócitos ( $1 \times 10^6$ /poço), N (colunas verdes), EV-IM (colunas vermelhas) e CHR (colunas azuis) foram reestimulados com EVs (100  $\mu$ g/mL) para IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-17. Os sobrenadantes foram coletados após 24 ou 48 horas e os níveis de citocinas foram determinados por ELISA. Os esplenócitos foram coletados de baços de três camundongos (por experimento). Os valores representam a média  $\pm$  SEM de cada quantidade de citocina (pg/mL). CN, controle negativo (colunas roxas), culturas de esplenócitos na ausência de EVs de *T. gondii*. CP, controle positivo (colunas rosas), ConA para IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17 e LPS para TNF- $\alpha$ .

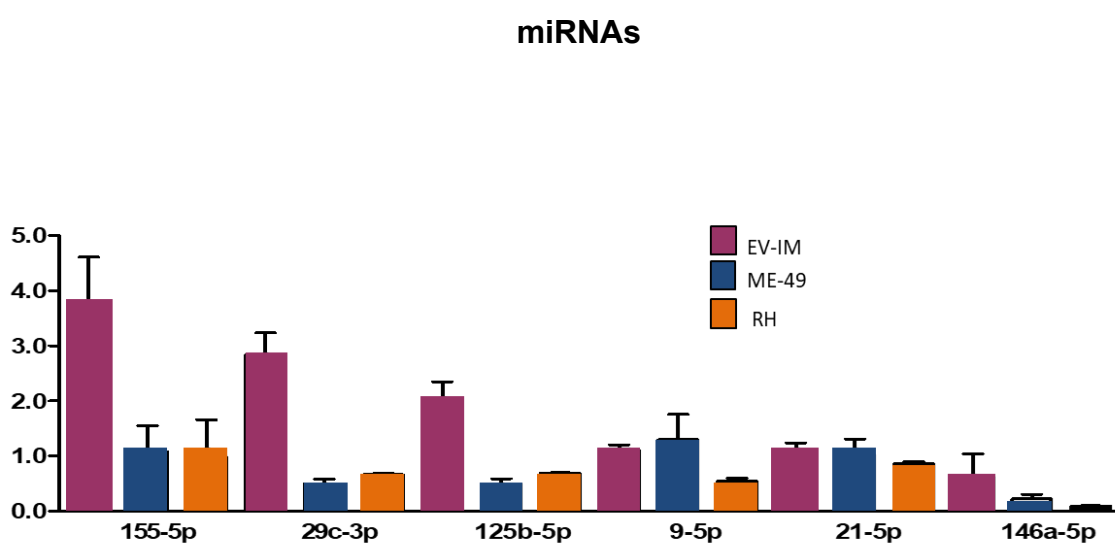
**Tabela 3.** Diferenças entre os grupos foram calculadas estatisticamente pelo Teste *t* de Student não pareado (unicaudal) e ANOVA unidirecional.

ANOVA unidirecional	IFN- $\gamma$	IL-10	TNF- $\alpha$	IL-17
Diferenças estatisticamente significativas entre as médias	Sim	Sim	Sim	Sim
R quadrado	0.9947	0.9768	0.9936	0.9235
F	233.4	52.67	194.6	15.10
P value	****0.0001	***0.003	****0.0001	**0.0053

#### 4.12 Expressão de miRNAs em camundongos imunizados com EVs liberadas por *T. gondii*

Os experimentos de expressão gênica foram realizados para determinar se *T. gondii* poderia afetar a expressão de miR-155- 5p, miR-29c- 3p, miR-125b- 5p, miR-9- 5p, miR-21-5p e miR-146a-5p no modelo experimental murino. A qualidade da extração de RNA em todas as amostras foi comprovada após resultados positivos para Cel-miR-39 em qPCR, que foi utilizado como controle externo, após a inclusão da molécula sintética.

A Figura 26 mostra os valores de RQ de cada miRNA testado em soros dos grupos EV-IM, RH e ME-49. Os miRNAs estudados foram mais expressos nos camundongos imunizados do que nos infectados (grupos RH e ME-49). O grupo EV-IM expressou miR-155-5p, miR-29c-3p e miR-125b-5p, com valores médios de RQ (ou mais expressos que o grupo N) de 3,78, 2,84 e 1,95, respectivamente. Os demais (miR-9-5p, miR-21-5p e miR-146a-5p) foram pouco expressos com valores de RQ de 1,11, 1,13 e 0,62, respectivamente. No grupo ME-49, miR-155-5p, miR-9-5p e miR-21-5p tiveram valores de RQ de 1,08, 1,29 e 1,35, respectivamente. Os demais miRNAs analisados no grupo ME-49 e todos no grupo RH foram pouco expressos (valores abaixo de 1,0).



**Figura 26.** Valores de RQ de cada miRNA testado em soros de camundongos de grupos EV-IM (colunas rosas), ME-49 (colunas azuis) e RH (colunas laranjas).

## 5. DISCUSSÃO

As EVs, incluindo exossomos e microvesículas, estão envolvidas em diferentes funções, entre elas, destacam-se a transferência de macromoléculas e biomarcadores que podem interagir com moléculas específicas do sistema imunológico (Yu et al., 2006; Delabbranch et al., 2012; Yang et al., 2019). Assim, estudos envolvendo imunização usando EVs como imunógeno foram realizados em diferentes modelos (Bhatnagar et al., 2007; Martin-jaular et al., 2011; del Cacho et al., 2012; Schwab et al., 2015; Chaiyadet et al., 2019).

EVs-toxo transportam e liberam ESA, que participam na invasão de taquizoítos nas células hospedeiras e estimulam o sistema imunológico do hospedeiro (Bhatnagar et al., 2007; Jongert et al., 2008; Weilhammer et al., 2011; Delabbranch et al., 2012; Li et al., 2018). Deste modo, mostramos aqui a capacidade das EVs-toxo secretadas pelos taquizoítos em estimular a resposta imune protetora do hospedeiro contra a infecção por *T. gondii*.

Inicialmente, as EVs-toxo foram purificadas a partir de taquizoítos mantidos *in vitro* para uso nas imunizações. Duas linhagens isogênicas de camundongos foram usadas para entender se tal resposta imune seria capaz de reduzir os taquizoítos no sangue. Assim, os camundongos não imunizados foram desafiados com uma dose letal de *T. gondii*. Os resultados mostraram que a imunização com EVs-toxo contribuiu para controlar a infecção, reduzindo a parasitemia e aumentando o índice de sobrevivência nas duas linhagens de camundongos. A diferença na parasitemia e sobrevivência foi estatisticamente significativa entre os camundongos imunizados com EVs e negativos (em ambas as linhagens). Esses dados podem sugerir a capacidade das EVs-toxo em estimular a resposta imune protetora. Experimentos de ELISA e imunotransferência usando ALT (antígeno bruto de *T. gondii*) nos levaram a supor que as EVs-toxo liberadas por taquizoítos transportam antígenos do parasita para as células hospedeiras.

As imunizações que usam antígenos de superfície e ESA, como grânulos densos, proteínas de micronemas e roptrias, desempenham um papel importante no estímulo da imunidade protetora (Hunter et al., 2012; Ivanova et al., 2016). Igualmente, a imunização com EVs-toxo liberadas por taquizoítos



desencadeou imunidade protetora, preferencialmente do tipo IgG1. A evolução dos anticorpos durante a imunização mostrou que camundongos imunizados com EVs-toxo tinham níveis mais baixos de IgM do que os crônicos com 50 dias de infecção. Ao mesmo tempo, ambos os grupos produziram altos níveis de IgG. As EVs-toxo desencadeiam uma alta concentração de IgG1 e baixa IgG2a. Sabe-se que a infecção crônica induz altos níveis de anticorpos IgG. Os crônicos apresentaram altos níveis de IgG2a e baixa produção de IgG1. Esses resultados também foram mostrados anteriormente quando os camundongos foram imunizados com ESA de *T. gondii* (Costa-silva et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012).

Os experimentos de opsonização confirmaram que os anticorpos anti-EVs foram capazes de neutralizar parcialmente a infecção, já que os camundongos infectados com taquizoítos incubados com IgG purificada de camundongos imunizados com EVs-toxo apresentaram diminuição da parasitemia e aumento do índice de sobrevivência. Provavelmente, esses anticorpos participam da ativação prévia do sistema complemento, a fim de facilitar a fagocitose e a eliminação da parasitemia e parasitismo nas células do tecido.

De acordo com a investigação em resposta celular, as análises de imuno-histoquímica indicaram que EVs-toxo produzidas por taquizoítos provocaram a expressão positiva de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10 e em menor concentração de IL-17. Os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  foram produzidos em todos os órgãos estudados nos camundongos imunizados com EVs-toxo e nos crônicos. Esses dados sugerem que, durante a infecção ativa, quando os taquizoítos e as EVs-toxo são liberados, o sistema imunológico do hospedeiro produz IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Ambas as citocinas estão envolvidas no controle da infecção (Gazzinelli et al., 1996; Denkers e Gazzinelli, 1998). A IFN- $\gamma$  induz a síntese de TNF- $\alpha$  em células infectadas com a intenção de controlar a infecção por *T. gondii* (Rosenberg et al., 2009). Como ambas as citocinas agem sinergicamente durante a infecção, é possível que EVs liberadas pelos taquizoítos possam ajudar no controle da infecção. A TNF- $\alpha$  desempenha papel importante na geração de intermediários reativos de nitrogênio como mediadores da resistência do hospedeiro à infecção precoce por *T. gondii*

(Jankovic et al., 2007; Dziadek et al., 2009). A correlação entre altos níveis de citocinas do tipo Th1 e a forte resposta imune humoral na imunização pelas EVs e na infecção por *T. gondii* sugere que as citocinas do tipo Th1 provocaram uma proteção dos camundongos contra um desafio letal com a cepa RH.

A IL-10 tem função vital no equilíbrio das respostas imunes. As Evs-toxo ativam células de camundongos imunizados para produzir essa citocina, evitando uma resposta imune excessiva que poderia causar inflamação extensa e danificar o tecido do hospedeiro (Gazzinelli et al., 1996; Anderson et al., 2007, Jankovic et al., 2007). A imunização com EVs-toxo também estimulou a resposta Th2, que elevou o nível de IL-10, essencial para equilibrar a resposta inflamatória excessiva associada à infecção aguda por *T. gondii* (Gazzinelli et al., 1996).

Com a finalidade de investigar as EVs-mouse produzidas em soros de camundongos, as amostras foram ultracentrifugadas. A sequência das análises incluiu a concentração de EVs-mouse por ultracentrifugação; evidência de proteínas exossomais como tetraspaninas nas EVs-mouse purificadas e; confirmação como tamanho e forma por NTA e microscopia eletrônica de estruturas características de EVs-mouse. As amostras/grupo analisadas foram constituídas de soros agrupados, em volume de 1mL de cinco camundongos por cada grupo. A concentração de EVs derivados do soro do grupo de camundongos negativos foi estatisticamente menor do que os infectados com *T gondii* (agudos e crônicos) e os imunizados com EVs-toxo. Os resultados de NTA também indicaram que grande parte das EVs-mouse provenientes de soro de camundongos infectados eram microvesículas, uma vez que os tamanhos das partículas eram diferentes do grupo de camundongos negativos. O tamanho das EVs-mouse produzidas pelos grupos de camundongos nas formas aguda e crônica foram maiores que as do grupo de negativos.

Esta diferença não foi observada em EVs-mouse purificados de camundongos imunizados. Esses resultados sugerem que EVs-mouse produzidas por hospedeiros infectados estão correlacionadas com a estimulação da resposta imune. Camundongos infectados com a cepa ME-49 desenvolvem parasitemia muito baixa. Após a forma aguda, que ocorre em

torno de 10 a 15 dias pós-infecção, dependendo da linhagem de camundongos ou da quantidade de parasitas utilizada para a infecção, instala-se a forma crônica da infecção (Home e Sibley, 1995). Coincidentemente observou-se um aumento semelhante da quantidade de EVs-mouse a partir deste período. Resultados semelhantes foram mostrados anteriormente em amostras humanas, uma vez que as concentrações de EVs derivadas do soro de pacientes soropositivos para toxoplasmose foram maiores do que aquelas de indivíduos não infectados (Cruz et al., 2020).

Embora a maioria das EVs-mouse fosse semelhante às microvesículas em amostras de camundongos infectados, a presença de exossomos também foi confirmada pela forma e pelo tamanho na MET. Além disso, não foi observada diferença na forma ou tamanho das EVs entre os grupos de camundongos, além da evidência das tetraspaninas CD63 e CD9 confirmadas em immunoblot após SDS-PAGE.

Esses dados indicam que a concentração de EVs é capaz de distinguir hospedeiros infectados de não infectados (Schwab et al., 2015; Cruz et al., 2020). De acordo com outros estudos, inflamações sistêmicas causadas por infecções graves aumentam a liberação de EVs que contêm fatores pró-inflamatórios incluindo os miRNAs, que causam a ativação direta da produção de citocinas (Karla et al., 2013; Nematian et al., 2018; Cruz et al., 2020). Conseqüentemente, a resposta imune celular correlacionada com a produção de EVs-mouse também foi investigada. Esplenócitos murinos foram estimulados com EVs-toxo derivadas de *T. gondii*. Os resultados de ELISA mostraram que os esplenócitos dos grupos imunizados e crônicos expressavam IFN- $\gamma$ ; TNF- $\alpha$  e IL-17 quando comparados com os do grupo negativo. Esses resultados estão correlacionados com o fato de que durante a infecção ativa, quando os taquizoítos estão liberando EVs-toxo, o sistema imunológico do hospedeiro produz IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17 para controlar a inflamação e a infecção (Denker e Gazzinelli, 1998; Filisetti e Candolfi, 2004).

Além disso, esses dados também sugerem uma ação sinérgica dessas citocinas para controlar a ação virulenta de EVs-toxo liberadas por taquizoítos. Curiosamente, a IL-10 foi expressa apenas em esplenócitos do grupo dos

camundongos imunizados com EVs-toxo. Certamente, a imunização estimulou a alta produção de IL-10 para prevenir a infecção (Gazzinelli et al., 1996; Maia et al., 2020).

Estudos anteriores mostraram que miRNAs regulam diferentes funções correlacionadas com respostas imunes celulares (Bartel, 2004; Verma et al., 2016) e alguns miRNAs podem ser detectados em hospedeiros infectados com *T. gondii* (Canella et al., 2014; Kim et al., 2016; Silva et al., 2018; Cruz et al., 2020; Meira-Strejevitch et al., 2020; Pereira et al., 2020). Consequentemente, neste estudo, os experimentos foram realizados para determinar se *T. gondii* poderia afetar a expressão de alguns miRNAs em modelos murinos. Um painel de miRNAs bem conhecido em amostras biológicas humanas já foi testado (Meira-Strejevitch et al, 2020; Pereira et al, 2020).

Curiosamente, os resultados dos miRNAs mostraram a expressão de miR-155-5p, miR-29c-3p e miR-125b-5p nos soros dos três grupos estudados, quando comparados com os do grupo de camundongos negativos. No entanto, os camundongos imunizados expressaram mais do que os infectados (grupos de camundongos agudos e crônicos). Embora muitas funções dos miRNAs sejam desconhecidas na toxoplasmose, algumas delas já foram estabelecidas em hospedeiros murinos e humanos. Estudos demonstraram que em camundongos, o miR-155-5p participa da modulação da atividade das células imunes durante a infecção por *T. gondii*. Em adição, ainda participa da diferenciação da resposta Th1 e é necessário para a expressão de citocinas pelas células T-reg. Este miRNA, é altamente expresso em subpopulações de células Th17 em humanos e camundongos (Canella et al., 2014; Escobar et al., 2014). Pacientes com toxoplasmose ocular apresentaram expressão exacerbada de miR-155-5p e miR-29c-3p. A produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  e IL-1B podem ser causados pelo excesso de miR-155-5p e miR-29c-3p (Maia et al., 2017; Meira-Strejevitch et al, 2020). Da mesma forma, o miR-29c-3p participa como regulador de Th1 e IFN- $\gamma$  na imunidade inata e adaptativa na infecção natural. As células imunes do hospedeiro produzem altos níveis de IFN- $\gamma$  por indução de *T gondii*. Este processo é ininterrupto para controlar a infecção em doenças agudas e crônicas. Um desequilíbrio na produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$

e iNOS tem um papel crítico na resposta imune em infecções intracelulares (Meira et al., 2014; Maia et al., 2017).

Indivíduos com toxoplasmose assintomática expressam miR-125-5p (Pereira et al., 2020). No entanto, uma elevação do TNF- $\alpha$  pode causar alta regulação do miR-125-5p. Este miRNA, ainda, desregula macrófagos infectados com *T. gondii* da cepa RH (Wei et al., 2010; Li et al., 2019). Entre os miRNAs investigados neste estudo, miR-9-5p, miR-21-5p e miR-146a-5p foram pouco ou não expressos em todos os grupos de camundongos estudados e não foi possível correlacionar com a infecção do hospedeiro.

Os experimentos sugerem que as EVs participam das respostas humorais e celulares do hospedeiro. Tais afirmações devem-se ao fato que as EVs-toxo carregam proteínas de *T. gondii* para estimular o sistema imunológico do hospedeiro e complementar o controle da infecção. Assim, EVs-toxo podem provocar um perfil combinado de Th1 e Th2, uma vez que ocorreram predominantes IgG1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas com um equilíbrio incluindo a produção de IL-10. A interação entre o hospedeiro e *T. gondii* também pode ocorrer via EVs. Da mesma forma, os miRNAs participam da modulação da resposta imune celular contra *T. gondii*. Esses dados fornecem subsídios para propor a discriminação entre hospedeiros infectados ou não infectados pela análise da concentração de EVs no soro.

## 7. CONCLUSÃO

1. A padronização e a produção de EVs de taquizoítos adaptados às culturas celulares foram estabelecidas com sucesso.
2. A imunização de camundongos A/Sn com as EVs liberadas por taquizoítos desencadeou proteção imunológica.
3. A detecção da classe de anticorpos IgM e as subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a) envolvidas na imunoproteção, mostrou-se preferencialmente do tipo Th2.
4. A investigação da produção das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em camundongos imunizados mostrou que EVs podem provocar um perfil combinado de Th1 e Th2, uma vez que foram detectadas predominantemente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , incluindo também a produção de IL-10.
5. Foi possível avaliar os índices de parasitemia e de sobrevida após o desafio com *T. gondii*.
6. Os ensaios de expressão gênica para miRNAs nas amostras de soro de camundongos foram realizados com sucesso, com o aumento na expressão de miR-155, miR-29c e miR-125b.

## 8. REFERÊNCIAS

Abbas AK LA, Pillai S. Propriedades gerais das respostas imunes. In: Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011a. p. 1-14 p.

Adell MA, Vogel GF, Pakdel M, Muller M, Lindner H, Hess MW, Teis D. Coordinated binding of Vps4 to ESCRT-III drives membrane neck constriction during MVB vesicle formation. J Cell Biol. 2014; 205: 33-49.

Adjogble KDZ, Mercies C, Dubremetz JF, Hucke C, Mackenzie CR, Cesbron-Delaw MF, et al. GRAB9, a new *Toxoplasma gondii* granule protein associated with the intravacuolar network of tubular membranes. Int J Parasitol. 2004; 34: 1255-1264.

Albrecht H, Skörde J, Arasteh K, Heise W, Stellbrink HJ. Disseminated toxoplasmosis in AIDS patients--report of 16 cases. Scand J Infect, 1995; Dis. 27:71-74.

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: 17.

Al-Kassab AK, Habte-Gabr E, Mueller WF, Azher Q. Fulminant disseminated toxoplasmosis in an HIV patient. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1995; 27: 183-5.

Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. CD4(+) CD25(-) Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. J Exp Med.; 2007 285-297.

Amato N V, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte MIS. Toxoplasmose. 4. ed. São Paulo: Sarvier; 1995. p.154.

Amendoeira MRR, Da Costa T, Spalding SM. *Toxoplasma gondii* Nicolle e Manceaux, 1909 (Apicomplexa: Sarcocystidae) e a Toxoplasmose. *Revista Souza Marques* 1999; 1: 15-35.

Anselmo LM, Vilar FC, Lima JE, Yamamoto AY, Bollela VR, Takayanagui OM. 2014. "Usefulness and limitations of polymerase chain reaction in the etiologic diagnosis of neurotoxoplasmosis in immunocompromised patients." *Journal of the Neurological Sciences*; 2014 346 (1-2): 231–234.

Araújo FAP, Souza WJS, Silva NRS, Rodrigues RJD. Inquérito epidemiológico sobre a toxoplasmose em granjas de suínos na região da grande Erechim, RS, Brasil. *Arq Fac Vet UFRGS*. 2000; 28: 61-9.

Arnold SJ, Kinney MC, McCormick MS, Dummer S, Scott MA. Disseminated toxoplasmosis. Unusual presentations in the immunocompromised host. *Arch Pathol Lab Med*. 1997; 121:869-73.

Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, Brisson AR. Extracellular vesicles from plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost*. 2014; 12: 614-17.

Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Oréfice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:55-62.

Barbosa CJDG, Molina RJ, Souza MB, Silva ACA, Micheletti AR, Reis MA. Disseminated toxoplasmosis presenting as sepsis in two AIDS patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007, 49:113-116.

Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116:281-297.

Bartel D.P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009; 136: 215–233.



Bastos da Silva I, Batista TP, Martines RB, Kanamura CT, Ferreira IM, Vidal JE, et al. Genotyping of *Toxoplasma gondii*: DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded autopsy tissues from AIDS patients who died by severe disseminated toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. 2016; 165: 16-21.

Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 205-215.

Bayraktar R, Van Roosbroeck K, Calin GA. Cell-to-Cell Communication: MicroRNAs as Hormones. *Mol. Oncol*. 2017; 11:1673–1686.

Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2009; 11: 1750-1757.

Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect*. 2007;9:1614-1622.

Bellingham SA, et al. Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? 2012.

Besteiro S. The role of host autophagy machinery in controlling *Toxoplasma* infection. *Virulence*. 2019 Dec;10(1):438-447.

Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schroey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007; 9: 3234-3244.

Blader IJ, Coleman BI, Chen CT, Gubbels MJ. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. *Annu Rev Microbiol*. 2015; 69: 463-85.

Blader IJ, Saeij JP. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS*. 2009;117:458-76.

Blackman MJ, Bannister LH. Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 117: 11-25.

Bliss SK, Butcher BA, Denkers EY. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol*. 2000;165:4515-21.

Botterel F, Ichai O, Feray C, Bouree P, Saliba S, Raspa RT, Samuel D, Romand S. Disseminated Toxoplasmosis, resulting from Infection of Allograft after Orthotopic Liver Transplantation: Usefulness of Quantitative PCR. *J Clin Microbiol*. 2002; 1648-1650.

Borges RT, Corrêa DF, Neto PDB, Rocha LB, Araujo FMS, Sousa BA. Toxoplasmose e suas repercussões oftalmológicas – uma revisão. *Rev Med Saude Brasilia* 2017; 6:261-9.

Bossi P, Paris L, Caumes E, Katlama C, Danis M, Bricaire F. Severe Acute Disseminated Toxoplasmosis Acquired by an Immunocompetent Patient in French Guiana. *Scand J Infect Dis*, 2000. 311-313.

Bowen LN, Smith B, Reich D, Quezado M, Nath A. HIV-associated opportunistic CNS infections: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Neurology* 2016; 12: 662 – 674.

Bulow R, Boothroyd JC. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J Immunol*. 1991; 47: 3496-500.

Buzoni-Gatel D, Debbabi H, Mennechet FJ, Martin V, Lepage AC, Schwartzman JD, et al. Murine ileitis after intracellular parasite infection is controlled by

TGF-beta-producing intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 2001;120:914-24.

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.

Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2009; 7(4):147-154.

Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M. Manifestações neurológicas de toxoplasmose em AIDS. *DST – J Bras Doenças Sex Transmis*. 2003;15, 46-50.

Camargo ME. Toxoplasmosis. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) *Diagnósticolaboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001: 65-174.

Camilo LM, Pereira-Chiocola VL, Gava R, et al. “Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil.” *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2107; (6):638-647.

Campos JH, Soares RP, Ribeiro K, Cronemberger-Andrade A, Batista WL, Torrecilhas AC. Extracellular vesicles: role in inflammatory responses and potential uses in vaccination in cancer and infectious diseases. *J Immunol Res*. 2015; 2015: 1-14.

Canella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, et al. miR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep*. 2014;6:928-937.

Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2002; 81: 111-122.

Carruthers VB, Sibley LD. Sequential proteins secretion from three distinct organelle of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. *Eur J Cell Biol*. 1997; 73: 114-123.

Carruthers VB, Sibley LD. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol Microbiol*. 1999; 31: 421-8.

Chaiyadet S, Sotillo J, Krueajampa W, Thongsen S, Brindley PJ, Sripa B, Loukas A, Laha T. Vaccination of hamsters with *Opisthorchis viverrini* extracellular vesicles and vesicle-derived recombinant tetraspanins induces antibodies that block vesicle uptake by cholangiocytes and reduce parasite burden after challenge infection. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2019; 28.

Chen Z, O'Shea JJ. Regulation of IL-17 production in human lymphocytes. *Cytokine*. 2008;41:71–8.

Cronemberger-Andrade A, Aragão-França L, de Araujo CF, et al. Extracellular vesicles from leishmania-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naive macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 9: e3161.

Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and other extracellular vesicles: the new communicators in parasite infections. *Trends Parasitol*. 2015; 10: 477-89.

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009; 19: 43-51.

Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveira AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS, Focaccia R, Pereira-Chiocola 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: 5044-5047.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014; 30: 255-89.

Connolly MP, Goodwin E, Schey C, Zummo J. Toxoplasmic encephalitis relapse rates with pyrimethamine-based therapy: systematic review and meta-analysis. *Pathog Glob Health*. 2017; 111:31-44.

Contreras MD, Sandoval ML, Salinas P, Muñoz P, Vargas S. Utilidad diagnóstica de ELISA IgG, IgM, IgA y ELISA avidéz de IgG em toxoplasmosis reciente y crónica. *Bol Chil Parasitol*. 2000; 55:1-10.

Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ*. 2000;32:142-7.

Coombes JL, Charsar BA, Han SJ, Halkias J, Chan SW, Koshy AA, et al. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:E1913-22.

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

Cordeiro CA, Moreira PR, Costa GC, Dutra WO, Campos WR, Oréface F, et al. TNF-alpha gene polymorphism (-308G/A) and toxoplasmic retinochoroiditis. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:986-8.

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: 227-234.

Costa-Silva, T.A., Borges, M.M., Galhardo, C.S., Pereira-Chiocola, V.L. Immunization with excreted/secreted proteins in A/Sn mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop*. 2012; 203-209.

Coutinho SG VT. Toxoplasmose. In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 815-29.

Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. microRNAs and cancer. *APMIS*. 2007; 115:1090–1106.

Cruz AB, Maia MM, Pereira IS, et al. Human extracellular vesicles and correlation with two clinical forms of toxoplasmosis. *PLoS One*. 2020.

Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:479–89.

Da Gama LM, Ribeiro-Gomes FL, Guimarães U, Arnholdt ACV. Reduction in adhesiveness to extracellular matrix components, modulation of adhesion molecules and in vivo migration of murine macrophages infected with *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect*. 2004;6:1287–96.

de Moura L, Bahia-Oliveira LM, Wada MY, Jones JL, Tuboi SH, Carmo EH, et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:326-9.

de Amorim Garcia CA, Oréfica F, De Oliveira Lira C, Bezerra Gomes A, França M, Amorim Garcia Filho CA. Socioeconomic conditions as determining factors in the prevalence of systemic and ocular toxoplasmosis in northeastern Brazil. *Ophthalmic Epidemiology*. 2004; 11: 301-317.

Debierre-Grockiego F, Moiré N, Torres Arias M, Dimier-Poisson I. Recent Advances in the Roles of Neutrophils in Toxoplasmosis. Trends Parasitol. 2020; (12):956-958.

del Cacho E, Gallego M, Lee SH, Lillehoj HS, Quilez J, Lillehoj EP, Sánchez-Acedo C. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. Infect. Immun. 2012; 80, 1909–1916.

Delabbranch X, Berger A, Boisrame-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. Med Mal Infect. 2012;42:335-343.

Denkers, E.Y., Gazzinelli, R.T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998; (11) 569–588.

Dubey JP, Miller NL, Frenkel JK. The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. J Exp Med. 1970; 132:636-62.

Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. J Eukaryot Microbiol. 2008; 55:467-75.

Dubey JP. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1998;28:1019-24.

Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis. Parasitol Today. 1993;9:452-458.

Dubey JP. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol. 2004;126:57-72.

Dubey JP. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. Parasit Vectors. 2021; 14(1):263.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology*. 2012;139:1375-424.

Dunay IR, Gajurel K, Dhakal R, Liesenfeld O, Montoya JG. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2018; 31:57–17.

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) 81-89.

Escobar TM, Kanellopoulou C, Kugler DG, et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA binding protein Jarid2 to relieve polycomb mediated repression. *Immunity*. 2014; 40:865-879.

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

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

Frenkel JK. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. *Bull N Y Acad Med*. 1974; 50:182-91.

Frenkel JF, Vidal JE: Toxoplasmosis, In: tratado de infectologia 4<sup>a</sup>. Ed. Veronesi R, Focacci R, Atheneu. São Paulo Brasil. 2010

Gadea I, Cuenca M, Benito N, Pereda J, Soriano F. Bronchoalveolar Lavage for the diagnosis of disseminated toxoplasmosis in Aids patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1995; 22, 339-341.



Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol*. 2011;23:613–9.

Garweg JG, Candolfi E. Immunopathology in ocular toxoplasmosis: facts and clues. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104, 211-20.

Gattás VL, Nunes EM, Soares ALB, Pires MA, Pinto PLS, Andrade Jr, HF. Acute toxoplasmosis outbreak at Campus of the University of São Paulo related to food or water oocyst contamination. In, International Conference on Emerging Infectious Diseases. 2000; Atlanta, Georgia, USA, p.135.

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-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1996;157:798-805.

Gjorgjieva M, Sobolewski C, Dolicka D, Correia de Sousa M, Foti M. miRNAs e NAFLD: From pathophysiology to therapy. *Intestino*. 2019.

Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, Martins MC, Burnier Júnior M, Silveira S, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992; 114, 136-44.

Gregg B, Taylor BC, John B, Tait-Wojno ED, Girgis NM, Miller N, et al. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. *Infect Immun*. 2013; 81, 1635-43.

Grimwood J, Smith JE. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int J Parasitol*. 1996; 26: 169-73.

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

Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol.* 1983; 97: 329-39.

Hedman K, Lappalainen M, Seppaia I, Makela O. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 1989; 159: 736-740.

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

Hill DE, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* as a Parasite in Food: Analysis and Control. *Microbiol Spectr.* 2016; p.4.

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

Holland GN et al. Analysis of recurrence patterns associated with toxoplasmic retinochoroiditis. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145: 1007-1013.

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood.* 2004; 104: 2761-66.

Hunter CA, Bermudez L, Beernink H, Waegell W, Remington JS. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits interleukin-12 induced production of interferon- $\gamma$  by natural killer cells: A role for transforming growth factor- $\beta$  in the regulation of T-cells independent resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur J of Immunol* 1995; 25: 994-1000.

Hunter, C.A., Sibley, L.D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; (10) 766-778.

Ivanova, D.L., Fatima, R., Gigley, J.P. Comparative analysis of conventional natural killer cell responses to acute infection with *Toxoplasma gondii* strains of different virulence. *Front. Immunol.* 2016; (7):347.

Ivanova DL, Mundhenke TM, Gigley JP. The IL-12- and IL-23-Dependent NK Cell Response Is Essential for Protective Immunity against Secondary *Toxoplasma gondii* Infection. *J Immunol.* 2019;203(11):2944-2958.

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. Conventional T<sub>H</sub>1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *J. Exp. Med.* 2007; 204: 273-283.

Jebbari H, Roberts CW, Ferguson DJP, Bluethmann H, Alexander J. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 1998; 20: 231-239.

Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Kapperud G, Whitelaw A, Eskild A, Eng J. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35.940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 2900-2906.

Jongert, E., Melkebeek, V., De Craeye, S., Dewit, J., Verhelst, D., Cox, E. An enhanced GRA1–GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs *Vaccine.* 2008; 1025-1031.

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

Kanada M, Bachmann MH, Hardy JW, Frimannson DO, Bronsart L, Wang A, Sylvester MD, Schmitd TL, Kaspar RL, Butte MJ, Matin AC, Contag CH. Differential fates of biomolecules delivered to target cells via extracellular vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015; 12: 433-442.

Kalra H, Adda CG, Liem M, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*. 2013; 13:3354-3364.

Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, and Altevogt P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*. 2006; 107:102-108.

Kim MJ, Jung BK, Cho J, et al. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J Parasitol*. 2016; 54:147-154.

Kim K, Weiss LM. *Toxoplasma*: the next 100 years. *Microbes Infect*. 2008; 10:978-84.

Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med*. 2005; 118: 212-216.

Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989; 170:827-45.

Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool*. 1980; 27:37-58.

Li Y, Liu Y, Xiu F, et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomed*. 2018;19:467-477.

Li S, Yag J, Wang L, et al. Expression profile of microRNAs in porcine alveolar macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. *Parasit Vectors*. 2019;12:65.

Liesenfeld O, Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett JG, Merigan TC, Bolognesi D, eds. Textbook of AIDS medicine, 2 ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1999. p. 225-59.

Liu D, Ling Q, Venkateshan VS, Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. A clinicopathological study of eighteen autopsy cases with acquired toxoplasmosis. 1995; 13: 64-67.

Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. Trends Parasitol. 2002;18:198-201.

Maia MM, Cruz AB, Taniwaki NN, et al. Immunization with extracellular vesicles excreted by *Toxoplasma gondii* confers protection against infection in mice activating cellular and humoral responses. Int J Parasitol. 2021;51(7):559-569.

Maia MM, Meira-Strejevitch CS, Pereira-Chioccola VL, et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. Parasite Immunol. 2017;3:12462.

Mantel PY, Hoang AN, Goldowitz I, et al. Malaria-infected erythrocyte-derived microvesicles mediate cellular communication within the parasite population and with the host immune system. Cell Host and Microbe. 2013; 5: 521-534.

Martin-Jaular L, Nakayasu ES, Ferrer M, Almeida IC, Del PH. Exosomes from plasmodium yoelii-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. PLoS One. 2011; 6.

Martins- Duarte E S; Adesse D. *Toxoplasma gondii*: Biology and Role in Health and Disease. Nova; November 11, 2021. p.2.

Mastroianni A, Coronado O, Scarani P, Manfredi R, Chiodo F. Anergic disseminated toxoplasmosis in a patient with AIDS. Case report. Minerva Med. 1997;88:101-104.

Medeiros BC, Medeiros CR, Werner B, Loddo G, Pasquini R, Bieggi-Torres LF. Disseminated toxoplasmosis after bones marrow transplantation: report of 9 cases. *Transplant Infectious Disease*. 2001. 3, 24-28.

Meira-Strejevitch CS, Pereira IS, Hippólito DDC, et al. Ocular toxoplasmosis associated with up-regulation of miR-155- 5p/ miR-29c- 3p and down-regulation of miR-21- 5p/ miR-125b- 5p. *Cytokine*. 2020;127:154990.

Meira CS, Costa-Silva TA, Vidal JE, Ferreira IM, Hiramoto RM, Pereira-Chiocola 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, 845–850.

Meira CS, Pereira-Chiocola VL, Vidal JE, de Mattos CC, Motoie G, Costa-Silva TA, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front. Microbiol*. 2014; 13(5): 492.

Mele A, Paterson PJ, Prentice HG, Leoni P, Kibbler CC. Toxoplasmosis in bone marrow transplantation: a report of two cases and systematic review of the literature. *Bone Marrow Transplant*. 2002 ;29:691-8.

Mennechet FJ, Kasper LH, Rachinel N, Li W, Vandewalle A, Buzoni-Gatel D. Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen. *J Immunol*. 2002;168:2988-96.

Merchant ML, Rood IM, Jeroen KL, Degeens KL, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. *Nature Reviews Nephrology*. 2017; 13: 73-749.

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.” *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14 (4): 346-50.

Mesquita RT, Ziegler AP, Hiramoto RM, Vidal JE, Pereira-Chiocola VL. "Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients." *Journal Medical of Microbiology*. 2010; 59 (Pt 6):641-647.

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

Muller WA, Randolph GJ. Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc Biol*. 1999; 66: 698-704.

Munoz-Zanzi CA, Fry P, Lesina B, Hill D. *Toxoplasma gondii* oocyst-specific antibodies and source of infection. *Emerg Infect Dis*. 2010;16:1591-3.

Murat JB, Hidalgo HF, Brenier-Pinchart MP, Pelloux H. "Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?" *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2013; 11 (9): 943–956.

Nematian SE, Mamillapalli R, Kadakia TS, Majidi Zolbin M, Moustafa S, Taylor HS. Systemic inflammation induced by microRNAs: endometriosis-derived alterations in circulating microRNA 125b–5p and Let-7b- 5p regulate macrophage cytokine production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:64-74.

Neyer LE, Grunig 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: 1675-1682.

Neto EC, Anele E, Rubim R, Brites A, Schulte J, Becker D, et al. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int J Epidemiol*. 2000;29:941-947.

Nogueira OAE. Toxoplasmose: Um problema de saúde Pública. 2005. 88f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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.

Panteleev MA, Abaeva AA, Balandina AN, Belyaev AV, Nechipurenko DY, Obydennyi SI, Sveshnikova AN, Shibeko AM, Ataulakhanov FI. Extracellular vesicles of blood plasma: content, origin, and properties. Membrane and cell biology. 2017; 11: 187-192.

Pereira IS, Maia MM, Cruz AB, et al. Plasma extracellular microRNAs are related to AIDS/cerebral toxoplasmosis co-infection. Parasite Immunol. 2020;42:e12696.

Petersen E. Prevention and treatment of congenital toxoplasmosis. Expert Rev Anti Infect Ther 2007; 5: 285-293.

Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Rev. 2007; 3: 157-71.

Previato M, Frederico FB, Murata FH, et al. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. BMC Res Notes 2015; 8: 746.

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

Pope SM, Lasser C. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. J. Extracel Vesic. 2013; 11.2.



Rabaud C, May T, Amiel C, Katlama C, Leport C. Extracerebral toxoplasmosis in patients infected with HIV. A French National Survey. *Medicine (Baltimore)*, 1994; 73: 306-314.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*. 2013; 200: 373-83.

Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, Ratajczak MZ. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006; 5: 847-56.

Remington JS, Klein JO. *Infections diseases of the fetus and newborn infant*. 4 ed. W B Saunders Company. 1995, 140-268.

Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 941-945.

Rey L. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose. In: *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.p.321-334.

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.

Robert-Gangneux F, Belaz S. "Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients." *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2016; 29 (4): 330–9.

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* 27, 2009; 2489-2498.

Ruiz ML. A Novel Case of Solitary Cerebral Toxoplasmosis Mimicking Glioblastoma as the First Presentation of HIV. *J Clin Neurol*. 2016; 12: 248–250.

Sabin AB, Feldman HA. Dyes as microchemical indicators of new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite *Toxoplasma*. *Science* 1948; 108: 660-663.

Sanchez MCA. Testes Sorológicos. In: Ferreira AW, Ávila SLM (eds.) *Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p. 9-44.

Schmidt. Clinical features and outcomes in patients with disseminated toxoplasmosis admitted to intensive care: a multicenter study. *Clinical Infectious Diseases*; 2013, 57:1535–1541.

Schnitzer JK, Berzel S, Fajardo-Moser M, Remer KA, Moll H. Fragments of antigen-loaded dendritic cells (DC) and DC-derived exosomes induce protective immunity against *Leishmania major*. *Vaccine*. 2010; 36: 5785-5793.

Schwab, A, Meyering, SS, Lepene, B., Iordanskiy, S., van Hoek, M.L., Hakami, R.M., Kashanchi, F. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front. Microbiol*. 2015; 20, 1132.

Scott P, Hunter CA. Dendritic cells and immunity to leishmaniasis and toxoplasmosis. *Curr Opin Immunol* 2002; 14: 466-470.

Secretaria da Saúde do Governo do Estado do Rio Grande do Sul, disponível em:<https://estado.rs.gov.br/divulgados-novos-dados-sobre-surto-de-toxoplasmo-se-em-santa-maria>.

Silva MC. Toxoplasmose com ênfase no diagnóstico. *Rev Saúde Pub Zoon*.2008; 9, 154-259.

Silva VO, Maia MM, Torrecilhas AC, et al. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunol.* 2018;40:e12571.

Sobolewski C, Calo N, Portius D, Foti M. MicroRNAs in fatty liver disease. *Semin. Liver Dis.* 2015;35:12–25.

Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc.* 2006; 78: 271-291.

Souza W, Martins Duarte ES, Lemgruber L, Attias M, Vommaro RC. Structure organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. *Scientia Medica* 2010; 1:131-143.

Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic.* 2002; 3: 32-30.

Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 2000;30:1217-58.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006.

Théry C et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 2018 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

Trocolo-Torrecilhas AC, Tonelli RR, Pavanelli WR, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection.* 2009; 1: 29-30.

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

Twu O, de Miguel N, Lustig G, et al. *Trichomonas vaginalis* exosomes deliver cargo to host cells and mediate host parasite interactions. *PLoS Pathogen*. 2013; 7: e1003482.

Ueno N, Harker KS, Clarke EV, McWhorter FY, Liu WF, Tenner AJ, et al. Real-time imaging of *Toxoplasma*-infected human monocytes under fluidic shear stress reveals rapid translocation of intracellular parasites across endothelial barriers. *Cell Microbiol*. 2014;16:580–95.

Van der Pol W, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev*. 2012; 64: 676-705.

Verma P, Pandey RK, Prajapati P, Prajapati VK. Circulating microRNAs: Potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases. *Front Microbiol*. 2016;7:1274.

Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2019; 18:2325958219867315.

Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveira AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR assay using cerebrospinal fluid for diagnosis of cerebral toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4765- 4768.

Villard O, Filisetti D, Roch-Deries F, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3537-3541.

Xu R, Greening DW, Zhu HJ, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1152-62.

Wang J-L, Zhang N-Z, Li T-T, He J-J, Elsheikha HM, Zhu X-Q. Advances in the Development of Anti-Toxoplasma gondii Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Trends in Parasitology* 2019; 35: 239-253.

Wei B, Pei G. Micrnas: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010;7:175-181.

Weilhammer DR, Rasley, A. Genetic approaches for understanding virulence in *Toxoplasma gondii*. *Brief Funct Genomics*, 2011; 365-373.

Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 895–901.

Weiss LM, Kim K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Front Biosci*. 2000;5: 391-405.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2006; 103:4034-4039.

Yang XX, Sun C, Wang L, Guo XL. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J Control Release*. 2019;17:119–129.

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med*. 2001;194:519–27.

Yenilmez E, Çetinkaya RA. Difference in *Toxoplasma gondii* Seroprevalence Rates Due to Low and High CD4 Counts in Patients with HIV/AIDS. *Turkiye Parazitol Derg*;2019; 43(1).

Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*. 2006; 66:4795-4801.

## Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA-IAL



### ANEXO E

São Paulo, 30 de agosto de 2018.

Protocolo 01/2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo das vesículas extracelulares de *Toxoplasma gondii* e a correlação com o sistema imune de hospedeiros infectados**”, sob a responsabilidade da **Dra. Vera Lúcia Pereira Chioccola**, funcionária do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, com o decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA). Este Projeto foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) na **81ª** reunião realizada em **21/08/2018**.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários, os quais permitirão a elaboração de relatórios anuais por esta CEUA-IAL, que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.

Vigência do Projeto	21/08/2018 a 01/05/2020
Espécie	Camundongos isogênicos
Linhagem	A/SN
Nº de animais	87
Idade	8 a 10 semanas
Peso	Aproximadamente 20 gramas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do Instituto Adolfo Lutz

Atenciosamente,

Dra. Raquel dos Anjos Fazioli  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IAL)  
Instituto Adolfo Lutz

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 351 - 11º Andar – Salas 1102  
Pacaembu - São Paulo - SP - CEP: 01246-000  
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

## Anexo 2 - Artigos Publicados

### Artigo 1

International Journal for Parasitology 51 (2021) 559–569



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpara](http://www.elsevier.com/locate/ijpara)



## Immunization with extracellular vesicles excreted by *Toxoplasma gondii* confers protection in murine infection, activating cellular and humoral responses



Marta Marques Maia<sup>a</sup>, Allecineia Bispo da Cruz<sup>a</sup>, Noemi Nosomi Taniwaki<sup>b</sup>, Gislene Mitsue Namiyama<sup>b</sup>, Ricardo Gava<sup>a</sup>, Aparecida Helena Souza Gomes<sup>c</sup>, Cristina Takami Kanamura<sup>d</sup>, Maria Lourdes Peris Barbo<sup>e</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Núcleo de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório Regional de Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup> Centro de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Morfologia e Patologia, Faculdade de Ciências Médicas e Saúde, Pontifícia Universidade Católica, São Paulo, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 6 August 2020

Received in revised form 19 November 2020

Accepted 23 November 2020

Available online 11 March 2021

##### Keywords:

*Toxoplasma gondii*

Extracellular vesicles

Immunization

Cellular and humoral response

#### ABSTRACT

The study aim was to analyze whether microvesicles and exosomes, named extracellular vesicles (EVs), purified from *Toxoplasma gondii* are able to stimulate the protective immunity of experimental mice when administered, as challenge, a highly virulent strain. EVs excreted from *T. gondii* tachyzoites (RH strain) were purified by chromatography and used for immunization assays in inbred mouse groups (EV-IM). Chronic infected (CHR) and naive (NI) mice were used as control groups, since the immune response is well known. After immunizations, experimental groups were challenged with 100 tachyzoites. Next, parasitemias were determined by real-time PCR (qPCR), and survival levels were evaluated daily. The humoral response was analyzed by detection of IgM, IgG, IgG1 and IgG2a, and opsonization experiments. The cellular response was evaluated in situ by immunohistochemistry on IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-17 expression in cells of five organs (brain, heart, liver, spleen and skeletal muscles). EV immunization reduced parasitemia and increased the survival index in two mouse lineages (A/Sn and BALB/c) infected with a lethal *T. gondii* strain. EV-IM mice had higher IgG1 levels than IgM or IgG2a. IgGs purified from sera of EV-IM mice were able to opsonize tachyzoites (RH strain), and mice that received these parasites had lower parasitemias, and mortality was delayed 48 h, compared with the same results from those receiving parasites opsonized with IgG purified from NI mice. Brain and spleen cells from EV-IM mice more highly expressed IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ . In conclusion, EV-immunization was capable of inducing immune protection, eliciting high production of IgG1, IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$ .

© 2021 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

#### 1. Introduction

*Toxoplasma gondii* is a protozoan with significant implications in public health. Most human *T. gondii* infections are asymptomatic, normally acquired by ingestion of tissue cysts from undercooked, raw meat, water/vegetables contaminated with oocysts excreted by definitive hosts (Montoya and Liesenfeld, 2004; Hill et al., 2005; Dubey, 2008; Pereira-Chioccola et al., 2009). When acute infection occurs during pregnancy, it causes severe neonatal mal-

formations and ocular complications in the fetus (Elbezz-Rubinstein et al., 2009; Olariu et al., 2011). Economically, infections during pregnancy, especially in sheep, often result in abortion, representing considerable economic loss (Dubey, 2009). Nevertheless, approximately 10–20% of toxoplasmosis cases are symptomatic as ocular or respiratory forms (Montoya and Liesenfeld, 2004; Pereira-Chioccola et al., 2009). Ocular forms are characterized by necrotic lesions and can result from infections acquired congenitally or after birth. These lesions can destroy neural retina architecture and sometimes choroid is affected (Glasner et al., 1992; Mattos et al., 2011; Ferreira et al., 2014; Previato et al., 2015). Reactivation of latent infection in immunosuppressed patients such as those undergoing cancer treatment or after trans-

\* Corresponding author at: Centro de Parasitologia e Micologia, Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo 351 8 andar, CEP 01246-902 São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: [pchioccola@gmail.com](mailto:pchioccola@gmail.com), [vera.chioccola@tal.sp.gov.br](mailto:vera.chioccola@tal.sp.gov.br) (V.L. Pereira-Chioccola).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.010>

0020-7519/© 2021 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



plantation, as well as those with immunodeficiencies, such as people living with HIV and without combination antiretroviral therapy, results in cerebral toxoplasmosis. In rare cases, disseminated toxoplasmosis might occur due to failure of the Th1 immune response (Bossi and Bricaire, 2004; Vidal et al., 2005; Vidal and Oliveira, 2013; Hernandez et al., 2017).

Tachyzoites invade any nucleated cell during acute infection, and rapidly disseminate throughout the body, inducing a systemic immune response (Noor et al., 2010). Thus, immunocompetent hosts induce cellular and humoral immune responses, resulting in lifelong immunity against reinfection. This process includes the active secretion of *T. gondii* antigens, which is important to stimulate the immune system with antibodies and T-cells (Carruthers, 2002; Filisetti and Candolfi, 2004). Most of them are excretory-secretory antigens (ESA) (Cesbron-Delauw and Capron, 1993; Zenner et al., 1999; Prigione et al., 2000), which represent the majority of circulating antigens in biological fluids from hosts with active toxoplasmosis (Meira et al., 2008, 2011). Thus, ESA contribute to stimulation of the humoral and cellular immune responses to control infection (Zenner et al., 1999; Costa-Silva et al., 2008, 2012).

In recent years, extracellular vesicles (EVs) have been widely studied, since they have different biological properties. EVs are a group of nano-particles produced and released by prokaryotic and eukaryotic cells. EVs play an important role in cell-cell communication, molecular transport and others (Théry et al., 2009). Functions of these nano-particles include delivery, under physiological or pathological conditions, of various cargos such as proteins, lipids, DNA, RNA, micro-RNA (miRNA), and other secretory components (Yu et al., 2006; Yang et al., 2019).

Basically, EVs comprise three subclasses, based on their origin or size. Exosomes are small vesicles (30–100 nm) derived from internal budding of vesicles in the lumen of the early endosome (Yu et al., 2006). Microvesicles range in size (100–1000 nm) and are produced by external budding from the plasma membrane. The apoptotic bodies are the largest EVs (1000–5000 nm) and they are released as blebs from cells undergoing programmed death (Mathivanan et al., 2010; Delabranche et al., 2012).

Recent studies have shown that EVs have intrinsic properties that promote immune responses, and present multiple ligands for innate immune activation. Consequently, EVs have been studied for use as a vaccine (Tan et al., 2018; Drurey et al., 2020; Kato et al., 2020; Mekonnen et al., 2020), since EVs load several antigens encapsulated within their lipid bilayer. Specific antigens are protected from degradation in the extracellular space and might be released in a measured fashion over time, thereby maximizing their immunogenicity. (Drurey et al., 2020).

Properties and functions of EVs released by *T. gondii* are not totally established. However, the proteomic profile is known, and is composed of a wide range of proteins. Most of those are included in the ESA group (Wovk et al., 2017). In addition, these EVs (exosomes and microvesicles) contain miRNA and they were immunologically recognized by the host immune response, inducing humoral and cellular responses, as IL-10, TNF- $\alpha$ , and iNOS (Li et al., 2018; Silva et al., 2018). Exosomes excreted by *T. gondii*-infected cells constituted an effective non-cellular vaccine, with antigen and adjuvant properties for the immune response (Aline et al., 2004; Beauvillain et al., 2007). In addition, *T. gondii* infection alters cell proliferation mechanisms of *T. gondii*-infected cells, neighboring cells and exosomes (Aline et al., 2004; Beauvillain et al., 2007; Kim et al., 2016). Recently, a study showed that the imbalance in the immune response of patients with toxoplasmosis could be correlated with the elevation of EVs produced in human serum (Cruz et al., 2020).

The knowledge that EVs may carry several components within their lipid bilayer that protect those from degradation in the extra-

cellular space, led us to investigate whether immunization with *T. gondii* released EVs could immunologically protect experimental mice against *T. gondii* infection when challenged with a highly virulent strain.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethical statements

This study was performed according to recommendations of Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL), Brazil and Conselho Nacional de Controle de Experimentação (CONCEA), Brazil. In addition, both Committees approved this study (Research Protocol: CTC 67-J/2017).

### 2.2. Mice, *T. gondii* and culture cells

Four-week-old female A/Sn inbred mice were used to maintain *T. gondii* strains for immunization and challenge assays. A/Sn mice are susceptible to *T. gondii*. Susceptibility was previously determined when they were compared with C57BL/6 and BALB/c mice for parasitemia after infection with a highly virulent strain (RH) (Costa-Silva et al., 2008).

Before immunization and challenge assays, the minimal parasite concentration for 100% mortality was determined using five groups of five A/Sn mice/each infected with 50, 100, 200, 500 and 1000 tachyzoites. Next, animals were monitored daily for mortality. These experiments were conducted twice to confirm the results.

To confirm the capacity of EV protection, immunization and challenge assays were also performed in a group of 4 week old female BALB/c inbred mice, which were assayed only for anti-EV antibody production, parasitemia and survival index. All mice used in experiments were obtained and maintained in the Animal Laboratory Center and Experimentation of Instituto Adolfo Lutz, Brazil.

Vero cell cultures were grown in medium 199 (Gibco-Life Technologies, USA) supplemented with L-glutamine (292 mg/L), sodium pyruvate (110 mg/L), glucose (1.0 g/L), sodium bicarbonate (2.2 g/L), gentamicin (5 mg/mL) and 10% fetal bovine serum (FBS). *Toxoplasma gondii* RH strain tachyzoites were maintained in mouse ascites by i.p. inoculations and Vero cell cultures. Tachyzoites from both mice and/or cell cultures were collected in RPMI 1640 medium (Gibco-Life Technologies, USA), pooled and centrifuged at 2000g for 10 min. Next the parasite suspension was washed twice, counted and suspended in PBS (0.1 M, pH 7.4) at different concentrations for infection of other cell cultures or groups of mice. For chronic infected controls, sera from A/Sn mice infected with *T. gondii* ME-49 strain cysts were used. Groups of five female mice were orally inoculated with 10 fresh brain cysts obtained from another mouse group, chronically infected 30 days prior.

### 2.3. Purification of *T. gondii* EVs for immunizations

Purified EVs were used in immunizations and for stimulation in cellular response experiments. The procedures for *T. gondii* EV purifications were done as described before (Silva et al., 2018). Tachyzoites (RH strain) from culture supernatants were washed five times (2500g, 10 min) in filtered PBS (0.1 M, pH 7.4) (1 mL). Next, parasites were resuspended in RPMI 1640 medium without FBS (1 mL) and maintained at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 2 h to release EVs. Then, tachyzoites were removed by centrifugation (10 min, 3500g). Supernatants containing EVs were filtered through 0.22  $\mu$ m sterile cartridges to remove any cell debris, and stored at -20 °C until use. EV purification was done by gel-exclusion chromatography, as described previously (Silva et al., 2018) in a

Sepharose CL-4B column (1 × 30 cm, GE Healthcare, Piscataway, USA) pre-equilibrated with 100 mM ammonium acetate, pH 6.5. Next, the column was eluted with the same buffer at a flow rate of 0.5 mL/min. The eluted product (approximately 20 mL) was collected in 1 mL aliquots.

Aliquots containing *T. gondii* EVs were selected by ELISA, using as antibody a pool of five human sera positive for toxoplasmosis. For a negative control, a pool of five human sera negative for toxoplasmosis was included. Reactions were performed in microtiter polystyrene plates (flat bottom, medium binding, Corning, USA), which were incubated overnight at 4 °C with 50 µL of each tube aliquot. After washing with 0.05% Tween 20-PBS, plates were blocked with 5% skim milk-PBS for 60 min at 37 °C. After that, 50 µL human sera pools, diluted 1:50 in 5% skim milk-PBS were incubated for 60 min at 37 °C. After five washes with Tween 20-PBS, wells were incubated for a further 60 min at 37 °C with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG (Sigma-Aldrich Corporation, USA) diluted 1:20,000 in 5% skim milk-PBS. Next, a new wash cycle with Tween 20-PBS, substrate solution (0.1 M citric acid, 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% *o*-phenylenediamine, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) was added to each well, and the plates were left to stand at room temperature in the dark for 5 min. Color development was stopped by adding 100 µL of 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was measured with an ELISA reader with a 492 nm filter. A *T. gondii* lysate antigen (TLA), prepared as described previously (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012), was used at a concentration of 1 µg/mL as a control antigen.

*Toxoplasma gondii* EVs were quantified using a BCA Protein Assay Kit (Pierce, Thermo Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions, using BSA as a standard protein concentration. Next, *T. gondii* EVs were solubilized in lysis buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8 and 0.002% bromophenol blue), boiled and run in 10% polyacrylamide-SDS gels. The investigation of EV proteins was done after silver staining.

#### 2.4. Nanoparticle Tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy (TEM): identification of EV size and concentration

Concentration (particles/mL) and particle size (nm) of *T. gondii* EVs were evaluated by NTA using the NanoSight NS300 instrument (Malvern-NanoSight NTA 3.0, USA). The methodology was as described previously (Silva et al., 2018; Cruz et al., 2020). Data were presented as the average and standard deviation of three video recordings of 30–60 s per sample. Since NTA is accurate between particle concentrations in the range of  $2 \times 10^7$  to  $2 \times 10^9$ /mL, EV samples were diluted before analysis in filtered PBS and the relative concentration calculated according to the dilution factor.

For TEM, *T. gondii* EVs were fixed in 2% paraformaldehyde/PBS (v:v) for 1 h. One drop of suspension was put on an EM grid. Next, the preparations were stained by a negative technique with 2% potassium phosphotungstate at pH 6.8, as previously described (Silva et al., 2018; Cruz et al., 2020). Grids were observed under a JEOL Transmission Electron Microscope (JEM1011, JEOL, Massachusetts, USA) operating at 80 kV. Images were recorded with a Gatan 785 ES1000W Erlangshen camera.

#### 2.5. Experimental mouse groups, immunizations and challenges

Groups of five female A/Sn (or BALB/c) mice were immunized as previously described (Costa-Silva et al., 2008, 2012). Immunizations consisted of three i.m. doses of 100 µg of EVs adsorbed to 0.5 mg of Al(OH)<sub>3</sub> (alum) given at 0, 2 and 4 weeks. These groups were designated as EV-immunized mice (EV-IM). For controls, groups that received, in the same immunization stage, PBS

(0.2 mL) plus alum were considered naive mice or negative controls (NI). Chronic infected mice or positive controls (CHR) were infected with the ME-49 strain. One week after each immunization, blood samples were collected from tails of EV-IM and NI mice for detection of antibodies, as well as, opsonization experiments. Sera from the chronically infected mice were collected 50 days after *T. gondii* infection. Spleens were collected from three mice per group under aseptic conditions for cytokine assays. In the meantime, for histopathological and immunohistochemistry experiments, brain, spleen, liver, heart and skeletal muscle (left inferior member) were collected from three mice per group (EV-IM, CHR and NI) and immediately fixed in buffered formalin. In each challenge experiment, 2 weeks after the last immunization, mice were challenged via i.p. injection with 100 cell culture tachyzoites of the RH strain.

#### 2.6. Parasitemia and survival index

Parasitemia and survival index were monitored in challenge and passive transfer experiments. Parasitemia was determined by real-time PCR (qPCR) in DNA extracted from blood samples (20 µL) collected daily from the tails, p. i. The survival periods were recorded daily until all mice were dead. Both experiments were conducted three times to confirm the results.

##### 2.6.1. DNA purification and qPCR

Blood samples were added to a tube containing 200 µL of a lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 0.5% SDS; 0.01% N-laurilsarcoyl, 100 µg/mL of proteinase K). DNA extractions were done by PureLink Genomic DNA Kits (Qiagen, Germany), 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 NanoDrop ND100 (Thermo Scientific, USA).

qPCR was carried out as described before (Camilo et al., 2017) using the molecular marker REP-529, which amplified 112 bp of the highly repetitive sequence REP-529, which has 200–300 copies in *T. gondii* genome. Reactions were performed in a final volume of 20 µL. DNA samples (5 µL) or controls (3 µL) were added to a reaction mixture containing 10 µL of 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix and 1 µL of the "Assay Mix" that included the forward primer, 18 µM (5'AGAGACACCGGAATGGGATCT3'); the reverse primer, 18 µM (5'TTCGTCCAAGCCTCCGACT3'); and the hybridization probe labeled with FAM and BHQ1, 5 µM (5TCGTGGTATGGCGGAGAGAATTGA3'). Amplification runs contained two negative controls (ultrapure water and a negative DNA for toxoplasmosis) and one positive control (DNA extracted from RH strain) in an AriaMx Real-Time PCR System (Agilent, USA). The thermal profile was: 2 min, 50 °C, and 95 °C for 10 min. Next, 40 cycles were performed at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. Results are shown as concentrations of tachyzoites maintained in culture, since these DNA concentrations were previously standardized (Camilo et al., 2017) correlating to the cycle threshold value (CT) in known concentrations of tachyzoites maintained in cell cultures.

#### 2.7. Humoral immune response

##### 2.7.1. Anti-*T. gondii* EV antibodies

Antibody levels from EV-IM, CHR and NI groups were determined using TLA, as antigen, prepared as described before (Meira et al., 2008; Costa-Silva et al., 2012), in 96-well ELISA plates (flat bottom, medium binding, Corning, USA). Each plate was incubated overnight at 4 °C with TLA at a concentration of 1 µg/mL dissolved in 0.1 mL of 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.5. Unbound antigens were removed by washing the plates with 0.05% Tween 20-PBS. The free binding sites were blocked by treating the wells with 5% skim milk-PBS for 60 min at 37 °C. After that, each serum sample (dilu-

tion 1:50 in 5% skim milk-PBS) was incubated for 60 min at 37 °C. After five washes with Tween 20-PBS, the wells were incubated for another 60 min at 37 °C with a horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse total Ig (Sigma-Aldrich Corporation, USA), diluted 1:4000 in 5% skim milk-PBS. Alternatively, reactions were tested for mouse anti-IgG (Sigma-Aldrich Corporation, USA), diluted 1:2000; anti-IgM (Sigma-Aldrich Corporation, USA), diluted 1:1000; anti-IgG1 ((Sigma-Aldrich Corporation, USA), diluted 1:2000; and anti-IgG2a (Sigma-Aldrich Corporation, USA), diluted 1:8000. After a new wash cycle with Tween 20-PBS, substrate solution was added to each well and the plates were incubated for 30 min at 37 °C. Color development was stopped by adding 50 µL of 4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and the absorbance was measured with an ELISA reader (Sirius S, Seac Radim Company, Germany) with a 492 nm filter. The assays were carried out in duplicate and values were represented by arithmetic mean ± S.E.M. of absorbance of each serum sample from five mice per group.

For immunoblotting, TIA (20 µg per line) were boiled for 5 min at 100 °C in a loading buffer containing β-mercaptoethanol, and fractionated by a run in SDS-10% PAGE. The proteins were transferred to nitrocellulose membranes, cut into 3–4 mm wide strips, blocked for 1 h with 5% skim milk-PBS and incubated with EV-IM, CHR and NI sera diluted 1:20 at room temperature. After 1 h, the strips were washed with PBS and incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse IgG diluted (1:500) (Sigma-Aldrich Corporation, USA) in 5% skim milk-PBS. Bound antibodies were visualized after incubation with 0.03% 4-chloro-1-naphthol (Sigma-Aldrich Corporation, USA) in methanol, PBS and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.7.2. IgG purification and opsonization experiments

IgG antibody purification was performed from pooled sera (per group) collected from EV-IM and NI. Firstly, each pooled serum, diluted in 20 mM sodium phosphate, was passed twice through a protein A agarose column (HiTrap-I mL, Amersham Biosciences, USA) previously equilibrated in the same buffer. After the column was washed 10 times with column volumes of the buffer, antibodies were eluted with 0.1 M citric acid (pH 3.6). Each eluted fraction contained 500 µL and was neutralized with 1.5 M Tris HCl, pH 8.8 (50 µL). Eluted antibodies were dialyzed twice against PBS. The amount of protein concentration was determined at 280 nm by NanoDrop ND100 (Thermo Scientific, USA). Purified IgGs (2.5 µg), from each group were incubated with 100 tachyzoites (RH strain) at 37 °C for 10 min. Next, the parasites were used to infect two groups of five A/Sn mice. The first group received parasites incubated with purified IgG from EV-IM mice, and the second, parasites incubated with purified IgG from NI mice. All mice received, i.p., a mixture containing antibody (0.5 µg) plus 100 tachyzoites. Next, parasitemia and survival index were evaluated daily.

#### 2.8. Cellular immune response: histopathological and immunohistochemistry (IHC) analysis in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues

Mouse organs were fixed in buffered formalin, embedded in paraffin. For histopathological analyses, FFPE tissues were sectioned in microtome, fixed in slides and stained with H&E. Histological sections were examined under a light microscope to determine tissue characteristics.

To assess the cytokine distribution in mouse organs (brain, heart, liver, spleen and skeletal muscle), IHC analysis was performed on deparaffinized FFPE sections (4 µm thick) using monoclonal or polyclonal antibodies. Positive and negative controls consisted of a human lymph node tissue sample and the primary antibody omission, respectively. Immunostaining procedures were performed as described previously (Gomes et al., 2017) after removal of paraffin in xylene and rehydration in baths with

decreasing concentrations of ethanol and in distilled water, and then submitted to an antigen retrieval procedure in 10 mM citrate buffer pH 6.0. Endogenous peroxidase activity blockage was obtained with 6% peroxide hydrogen solution treatment. Cytokine distribution in tissue samples was performed using: rabbit polyclonal anti-IL-10, diluted 1:1000 (Abcam, USA); rabbit polyclonal anti-IL-17, diluted 1:500 (Abcam, USA); mouse monoclonal anti-TNF-α diluted 1:1000 (Abcam, USA); rabbit polyclonal anti-IFN-γ, diluted 1:1000 (Abcam, USA). All antibodies were diluted in 1% BSA in PBS and tissue sections were incubated overnight at 4 °C. The amplification signal was obtained by peroxidase conjugated polymer (Spring Biosciences, USA), in a 30 min incubation step at 37 °C. Color development was obtained with diaminobenzidine (Sigma-Aldrich Corporation, USA), 100 mg in PBS, 0.1% peroxide hydrogen) chromogenic substrate, followed by light counterstaining with Hany's hematoxylin and permanent mounting with Entellan (Merck, Germany). For microscopic analyses, quantitative morphometric observations were done by manually counting the number of immunostained cells in 10 high-powered fields/biopsy under a light microscope (400× magnification). The values per cytokine were represented by the arithmetic mean ± S.E.M. of three mice per group.

#### 2.9. Data analysis

Comparisons of parasitemias between experimental groups (EV-IM and NI) were statistically evaluated by GraphPad Prism 6.0 Software Inc. (San Diego, CA, USA). The coefficient of similarity between both groups was calculated by a Mann Whitney test (unpaired Student's *t*-Test – one-tailed) with a 95% confidence interval. Differences were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

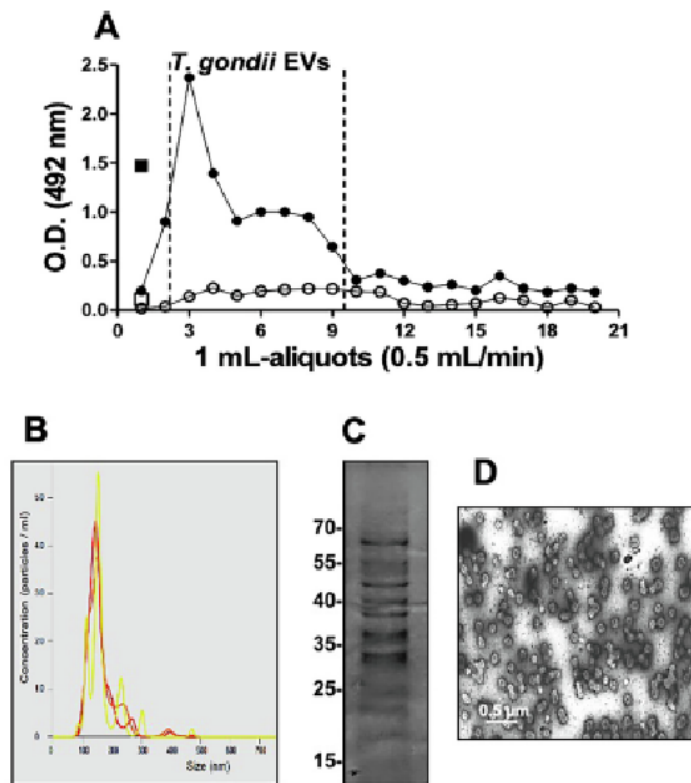
#### 3.1. Purification of *T. gondii*-released EVs

In the first step, tachyzoite-released EVs were purified for use in the immunization experiments. EVs released by  $1 \times 10^9$  tachyzoites during incubation in RPMI medium (at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> for 2 h) were purified by exclusion chromatography. *Toxoplasma gondii* EVs were selected in 1 mL aliquots by ELISA. Fig. 1A shows the reactive aliquots to a human positive serum (pool) for toxoplasmosis, corresponded to the curve peak, which contained EVs. In the negative control, the aliquots were non-reactive for a negative human serum (pool) for toxoplasmosis. The quality of the reactions was checked using TIA (antigen used as a positive control).

Fig. 1B shows the NTA original data (in triplicate reads) of the graphic distribution produced by NanoSight equipment. The figure includes the size (nm) and concentration (particles/mL) of purified EVs. The mean size and concentration ± standard error of EVs were:  $163.2 \pm 2.7$  nm and  $2.55 \times 10^9 \pm 8.96 \times 10^7$  particles/mL. The electrophoretic profile of purified EVs was investigated by SDS-PAGE that presented a spectrum of 15–70 kDa (Fig. 1C). Equally, the images obtained by TEM showed numerous vesicles compatible with the size and shape of the EVs (Fig. 1D).

#### 3.2. Immunization with EVs reduced parasitemia and increased survival index of mice infected with a lethal and virulent *T. gondii* strain

To evaluate the efficiency of *T. gondii* EVs as immunogen, challenge experiments were performed to determine the capacity of these nanoparticles to stimulate the protective immune response against *T. gondii* infection.



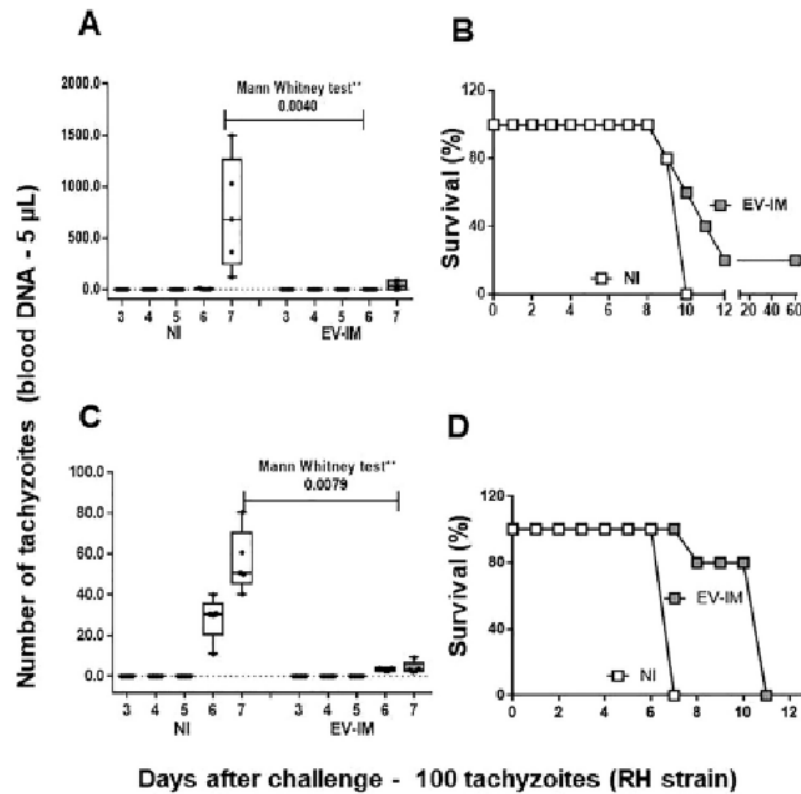
**Fig. 1.** Purification of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-released extracellular vesicles (EVs). Reactivity of tachyzoite-released EVs was assayed by ELISA. A positive serum (pool) for toxoplasmosis (black circles) reacted with EV aliquots. *Toxoplasma gondii* lysate antigen (TLA) was used as a positive control, with O. D. approximately 1.5 (black square). A negative serum (pool) for toxoplasmosis (white circles) was used as a negative control and with TLA, also, was non-reactive (white square). Results represent the value of the absorbance of each aliquot at an O. D. of 492 nm (A). Particle size (nm) and concentration (particles/mL) were evaluated by representative Nanoparticle Tracking Analysis. The original graphic was produced using NanoSight equipment. Data represent the three reads of one sample containing EVs from  $1 \times 10^8$  tachyzoites shedding EVs in 2 h (B). Proteins of purified tachyzoite-released EVs (20  $\mu$ g), separated by 10% SDS-PAGE and silver-stained are shown (C). An image was acquired, by transmission electron microscopy, of numerous EVs after purification by chromatography. Magnification: 25,000 (D).

EV-IM groups (A/Sn and BALB/c mice) were challenged i.p. with 100 cell culture-derived tachyzoites of the RH strain (a lethal and highly virulent *T. gondii* strain). Next, parasitemia and survival percentage were evaluated. Results were compared with the NI mice that received only alum plus PBS. Parasitemia levels were estimated daily for each mouse by qPCR of DNA extracted from blood obtained from five mice per group at days 3–7 pi. Since the RH strain is highly virulent, all mice had a positive qPCR. Parasitemia results are shown in Fig. 2A and C for A/Sn and BALB/c mice, respectively. A statistically significant reduction occurred in parasitemias of EV-IM mice compared with those of NI mice (in both mouse lineages).

Survival rates of these groups were also investigated (Fig. 2B and D). As NI groups were challenged with a lethal *T. gondii* dose, all of them died by the days 7 (BALB/c) and 10 (A/Sn) post-challenge. However, the survival rate of EV-IM mice was increased at day 4 compared with the NI group. One of them was alive until day 60, when euthanasia was performed (Fig. 2B).

### 3.3. Immunization with tachyzoite-released EVs triggers IgG1-like humoral immune response in inbred A/Sn and BALB/c mice

After immunizations, experiments were conducted to investigate whether tachyzoite-released EVs were able to trigger an immune response capable of recognizing all tachyzoite antigens. Thus, TLA was used in as antigen in ELISA. As such an immune response is well known in CHR and NI mice, consequently, they were used as control groups. All sera from NI mice were negative by ELISA. Fig. 3 shows the evolution of antibody production after three immunizations in A/Sn (Fig. 3A) and BALB/c mice (Fig. 3B). Low IgM levels were shown in all analyzed sera. At the same time, EV-IM mice and CHR ones produced high levels of IgG. Increased IgG1 levels were detected only in EV-IM mice. CHR mice produced more IgG2a antibodies than EV-IM mice. Thus, results demonstrate that tachyzoite-released EVs preferably trigger an IgG1 immune response in both mouse lineages. Analyses by immunoblot confirmed that EV-IM sera recognized tachyzoite antigens (Fig. 3C).



**Fig. 2.** Immunization using tachyzoite-released extracellular vesicles (EVs) reduces parasitemia and increases the survival index of mice infected with a lethal strain of *Toxoplasma gondii*. Naive mice (NI – white columns) and EV-immunized mice (EV-IM – gray columns) were infected (i.p.) with 100 tachyzoites (RH strain). Parasitemia levels of A/Sn inbred mice (susceptible to *T. gondii* infection) (A) and BALB/c mice (C) were estimated daily by real time PCR. *Toxoplasma gondii* DNA molecules were quantified using the REP-529 primer pair with a hydrolysis probe FAM dye-labeled as described in Section 2. DNA samples were extracted from blood (20 µL) of five mice per group on indicated days. Results were originally obtained as cycle threshold (CT) values and transformed to tachyzoite number after calculation of amplified products in the qPCR. Differences in tachyzoite numbers between two groups were statistically different by a Mann–Whitney test, one-tailed *P* value. Survival rates of A/Sn mice (B) and BALB/c mice (D) after *T. gondii* infection are shown (EV-IM (gray squares) and NI (white squares)).

**3.4. Participation of anti-EV antibodies in parasitemia and survival index of immunized mice**

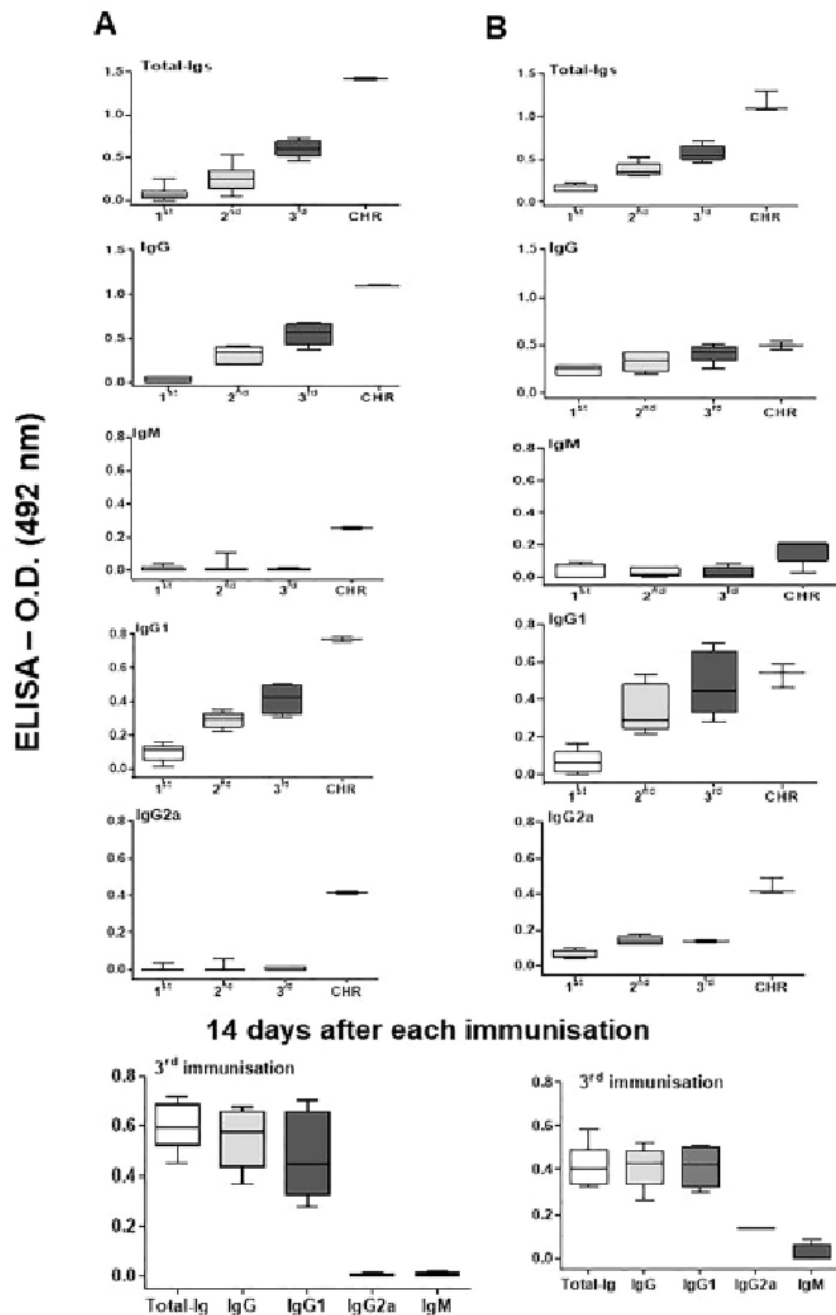
Next, the opsonization experiments were performed in A/Sn mice, to verify whether antibody anti-EVs were able to neutralize the infection. Tachyzoites incubated with purified IgG from EV-IM mice were used to infect a group of five mice. Later, parasitemia and survival index were monitored daily. A control group received, at the same time, tachyzoites incubated with purified IgG from NI mice. Mice challenged with tachyzoites opsonized with IgG anti-EV presented a decrease in parasitemia, which was statistically significant compared with NI mice (Fig. 4A). In the same way, these mice had increased survival (48 h) compared with those challenged with tachyzoites with normal IgG (Fig. 4B).

**3.5. In situ cytokine expression**

Microscopic images of histopathological analyses of brain, heart, liver, spleen and skeletal muscle showed that CHR mice had typical

histopathological alterations in chronic infection caused by *T. gondii* including the presence of cysts, principally in brain. These results have been already described in different studies (Ferguson et al., 1991; Fuentes-Castro et al., 2017). No histopathological alteration was identified in tissues of NI and EV-IM mice.

Regarding IHC analyses, Fig. 5 shows IHC images of spleen cells collected from CHR and EV-IM mice. The stained cells indicate in situ expressions of IFN-γ (Fig. 5A), IL-10 (Fig. 5B), TNF-α (Fig. 5C) and IL-17 (Fig. 5D). Fig. 5 also shows graphically a comparison of results against NI, CHR and EV-IM mice in brain, heart, liver, spleen and skeletal muscle in the distribution of different cytokine assays. The values of immunostained cells/mm<sup>2</sup> are expressed as mean ± S.E.M. (three mice/group). As CHR mice were used as a positive control, the studied cytokines were more highly expressed compared with NI mice. These results are well known in the literature (Zenner et al., 1999; Brandão, et al., 2009; Costa-Silva et al., 2008, 2012). Cells from EV-IM mice were highly expressed for IFN-γ and IL-10 in brain and spleen cells. TNF-α was also highly expressed in spleen cells.



**Fig. 3.** Activation of humoral response after immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite-released extracellular vesicles (EVs). Progression of the humoral immune response in sera collected from EV-immunized mice (EV-IM) mice of A/Sn (A) and BALB/c (B) lineages. Blood samples were collected 7 days after the first (1st), second (2nd) and third (3rd) immunization, as well as from chronic infected mice. Determinations of total-Ig, IgG, IgG1, IgG2a, and IgM were done by ELISA using *T. gondii* lysate antigen (TLA) as antigen. In all groups, naive mice (NI) (negative control) were negative (O.D. 0.0 to 0.09). Values represent mean  $\pm$  S.E.M. of absorbance (O. D.) at 492 nm of individual serum samples of five mice per group. (C) Analysis of TLA (lane 1) separated by 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue; or transferred to nitrocellulose strips and incubated with CHR (lane 2), EV-IM (lane 3) or NI (lane 4) sera.

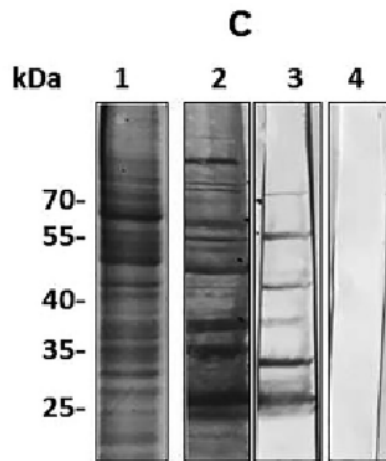


Fig. 3 (continued)

#### 4. Discussion

EVs, including exosomes and microvesicles are involved in different functions, among them the transference of macromolecules, biomarkers that can interact with specific molecules of immune system (Yu et al., 2006; Delabranche et al., 2012; Yang et al., 2019). Thus, studies involving immunization using EVs as immunogen have been done in different models (Bhatnagar et al., 2007; Martín-Jaular et al., 2011; del Cacho et al., 2012; Schwab et al., 2015; Chaiyadet et al., 2019). The advantage of studying EVs as vaccines is that these nanoparticles may carry and protect the intracellular components within their lipid bilayer. These components include several proteins, miRNAs and others. Equally, EVs produced by *T. gondii* transport and release several components including ESA, which participate in tachyzoite invasion, replication within host cells and stimulation of the host immune system (Bhatnagar et al., 2007; Jongert et al., 2008; Mathivanan et al., 2010; Weilhammer and Rasley, 2011; Delabranche et al., 2012; Wolk et al., 2017; Li et al., 2018; Silva et al., 2018).

Initially, EVs were purified from tachyzoites maintained in vitro for use in immunizations. The results presented here were carefully evaluated after the previous standardizations as: (i) minimum lethal parasite concentration for mice; (ii) ideal concentration of EV proteins for use in immunizations; and (iii) ideal immunization (i.p. or i.v.) route. To understand whether such an immune response was capable of reducing the levels of tachyzoites in blood, two inbred mouse lineages were used and mice were challenged with a lethal *T. gondii* dose for NI mice.

Immunization with EVs contributed to control of the infection by reducing parasitemia and increased the survival index in both mouse lineages, even though one of them (A/Sn) is susceptible to *T. gondii* infection. The difference in parasitemias was statistically significant between EV-IM and NI mice (in both mouse lineages). These data suggest the capacity of EVs to stimulate the protective immune response. ELISA and immunoblot experiments using TIA led us to suppose that tachyzoite-released EVs carry parasite antigens to host cells.

Immunizations using surface antigens and ESAs such as dense granule, micronemal and rhoptry proteins play a major role in stimulating protective immunity (Hunter and Sibley, 2012;

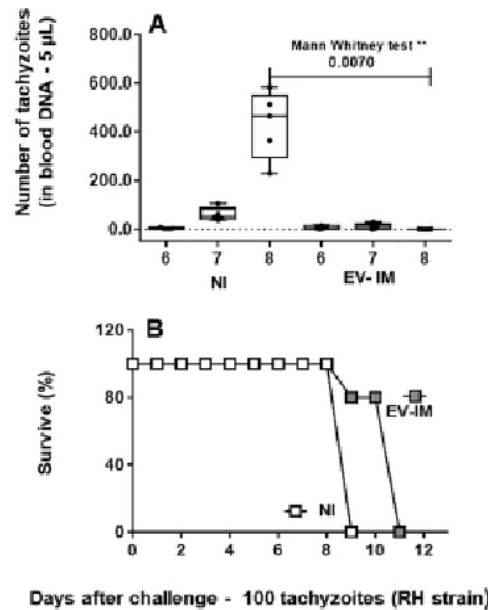


Fig. 4. Oponization of *Toxoplasma gondii* tachyzoites with anti-extracellular vesicle (EV) antibodies reduces parasitemia and increases the survival index of mice infected with a lethal strain. Parasitemia levels (A) of a group of five A/Sn mice infected (i.p.) with 100 tachyzoites (RH strain) oponized, for 10 min at 37 °C, with purified IgG (2.5 µg) from EV-immunized mice (EV-IM) (gray columns). As a negative control, the second group, received tachyzoites oponized with purified IgG from naïve mice (NI) (negative control) (white columns). Parasitemias were estimated daily by real time PCR (qPCR). *Toxoplasma gondii* DNA molecules were quantified using RFP-329 primer pair with a hydrolysis probe, FAM dye-labeled, as described in section 2. DNA samples were extracted from blood (20 µL) from five mice per group on the indicated days. Results were originally obtained as cycle threshold (CT) values and transformed to tachyzoite numbers after calculation of amplified products in the qPCR. Differences in tachyzoite numbers between two groups were statistically different by Mann-Whitney test, one-tailed *P* value. Survival rates (B) of mice infected with oponized tachyzoites with purified IgG from EV-IM mice (gray squares) and IgG from NI mice (white squares) are shown.

Ivanova et al., 2016). Equally, immunization with tachyzoite-released EVs triggered protective immunity, preferably IgG1 type. The evolution of antibodies during immunization showed that EV-IM mice had lower IgM levels than chronic mice with 50 days of infection. At the same time, both groups of mice produced high IgG levels, however, EVs elicited more IgG1 concentration than IgG2a. Similar results were previously shown when mice were immunized with *T. gondii* ESA (Costa-Silva et al., 2008, 2012).

The oponization experiments confirmed that anti-EV antibodies were able to partially neutralize infection since mice infected with tachyzoites incubated with purified IgG from EV-IM mice had decreased parasitemias and a survival index increase. Probably these antibodies participate in the previous activation of the complement system, in order to facilitate phagocytosis, and clearance of the parasitemia and parasitism in the tissue cells.

According to investigation of cellular responses, the IHC analyses indicated that EVs produced by tachyzoites elicited more expression of IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, and a lower concentration of IL-17. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  levels were produced in all studied organs of EV-IM and CHR mice. These data suggest that during the active infection, when tachyzoites and consequently EVs are released, the

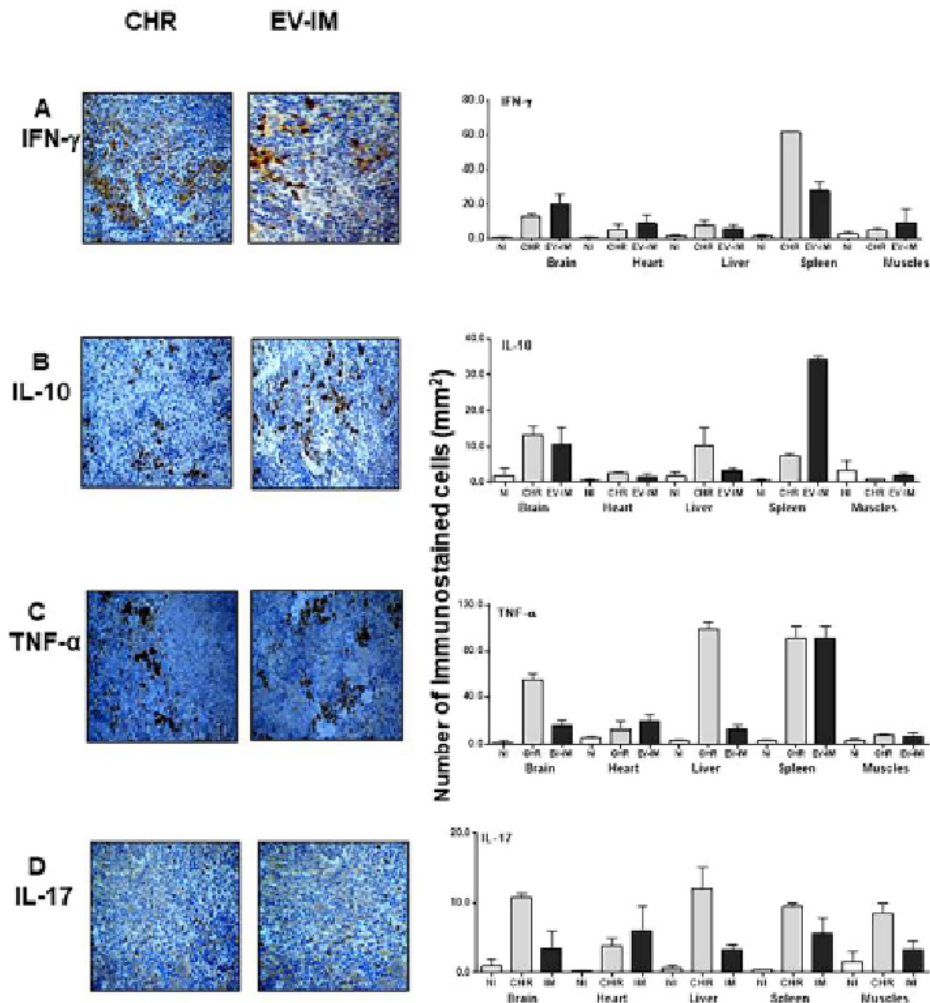


Fig. 5. Immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite-released extracellular vesicles (EVs) activates a cellular response. In situ expression of IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-17 (C), and IL-10 (D) of spleen cells of Chronic infected mice (CHR) and EV-immunized mice (EV-IM) were stained by histopathological and immunohistochemistry analysis (IHC). Magnifications  $\times 400$ . Graphs shows the distribution of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, and IL-10 cytokines in brain, heart, liver, spleen and skeletal muscle cells in naive mice (NI) (white columns), CHR (gray columns) and EV-IM (black columns) mice. The methodology was based on IHC as described in the Section 2. Values indicate the mean  $\pm$  S.E.M. of three mice/group.

host immune system produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . Both cytokines are involved in control of the infection (Gazzinelli et al, 1996; Denkers and Gazzinelli, 1998). IFN- $\gamma$  induces TNF- $\alpha$  synthesis in infected cells with intention to control *T. gondii* infection (Rosenberg et al., 2009). Since both cytokines act synergistically during the infection, it is possible that tachyzoite-released EVs could help in infection control. TNF- $\alpha$  plays an important role in the generation of reactive nitrogen intermediates as mediators of host resistance to early *T. gondii* infection (Jankovic et al, 2007; Dziadek et al., 2009). The correlation between high levels of Th1-type cytokines and a strong humoral immune response in vaccination and in *T. gondii* infection suggest that Th1-type cytokines eli-

cited by EVs conferred protection in mice against lethal challenge with the RH strain.

Th2 cytokine IL-10 participates in the balance of immune responses. EVs activated cells from immunized mice to produce this cytokine, avoiding an excessive immune response that could cause extensive inflammation and host tissue damage associated with acute *T. gondii* infection (Gazzinelli et al, 1996; Jankovic et al., 2007).

All these experiments suggest that EVs participate in host humoral and cellular responses. EVs carry *T. gondii* nano-components to stimulate the host immune system to complement the infection control. Thus, EVs can elicit a combined Th1 and



Th2 profile since a predominant IgG1, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  occurred, but with a balance including the production of IL10. Consequently, the possibility of using EVs as vaccine/immunogen is a new perspective in toxoplasmosis, principally to prevent cases of gestational/congenital toxoplasmosis in humans and animals used for human consumption.

**Acknowledgements**

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil-2018/04708-B, MMM and ABC were supported by scholarships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil; VLP-C, from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil – 302327/2018-5.

**References**

Aline, F., Bout, D., Ami-grens, S., Boinegard, P., Dimier-Poisson, I., 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infect. Immun.* 72, 4127–4137.

Beauvillain, C., Ruiz, S., Guiton, R., Bout, D., Dimier-Poisson, I., 2007. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T. gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect.* 9, 1614–1622.

Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., Schoey, J.S., 2007. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 110, 3234–3244.

Bossi, P., Bricate, F., 2004. Severe acute disseminated toxoplasmosis. *Lancet*, 364, 579.

Brandão, G.P., Melo, M.M., Gazzinelli, R.T., Caetano, B.C., Ferreira, A.M., Silva, L.A., Vitor, R.W., 2000. Experimental reinfection of BALB/c mice with different recombinant type III strains of *Toxoplasma gondii*: involvement of IFN- $\gamma$  and IL-10. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104, 241–245.

Camilo, I.M., Pereira-Chioccola, V.L., Gava, R., Meira-Srejevitch, C.D.S., Vidal, J.E., Brandão de Mattos, C.C., Frederico, F.B., De Mattos, L.C., Speglorin, L.C.J.F., FAMERP Toxoplasma Research Group, 2017. Molecular diagnosis of symptomatic toxoplasmosis: a 9-year retrospective and prospective study in a referral laboratory in São Paulo, Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 638–647.

Caruthers, V.B., 2002. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 81, 111–122.

Cebon-Delavay, 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.

Chalvader, S., Sotillo, J., Krasajanda, W., Thongen, S., Brindley, P.J., Srija, B., Loukas, A., Laha, T., 2019. Vaccination of hamsters with *Quilichoska viverrini* extracellular vesicles and vesicle-derived recombinant tetraspanins induces antibodies that block vesicle uptake by cholangiocytes and reduce parasite burden after challenge infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 28, e0007450.

Costa-Silva, T.A., Borges, M.M., Galharda, C.S., Pereira-Chioccola, V.L., 2012. Immunization with excreted/secreted proteins in A/Sn mice activating cellular and humoral response against *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop.* 124, 203–209.

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.

Cruz, A.B., Maia, M.M., Pereira, I.S., Tanigaki, N.N., Namiyama, G.M., Telles, J.P.M., Vidal, J.E., Speglorin, L.C.J.F., Brandão de Mattos, C.C., Mattos, I.C., Meira-Srejevitch, C.D.S., Pereira-Chioccola, V.L., 2020. Human extracellular vesicles and correlation with two clinical forms of toxoplasmosis. *PLoS One*, 15, e0229602.

del Cacho, E., Gallego, M., Ise, S.H., Lillehoj, H.S., Quítez, J., Lillehoj, E.P., Sánchez-Acedo, C., 2012. Induction of protective immunity against *Eimeria tenella*, *Eimeria maxima*, and *Eimeria acervulina* infections using dendritic cell-derived exosomes. *Infect. Immun.* 80, 1909–1916.

Delabanch, X., Berger, A., Bolsasne-Helms, J., Meziani, F., 2012. Microparticles and infectious diseases. *Med. Mal. Infect.* 42, 335–343.

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.

Druey, C., Coakley, G., Maizels, R.M., 2020. Extracellular vesicles: new targets for vaccines against helminth parasites. *Int. J. Parasitol.* 11, 30020-7519(20) 30165-X.

Dubey, J.P., 2008. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 467–475.

Dubey, J.P., 2009. Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 7, 1–14.

Dziadek, B., Garkowicz, J., Brzostek, A., Dziadek, J., Dziwko, K., Dlugowska, 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.

Eliez-Rubinstein, A., Aizerberg, D., Dardé, M.L., Cohen, E., Duménil, A., Year, H., Gondou, E., Jinaud, J.C., Thulliez, P., 2009. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J. Infect. Dis.* 199, 280–285.

Ferguson, D.J., Graham, D.I., Hutchison, W.M., 1991. Pathological changes in the brains of mice infected with *Toxoplasma gondii*: a histological, immunocytochemical and ultrastructural study. *Int. J. Exp. Pathol.* 72, 463–474.

Ferreira, A.I., De Mattos, C.C., Frederico, F.B., Meira, C.S., Almeida Jr, G.C., Nakashima F., Bernardo, C.R., Pereira-Chioccola, V.L., De Mattos, L.C., 2004. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol. Infect.* 142, 140–148.

Filippi, D., Candolfi, E., 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 40, 71–80.

Fernes-Castro, B.F., Reyes-García, J.G., Valenzuela-Vargas, M.T., Martínez-Gómez, F., 2017. Histopathology of murine toxoplasmosis under treatment with dihydroate leukocyte extract. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 112, 741–747.

Gazzinelli, R.T., Wysocka, M., Hieny, S., Scharon-Korsten, T., Chaves, A., Kühn, R., Müller, W., Trinchiesi, 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, 798–806.

Glasner, P.D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M.C., Burnier Júnior, M., Silveira, S., Camargo, M.F., Nussenblatt, R.B., Kazlow, R.A., Belfort Júnior, R., 1992. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.* 114, 138–144.

Gomes, A.H.S., Martins, R.B., Kanamura, C.T., Baibo, M.L.P., Iglesias, S.D., Lauletta Lindoso, J.A., Pereira-Chioccola, V.L., 2017. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunol.* 39, pii12423.

Hernández, A.V., Thou, P., Pellegrino, D., Pasupuleti, V., Benites-Zapata, V.A., Deshpande, A., Penha de Oliveira, A.C., Vidal, J.E., 2017. A systematic review and meta-analysis of the relative efficacy and safety of treatment regimens for HIV-associated cerebral toxoplasmosis: is trimethoprim-sulfamethoxazole a real option? *HIV Med.* 18, 115–124.

Hill, D.E., Chikindorh, S., Dubey, J.P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Ann. Health Res. Rev.* 6, 41–61.

Hunter, C.A., Sibley, L.D., 2012. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 766–778.

Ivanova, D.I., Fatima, R., Gligley, J.P., 2016. Comparative analysis of conventional natural killer cell responses to acute infection with *Toxoplasma gondii* strains of different virulence. *Front. Immunol.* 7, 347.

Jankovic, D., Kullberg, M.C., Peng, C.C., Goldszmid, R.S., Collazo, C.M., Wilson, M., Wynn, T.A., Kamaoka, 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, 273–283.

Jongert, E., Melkebeek, V., De Caeste, S., Dewit, J., Verhelst, D., Cox, E., 2008. An enhanced GRA1–GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. *Vaccine* 26, 1025–1031.

Kato, T., Fahmann, J.F., Hanash, S.M., Vykoukal, J., 2020. Extracellular vesicles mediate B cell immune response and are a potential target for cancer therapy. *Cells* 22, 1518.

Kim, M.J., Jung, B.K., Cho, J., Song, H., Pyo, K.H., Lee, J.M., Kim, M.K., Choi, J.Y., 2016. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J. Parasitol.* 54, 147–154.

Li, Y., Liu, Y., Xiu, F., Wang, J., Cong, H., He, S., Shi, Y., Wang, X., Li, X., Zhou, H., 2018. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int. J. Nanomed.* 19, 467–477.

Martin-Jaulac, L., Nakayasu, E.S., Ferrer, M., Almeida, I.C., Del P.H., 2011. Exosomes from *Plasmodium jelfi*-infected reticulocytes protect mice from lethal infections. *PLoS One* 6, e26588.

Madhivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J., 2010. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J. Proteomics* 73, 1907–1920.

Mattos, C.C., Meira, C.S., Ferreira, A.I., Frederico, F.B., Hiramoto, R.M., Almeida 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, 382–386.

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. *J. Med. Microbiol.* 57, 845–850.

Meira, C.S., Vidal, J.E., Costa-Silva, T.A., Fraszar-Gallina, N., Pereira-Chioccola, 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, 279–285.

Melmonen, G.C., Tedla, B.A., Pickering, D., Becker, L., Wang, L., Zhao, B., Bottazzi, M. F., Loukas, A., Sotillo, J., Pearson, M.S., 2020. *Schistosoma haematobium* extracellular vesicle proteins confer protection in a heterologous model of schistosomiasis. *Vaccines* 24, E418.


Montoya, J.G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *Lancet* 363, 1965–1976.

Noor, S., Habashy, A.S., Naoie, J.P., Clark, R.T., Nemati, K., Garoon, M.J., Wilson, E.H., 2010. CD83-Dependent Immunity during Acute *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect. Immun.* 78, 2257–2263.

Olarju, T.R., Remington, J.S., McLeod, R., Alam, A., Montoya, J.G., 2011. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr. Infect. Dis.* 30, 1056–1061.

- Pereira-Chioccola, V.I., Vidal, J.F., Su, C., 2009. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol.* 4, 1363–1375.
- Pevlaro, M., Frederico, F.B., Murata, F.H., Siqueira, R.C., Barbosa, A.P., Silveira-Carvalho, A.P., Meira, C.S., Pereira-Chioccola, V.I., Gava, R., Martins Neto, P.P., de Mattos, L.C., de Mattos, C.C., 2015. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. *BMC Res. Notes* 8, 746.
- Pigione, I., Facchetti, P., Lecordier, L., Deslée, D., Chiesa, S., Cesbron-Delauw, M.F., Pistola, 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.
- 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.
- Schwab, A., Meyering S.S., Lepene, B., Iofanóly, S., van Hoek, M.J., Hakami, R.M., Kashanchi, F., 2015. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front. Microbiol.* 20, 1132.
- Silva, V.O., Maia, M.M., Torrecilhas, A.C., Tanikawa, N.N., Namiyama, G.M., Oliveira, K.C., Ribeiro, K.S., Toledo, M.D.S., Xander, P., Pereira-Chioccola, V.I., 2018. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunol.* 40, e12571.
- Tan, X., Li, R., Huang, X., Liu, Q., 2018. Outer membrane vesicles: current status and future direction of these novel vaccine adjuvants. *Front. Microbiol.* 9, 783.
- Théry, C., Ostrowski, M., Seguin, E., 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 581–593.
- Vidal, J.F., Hernandez, A.V., de Oliveira, A.C., Daur, R.F., Barbosa Jr, S.P., Focaccia, R., 2005. Cerebral toxoplasmosis in HIV-positive patients in Brazil: clinical features and predictors of treatment response in the HAART era. *AIDS Patient Care STDs* 19, 840–848.
- Vidal, J.F., Oliveira, A.C., 2013. AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy but the challenges continue. *Braz. J. Infect. Dis.* 17, 379–380.
- Wellhammer, D.R., Rasley, A., 2011. Genetic approaches for understanding virulence in *Toxoplasma gondii*. *Brief. Funct. Genomics* 10, 365–373.
- Wojcik, P.F., Zardo, M.L., Miot, H.T., Goldenberg, S., Carvalho, P.C., Mörking, P.A., 2017. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics* 17, 15–16.
- Yang, X.X., Sun, C., Wang, L., Guo, X.L., 2019. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J. Control. Release* 17, 119–129.
- Yu, X., Harris, S.L., Levine, A.J., 2005. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res.* 66, 4795–4801.
- Zinner, I., Btaouet, J., Daay, F., Maes, P., Capron, A., Cesbron-Delauw, M.F., 1999. Protective immunity in the rat model of congenital toxoplasmosis and the potential of excreted-secreted antigens as vaccine components. *Parasite Immunol.* 21, 261–272.

## Characterization of murine extracellular vesicles and *Toxoplasma gondii* infection

Marta Marques Maia<sup>1</sup> | Allecineia Bispo da Cruz<sup>1</sup> | Ingrid de Siqueira Pereira<sup>1</sup> |  
Noemi Nosomi Taniwaki<sup>2</sup> | Gislene Mitsue Namiyama<sup>2</sup> | Vera Lucia Pereira-Chiocola<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>Núcleo de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil

### Correspondence

Vera Lucia Pereira-Chiocola, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 351 8 andar, CEP 01246-902, São Paulo, SP, Brazil.  
Email: pchiocola@gmail.com

### Funding information

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil) 2018/04709-8, ABC, MMM and ISP were supported by scholarship from CAPES; VLP-C, from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) 302927/2018-5.

### Abstract

This study characterized extracellular vesicles (EVs) of sera from mice infected with *Toxoplasma gondii* or immunized with EVs derived *T. gondii*. EVs were purified of sera from four groups (5 A/5n mice/group). EV-IM: Mice immunized with *T. gondii*-released EVs; ACT: mice in acute infection; CHR: mice in chronic infection; and NI: normal mice. EVs were purified by ultracentrifugation. Concentration of serum-derived EVs from NI group was smaller than EV-IM, ACT and CHR groups. Most of the EVs from ACT and CHR groups were microvesicles, and they were bigger than the NI group. The same results were shown by Transmission Electron Microscopy. The presence of exosomes was shown in immunoblotting by tetraspanin (CD63 and CD9) evidence. Splenocytes of EV-IM, CHR and NI groups were stimulated with *T. gondii* derived EVs. EV-IM and CHR groups up-expressed IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17, when compared with the NI group. IL-10 was up-expressed only in the EV-IM group. EV-IM, ACT and CHR groups expressed more miR-155-5p, miR-29c-3p and miR-125b-5p than the NI group. Host-*T. gondii* interaction can occur, also, via EVs. miRNAs participate in the modulation of cellular immune response against *T. gondii*. These data give subsidies to propose the differentiation between infect or noninfect hosts by concentration of EVs.

### KEYWORDS

cytokine regulation, extracellular vesicles, gene expression, miRNA, murine model, *Toxoplasma gondii*

## 1 | INTRODUCTION

Extracellular vesicles (EVs) are nanoparticles produced and released by eukaryotic and prokaryotic cells. They have many biological properties. EVs play an important role in immune system, molecule transport, cell-cell communication and others.<sup>1,2</sup> Amongst functions of EVs include delivery, under physiological or pathological conditions of various cargos as proteins, lipids, DNA, RNA, micro RNA (miRNA), other small noncoding RNA species and other secretory components.<sup>3,4</sup> Based on origin or size, EVs comprise three subclasses. Exosomes are small vesicles (30–100 nm) derived from the

internal budding of vesicles in the lumen of the early endosome. Microvesicles, which vary in size (100 to 1,000 nm) and are produced by external budding from the plasma membrane. Apoptotic bodies, which are the largest EVs (1,000 to 5,000 nm) and they are released as blebs from cells undergoing programmed death.<sup>5</sup>

*Toxoplasma gondii* infection has significant importance in public health and veterinary. Toxoplasmosis is acquired by ingestion of cysts from undercooked (or raw) meat and water (or food) contaminated with sporulated oocysts excreted in faeces of definitive hosts.<sup>6–8</sup> Despite this infection is asymptomatic in the majority of the cases, when acute infection occurs during pregnancy causes severe

neonatal malformations and ocular complications in the foetus.<sup>9,49</sup> Economically, toxoplasmosis can cause significant financial loss if infection occurs during pregnancy, especially in sheep, which often results in abortion.<sup>12,22</sup>

Nevertheless, around 10%-20% of toxoplasmosis cases are symptomatic.<sup>5,8</sup> The ocular form is characterized by necrotic lesions resulting from congenital or after birth-acquired infections. These lesions can destroy neural retina architecture, and, sometimes, the choroid is affected.<sup>19-24</sup> The reactivation of latent infection can cause cerebral toxoplasmosis. Normally happens in immunosuppressed patients, as those in cancer treatment or post-transplantation, as well as, in immunodeficiency as HIV positive patients without combination antiretroviral therapy.<sup>17-19</sup> If these patients present failure in Th1 immune response can cause disseminated toxoplasmosis.<sup>10</sup>

In acute infection, tachyzoites invade the host nucleated cells, quickly disseminate throughout the body inducing a systemic cellular and humoral immune response. This process results in lifelong immunity against reinfection since constant secretion of *T gondii* antigens is an important stimulation of the immune system.<sup>21-25</sup> This host-parasite relationship is substantially correlated with EV releasing by both organisms. EVs released by parasites through plasma membranes carry cytosolic components as proteins, lipids, nucleic acids, and insert them in host cells, causing activation of host innate and acquired immune response.<sup>24</sup>

Some properties and functions of EVs released by *T gondii* are known. Proteomic profile of EVs is composed of a wide range of proteins, including the excreted-secreted antigens (ESA) and miRNAs.<sup>22,24</sup> These exosomes and microvesicles are immunologically recognized by host immune response inducing humoral and cellular responses as IL-10, TNF- $\alpha$  and iNOS.<sup>26,27</sup>

Exosomes secreted by *T gondii*-infected cells constituted an effective noncellular vaccine with antigen and adjuvant properties for immune response. In addition, these nanoparticles altered the cell proliferation mechanisms of *T gondii*-infected cells.<sup>28,29</sup> On the other hand, the immunization with EVs released by *T gondii* protects experimental mice against *T gondii* infection by stimulus of humoral and cellular response.<sup>30</sup>

Different studies have shown an increase of EVs released in sera and/or other biological fluids of patients with diseases such as cancer, Parkinson's disease, diabetes, systemic inflammations caused by severe infections and others. These studies, also, proved that EVs carry pro-inflammatory factors, including miRNAs, which directly cause the activation of cytokine production.<sup>51-55</sup> In a previous study, we have shown a significant increase of EVs released in sera of patients with toxoplasmosis (with positive PCR for *T gondii*), when they were compared with EV concentration released in sera of healthy individuals.<sup>26</sup> Consequently, high production of EVs could be correlated with the imbalance in immune response. These findings led us to investigate whether EVs produced by experimentally mice infected with *T gondii* could be correlated with the immune response. Experiments were performed in order to characterize EVs, miRNAs, as well as, the activation of cytokine. The experiments were

performed in EVs released in sera of healthy mice, infected mice with *T gondii* (in acute and chronic infections). As immunized mice with EVs derived *T gondii* produced an excellent immune response against *T gondii*, their sera also were evaluated.<sup>30</sup> Comparison between groups was fundamental to understand the results.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 | Ethical statements

This study was performed according to recommendations of "Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz" (CEUA-IAL) and "Conselho Nacional de Controle de Experimentação" (CONCEA). Both Committees approved this study under application # 01/2018. All mice used in experiments were obtained and maintained in the Animal Laboratory Center and Experimentation of Instituto Adolfo Lutz.

### 2.2 | Mouse samples

This study evaluated EVs purified of mouse sera from 4 groups of 4-week-old female A/5n inbred mice. EV-IM group (mice immunized with *T gondii*-released EVs) was composed of sera from 5 mice immunized with 3 intramuscular doses of 100  $\mu$ g of *T gondii*-released EVs adsorbed to 0.5 mg of Al (OH)<sub>3</sub> (Alum) at 0, 2 and 4 weeks. Experiments of challenge and per cent survival, using a highly virulent *T gondii* strain proved that immunization protocol protects experimental mice against *T gondii* infection.<sup>30</sup> ACT group (mice developing the acute phase), sera from 5 mice infected, by intraperitoneal via, with 100 tachyzoites of *T gondii*, RH strain, which is highly virulent. Tachyzoites were obtained from other mice previously infected. These mice normally die within 4-6 days post-infection, during the acute phase. For this reason, clinical samples of ACT group were not tested in cytokine experiments. Experimental infection with *T gondii* RH strain in mice is a good model to study acute form of toxoplasmosis.<sup>7,27,57</sup> CHR group (mice developing the chronic phase), sera from 5 mice orally infected with 10 fresh brain cysts of *T gondii* ME-49 strain. The cysts were obtained from other mice previously infected in the same way. As mice infected with RH strain die in acute phase, the strategy was using mice infected with a strain significantly less virulent. Mice infected with ME-49 strain develop an asymptomatic acute form and gradually to chronic infection.<sup>57</sup> NI group (healthy mice), sera from five healthy mice. This group was considered as normal control. Mice infected with ME-49 strain (CHR group) were euthanized for blood collection after 60 days post-infection. Those infected with RH strain (ACT group), 6 days post-infection. Mice of the EV-IM group were euthanized 15 days after the last immunization. Mice of the NI group were euthanized at the same age and together with those of the CHR group. The production of murine EVs during the chronic *T gondii* infection was assessed in serum samples

collected from three mice/day of infection with ME-49 strain. The days post-infection were: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60. All mice used in experiments were obtained and maintained in the Animal Laboratory Center and Experimentation of Instituto Adolfo Lutz.

### 2.3 | Purification of *T gondii*-released EVs for immunizations

Procedures for *T gondii*-released EVs purifications used in immunizations were done as described before.<sup>24</sup> Briefly, tachyzoites (RH strain) from culture supernatants were washed 5 times (2,500 g, 5 minutes) in filtered PBS (1 mL). Next, parasites were resuspended in RPMI 1640 medium without foetal bovine serum (1 mL) and maintained at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 2 hours to tachyzoites release EVs. Then, tachyzoites were removed by centrifugation (10 minutes, 3,500 g). EV-containing supernatants were filtered through 0.22-µm sterile cartridges, and stored at -20°C until use.

### 2.4 | Murine EVs—concentration by ultracentrifugation

Murine serum samples (1 mL) were centrifuged at 13 500 × g for 15 minutes, to remove pellets, containing dead cells and debris. The supernatants were transferred into Ultra-Clear Centrifuge tubes (6 mL tube for SW-55 rotor), (Beckman Coulter) and the volume completed until 6 mL with filtered PBS. Samples were ultracentrifuge at 100 000 × g for 60 minutes at 25°C in a Beckman® Coulter L8-80 M ultracentrifuge. The pellets, containing EVs were resuspended in 100 µL of filtered PBS and stored at -20°C until analysis.

### 2.5 | Murine EVs—size and concentration by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and Transmission Electron Microscopy (TEM)

Concentration (EVs/mL) and size (nm) of murine serum-derived EVs after ultracentrifugation were evaluated by NTA, using the NanoSight NS300 instrument (Malvern-NanoSight™, NTA 3.0) as described before.<sup>24</sup> The equipment produced three readings and data were shown as the average and standard deviation of three video recordings of 30–60 seconds per sample. EV samples were diluted in filtered PBS before analysis and the relative concentration calculated. NTA results of EVs (concentration and size) were expressed as arithmetic mean ± standard error of mean (SEM) in triplicate.

For TEM, murine serum-derived EVs were prepared as previously described before.<sup>24</sup> EVs were fixed in 2% paraformaldehyde/PBS (v:v) for 1 hour. One drop of the suspension was put on EM grid and performed by negative staining technique with 2% potassium phosphotungstate at pH 6.8. Grids were observed under a JEOL Transmission Electron Microscope (model JEM1011) (JEOL/

Massachusetts/USA) operating at 80 kV. Images were recorded with a Gatan 785 ES1000W Erlangshen camera.

### 2.6 | Murine EVs—immunoblotting analyses

Murine serum-derived EVs were solubilized in a lysing buffer (2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 60 mM Tris-HCl, pH 6.8 and 0.01% bromophenol blue), and incubated at 100°C for 10 minutes and ran in 10% polyacrylamide-SDS gels. The visualization of EV proteins was performed after silver staining. For the determination of exosomes by immunoblot, EV proteins were transferred to nitrocellulose membranes. After being blocked (for 60 minutes with 5% skim milk-PBS), membranes were incubated with anti-CD63 and anti-CD9 antibodies (Invitrogen®) diluted 1:500 at 4°C for 18 hours. These antibodies recognize specifically the endosome-specific tetraspanins CD63 and CD9 (exosomal membranes). After washes, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature with a goat horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG diluted (1:500) (Sigma) in 5% skim milk-PBS. Bound antibodies were visualized using the quimioluminescence Western blotting substrate kit (Pierce ECL Western Solution, Thermo Scientific®) and registered in Blot Scanner (C-DiGit®) according to the manufacturer's instructions.

### 2.7 | Spleen cell cultures and cytokine assays

To determine whether EVs released by *T gondii* could stimulate the cellular immune response in immunized mice as in natural infection, these experiments were conducted using spleens from 3 mice/group (NI, EV-IM and CHR). Spleens were removed under aseptic conditions and cell preparations were obtained by compressing the spleens between two glass slides and mixed with PBS. Then, splenocyte suspensions were washed twice (PBS) and erythrocytes were lysed with ACK buffer (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 M Na<sub>2</sub>EDTA) for 5 minutes. After washing twice (PBS) by centrifugation (4°C for 10 minutes), cells were resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with gentamicin (5 mg/mL) and 10% heat-inactivated foetal calf serum. Cell viability used in experiments was higher than 85%, as measured by trypan blue exclusion (Sigma). Cells were plated at a density of 1 × 10<sup>6</sup> cells/well in triplicate into 24-well culture plates in a final volume of 500 µL. Next, cells were stimulated with 100 µg of *T gondii* released EVs. As a control, splenocytes were stimulated with Concanavalin A, 5 µg/mL (ConA) (Sigma); *E coli* lipopolysaccharides, 25 µg/mL (LPS) (Sigma); and only culture medium that was used as a negative control. The cultured splenocytes were maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator and after 24 (for TNF-α) and or 48 hours (for IFN-γ, IL-10 and IL-17) of stimulation, supernatants were collected. Concentrations of each cytokine were determined in supernatants, in triplicate, using a commercial ELISA kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen-ThermoFisher). Cytokine results were expressed as mean ± SEM of the amount of

each cytokine (in pg/mL). These experiments were carried out twice to confirm the results.

## 2.8 | miRNA isolation, reverse transcription and quantitative real-time PCR (qPCR)

These investigations were conducted to identify whether experimental mice expressed the same miRNAs group almost studied in human infection.<sup>58,59</sup> Total RNAs including miRNAs were purified from serum samples (200  $\mu$ L), using the miRNeasy Kit (Qiagen). A synthetic *Caenorhabditis elegans* miRNA (Cel-miR-39, Ambion) was spiked (5  $\mu$ L-25 fmol) to each sample as the external control. Purified RNA samples were eluted into 30  $\mu$ L of nuclease-free water. Next, 2  $\mu$ L of total RNA (including miRNAs) were reverse-transcribed (RT) using Taqman<sup>®</sup> Advanced miRNA cDNA synthesis kit (Applied Biosystems). RT was performed in a Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions, in four steps and under the following thermal conditions: 45 minutes at 37°C, 10 minutes at 65°C for poly (A) tailing reaction; 60 minutes at 16°C for ligation reaction; 15 minutes at 42°C, 5 minutes at 85°C for reverse transcription reaction; 5 minutes at 95°C, followed by 14 cycles of 95°C for 3 seconds and 60°C for 30 seconds; stop reaction at 99°C for 10 minutes for miR-Amp reaction. All cDNA samples were stored at -20°C until use.

Gene expression of miRNAs was performed using 6 target genes (Thermo Fisher Scientific). The mature miRNAs were: miR-155-5p (ID: 477927\_miR); miR-29c-3p (ID:479229\_miR); miR-125b-5p (ID:477885\_miR); miR-9-5p (ID:478214\_miR); miR-21-5p (ID:477975\_miR) and miR-146a-5p (ID: 478399\_miR). cel-miR39 (ID: 478293\_miR) was used as external control. For qPCR amplifications, each mixture contained 5  $\mu$ L of 2 X TaqMan Fast Advanced Master Mix, 0.5  $\mu$ L of each TaqMan Advanced miRNA Assays, 2.5  $\mu$ L of each template cDNA (diluted 1:10) and RNase-free water in a total volume of 10  $\mu$ L. Amplifications (in duplicate) were performed in a StepOne Real-Time PCR System using the following thermal profile: 95°C for 20 seconds, followed by 40 cycles performed at 95°C for 1 seconds and 60°C for 20 seconds. In each reaction, a negative control was added (mix only).

MiRNA expression was expressed as Relative Quantification (RQ), which determines the changes in steady-state miRNA levels of a gene (per sample) and expresses its relation to the levels of an internal control miRNA.<sup>60</sup> The qPCR amplification plots were determined as threshold cycle ( $C_t$ ) values for each sample. The mean of  $C_t$  value was calculated after qPCR results (in duplicate) for each sample.  $C_t$  values were transformed into RQ by comparative  $C_t$  method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) as described before.<sup>60</sup> MiRNAs extracted from NI mice were considered as calibrators for calculations of miRNA expression of EV-IM, ACT and CHR groups. According to the comparative  $C_t$  method, the expression values of calibrators were considered as 1.0.

## 2.9 | Data analysis

Comparisons of concentrations and sizes EVs, as well as, cytokine production between experimental groups were statistically

evaluated by GraphPad Prism 6.0 Software Inc (San Diego, CA, USA). The coefficient of similarity between groups was calculated by the Unpaired Student's t Test (one-tailed) with a 95% confidence interval. Differences between groups were also tested, comparing each of them by the one-way analysis by ANOVA. Differences or similarities in both statistical analyses were considered statistically significant at  $P$ -value  $\leq .05$ .

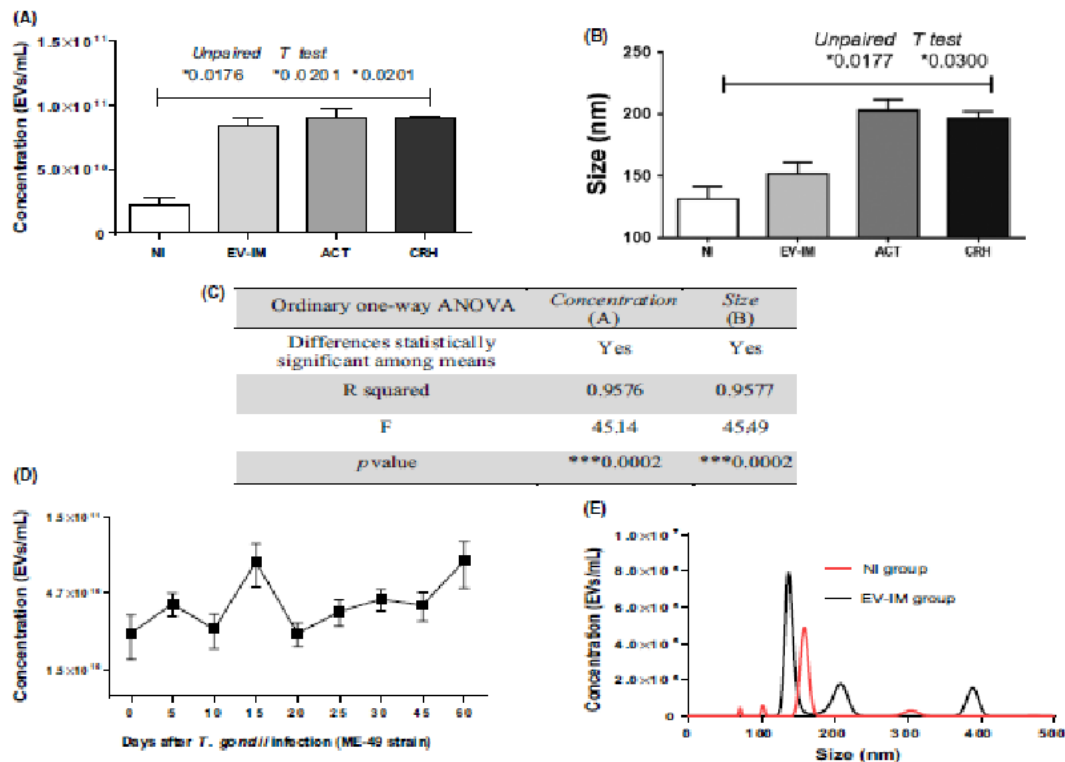
## 3 | RESULTS

### 3.1 | Characterization of murine EVs

Murine serum-derived EVs were concentrated by ultracentrifugation and, next, the size and concentration of EVs were determined in NanoSight. Figure 1A shows, as mean, the concentration of pooled serum-derived EVs (1 mL) of 5 mice/group. Concentration of serum-derived EVs from NI group (mean:  $2.22 \times 10^{10}$  EVs/mL) was statistically smaller than EV-IM group (mean:  $8.40 \times 10^{10}$  EVs/mL), ACT group (mean:  $8.92 \times 10^{10}$  EVs/mL) and CHR group (mean:  $8.93 \times 10^{10}$  EVs/mL), at  $P = .0176$ ,  $P = .0201$  and  $P = .0201$ , respectively. In parallel, particle sizes were also investigated by NTA. Figure 1B shows the comparison between the means  $\pm$  SEM of size of serum-derived EVs of the following groups. NI (mean:  $131 \pm 7.2$  nm), EV-IM (mean:  $153 \pm 5.5$  nm), ACT (mean:  $202 \pm 6.4$  nm) and CHR (mean:  $193 \pm 12.2$  nm). ACT and CHR groups had statically bigger EV size than NI group at  $P = .0177$  and  $P = .0300$ , respectively. Figure 1C shows the analyses performed by ordinary one-way ANOVA. Differences between all groups for concentration and size of EVs were statistically significant at  $P = .0002$  and  $P = .0002$  respectively. Although in all samples, EVs with size corresponding to exosomes were shown in NanoSight, the mean of them shows that a great part of serum-derived EVs from infected mice was microvesicles-like.

Evolution of murine EVs in the course of *T gondii* infection also was investigated. At the beginning of infection ( $T = 0$ ) the value was  $2.58 \times 10^{10}$  EVs/mL. During the acute infection, around 15th day, the concentration increased to  $7.6 \times 10^{10}$  EVs/mL and values were similar until 60th day, during chronic infection ( $7.57 \times 10^{10}$  EVs/mL) (Figure 1D). With the intention to illustrate the production of serum-derived EVs after immunization with *T gondii*-released EVs, Figure 1E shows the difference between concentrations of serum-derived EVs from EV-IM and NI groups.

Images analysed by TEM confirmed NTA results. Murine serum-derived EVs had the shape and size of microvesicles-like and exosomes. Figure 2A (NI), 2B (EV-IM) and 2C (CHR) show purified EVs with size of exosomes from mice. No difference was observed in shape or size between mouse groups. In the same way, NTA and TEM results were confirmed after analysis by immunoblotting. Figure 2D shows EV proteins separated by 10% SDS-PAGE and stained by silver. Each sample of pooled serum-derived EVs was used after concentration by ultracentrifugation. These proteins were transferred to nitrocellulose and incubated with anti-CD63 and anti-CD9 antibodies, which revealed the presence of exosome tetraspanins, CD63, at 37 kDa (Figure 2E), and CD9, at 28 kDa (Figure 2F) in



**FIGURE 1** Mouse EVs evaluated by representative NTA. Concentration/mL (Panel A) and mean size (in nm) (Panel B) of EVs purified of pooled murine sera (1 mL) by ultracentrifugation of the following groups: NI (normal); EV-IM (immunized with EVs) ACT (acute infected by RH strain) and CHR (chronic infected by ME-49 strain). (Panel D) shows the evolution of murine EVs after *T. gondii* infection (ME-49 strain). Panel E shows serum-derived EVs from NI group (red line) and EV-IM group (black line). Data were determined by representative size distribution (nm) and particles/mL in NanoSight equipment. Data of the four panels represent three reads per sample. These experiments were performed 3 times to confirm the results. Differences between groups were statistically calculated by Unpaired Student's t Test (one-tailed) and one-way ANOVA (Panel C)

immunoblotting. These results confirmed the presence of exosomes in preparations.

### 3.2 | Murine splenocytes stimulated in vitro with *T. gondii*-released EVs and cytokine synthesis

Mouse splenocytes of NI, EV-IM and CHR groups were re-stimulated in vitro with *T. gondii* released EVs. Next, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-17 activities were determined by ELISA in the supernatant of murine splenocytes collected from the three mouse groups (Figure 3). In parallel, controls were also evaluated by ELISA. The same cells, treated with Con A or LPS had an excellent proliferation. There was no proliferation in negative controls, which contained splenocyte cultures in absence of antigen.

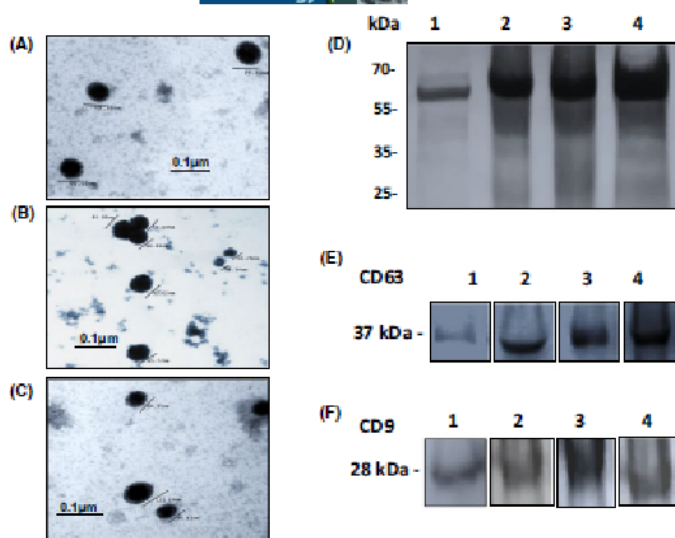
Murine splenocytes from EV-IM and CHR groups stimulated with *T. gondii* EVs, for 48 hours, produced similar IFN- $\gamma$  levels (406.8 pg/mL

and 566.6 pg/mL, respectively). Murine splenocytes from NI group produced low IFN- $\gamma$  amounts (246.8 pg/mL). The differences between NI group from the EV-IM or CHR groups were statistically significant at  $P = .0112$  and  $P = .0079$ , respectively (Figure 3A).

Murine splenocytes from EV-IM group stimulated with EVs from *T. gondii*, for 48 hours, produced high levels of IL-10 (1214.55 pg/mL) when compared with those from CHR and NI groups (867.35 pg/mL and 782.9 pg/mL, respectively). Difference between NI and EV-IM groups were statistically significant at  $P = .0422$  (Figure 3B).

TNF- $\alpha$  levels determined in murine splenocytes, stimulated with EVs produced by *T. gondii*, for 24 hours, in EV-IM and CHR groups were 113.6 pg/mL and 96.6 pg/mL, respectively. Both values were higher than those from NI group (7.5 pg/mL). Differences between of NI group from EV-IM or CHR groups were statistically significant at  $P = .0042$  and  $P = .0022$ , respectively (Figure 3D).

Equally, IL-17 levels in murine splenocytes of EV-IM and CHR groups were 1.82 pg/mL and 4.32 pg/mL, respectively. Both values



**FIGURE 2** Murine microvesicles and exosomes evidenced by TEM and immunoblotting. Images captured by transmission electron microscopy of purified EVs (microvesicles and exosomes) of sera from NI (Panel A), EV-IM (Panel B) and CHR (Panel C) groups. Barr = 0.1 μm. Magnification of all images: 150 000. Images show the size (in nm) of each vesicle. Pooled serum-derived EVs from NI (line 1), EV-IM (line 2), ACT (line 3) and CHR (line 4) were separated by 10% SDS-PAGE and stained by silver (Panel D). Next, gel was transferred to nitrocellulose and incubated with anti-CD63 (Panel E) and anti-CD9 antibodies (Panel F)

were higher than that from NI group (0.41 pg/mL). Differences of NI group from the EV-IM or CHR groups were statistically significant at  $P = .035$  and  $P = .0073$ , respectively (Figure 3E). Analyses performed by ordinary one-way ANOVA are shown in Figure 3C. Differences between all groups for IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and IL-17 were statistically significant at  $P = .0001$ ,  $P = .003$ ,  $P = .0001$  and  $P = .0053$ , respectively.

### 3.3 | miRNAs expression in immunized mice with *T gondii*-released EVs

Gene expression experiments were carried out to determine whether *T. gondii* could affect the expression of miR-155-5p, miR-29c-3p, miR-125b-5p, miR-9-5p, miR-21-5p and miR-146a-5p on murine experimental model. The quality of RNA extraction in all samples was proved after positive results for Cel-miR-39 in qPCR, which was used as external control, after the inclusion of the synthetic molecule.

Figure 4 shows RQ values of each miRNA assayed in murine sera of EV-IM, ACT and CHR groups. MiRNAs studied were more expressed in immunized mice than infected ones (ATC and CRH groups). The EV-IM group expressed miR-155-5p, miR-29c-3p and miR-125b-5p, with mean RQ values (or more expressed than the NI group) of 3.78, 2.84 and 1.95, respectively. The others (miR-9-5p, miR-21-5p and miR-146a-5p) were poorly expressed with RQ values of 1.11, 1.13 and 0.62, respectively.

In the CHR group, miR-155-5p, miR-9-5p, and miR-21-5p had RQ values of 1.08, 1.29 and 1.35, respectively. The other miRNAs analyzed in the CHR group and all in the ACT group were poorly expressed (values below 1.0).

## 4 | DISCUSSION

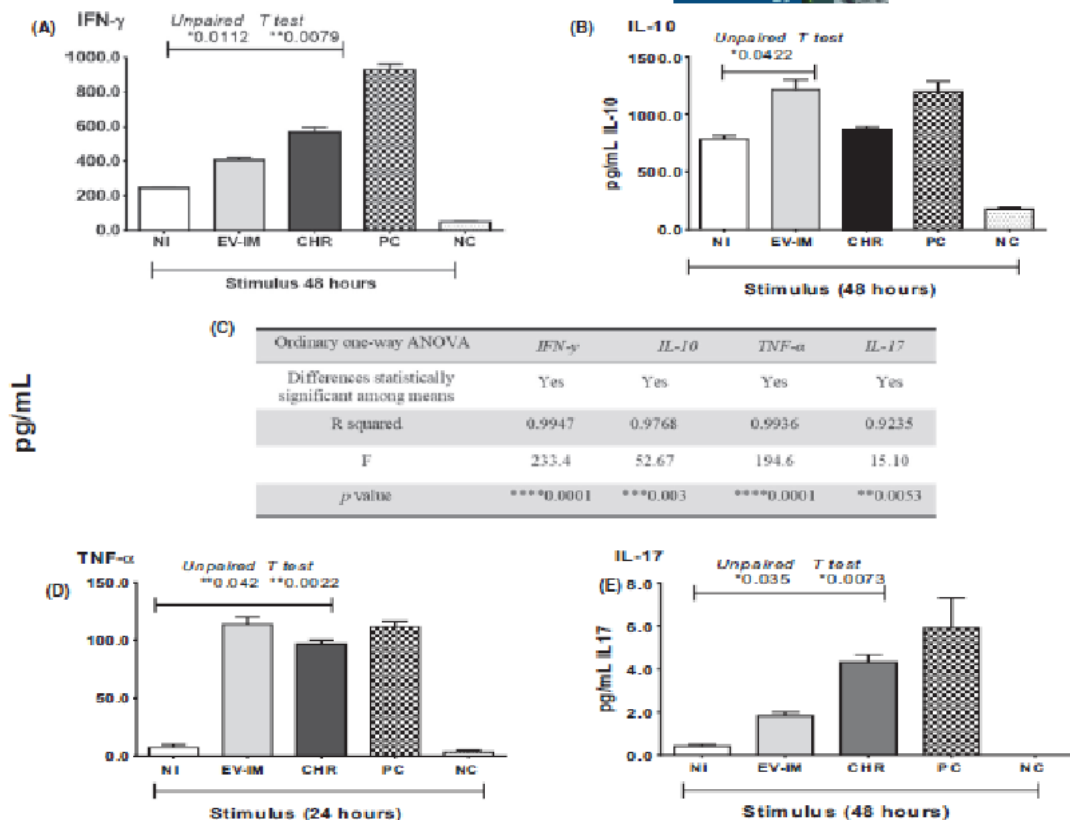
Exosomes and microvesicles produced by mammals participate in different functions as transference of macromolecules, biomarkers that can interact with specific molecules of the immune system and others.<sup>5,4,41,42</sup>

*T. gondii* derived EVs transport and release ESA and other molecules, which participate in tachyzoite invasion, replication within host cells and stimulation of the immune system.<sup>24,20,43</sup> The interaction between both organisms causes the stimulation of host EVs and protective immune response against *T. gondii* derived EVs. These findings were well-described before.<sup>24,30,44</sup> In addition, *T. gondii* derived EVs used as immunogen caused an immune response capable of reducing the levels of tachyzoites in mouse blood, contributing to parasitaemia reduction and survival indexes increase.<sup>27,20,50</sup>

As the main goal of this study was the investigation of all EVs produced in mouse sera, the option was the ultracentrifugation of samples at a unique speed. The sequence of the analyses included: (a): concentration of EVs by ultracentrifugation; (b): evidence of exosomal proteins, as tetraspanins in purified EVs and; (c): confirmation, by NTA and electron microscopy, of characteristic structures of EVs, as size and shape. The analysed samples/group was constituted of pooled sera, in 1mL-volume from five mice per each group.

Concentration of serum-derived EVs from the NI group was statistically smaller than those infected with *T. gondii* (ACT and CHR) and immunized with EVs from taquizoitos. These differences are well-represented in Figure 1C,D. NTA results, also, indicated that great part serum-derived EVs of infected mice were microvesicles since the particle sizes were different from the NI group. The sizes of EVs produced by ACT and CHR groups were bigger than the NI group. This difference was not noted in EVs purified of immunized



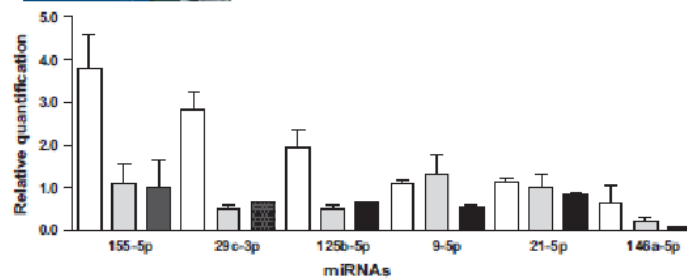


**FIGURE 3** Cytokine production of murine splenocytes after EV stimulation in vitro. Splenocytes ( $1 \times 10^6$ /well) from NI (white columns), EV-IM (grey columns), and CHR (black columns) mice were re-stimulated with EVs (100  $\mu$ g/mL) for IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), TNF- $\alpha$  (D) and IL-17 (E). Supernatants were collected after 24 or 48 and cytokine levels were determined by ELISA. Splenocytes were collected from spleens of three mice (per experiment). The values represent the mean  $\pm$  SEM of each cytokine (pg/mL) amount. NC, negative control, splenocyte cultures in the absence of *T gondii* EVs. PC, positive control, CoA for IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-17 or LPS for TNF- $\alpha$ . These experiments were performed twice to confirm the results. Differences between groups were statistically calculated by Unpaired Student's t Test (one-tailed) and one-way ANOVA (Panel C)

mice. These results can suggest that EVs produced by infected hosts are correlated with the stimulation of immune response. These findings can be confirmed by data shown in Figure 1C. Mice infected with ME-49 strain develop very low parasitaemia. After acute form, which occurs around 10 to 15 days post-infection, depending on mouse lineage or parasite amount used for infection, the chronic form infection is installed.<sup>57</sup> Coincidentally, a similar increase of EV amount, from this period was observed. Similar results were shown before in human samples since concentrations of serum-derived EVs from seropositive patients for toxoplasmosis were higher than those from noninfected individuals.<sup>58</sup> Although the majority of EVs were microvesicles-like in samples from infected mice, the presence of exosomes was also confirmed by size and shape in TEM. In addition, no difference was observed in shape or size between mouse groups, beyond the evidence of the tetraspanins CD63 and CD9 confirmed in immunoblotting after SDS-PAGE. These data can give subsidies

to propose that the concentration of host EVs is able to distinguish infect or noninfect hosts.<sup>58,62</sup>

According to other studies, systemic inflammations caused by severe infections increase the release of EVs and these vesicles contain proinflammatory factors, including microRNAs, which directly cause the activation of cytokine production.<sup>56,62,66</sup> Consequently, the cellular immune response correlated with murine EVs production was also investigated. Murine splenocytes of EV-IM, CHR and NI groups were stimulated with *T gondii* derived EVs. ELISA results showed that splenocytes from EV-IM and CHR groups up-expressed IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 when compared with those from the NI group. These results could be correlated with the fact of during the active infection when tachyzoites are releasing EVs, the host immune system produces IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17 to control the inflammation and infection.<sup>33,47</sup> In addition, these data also can suggest a synergistic action in these cytokines to control the virulent action



**FIGURE 4** MiRNA expression in immunized mice and chronic infected mice. MiRNA expression assayed in sera from EV-IM (white columns), CHR (grey columns) and ACT (black columns) groups. The miRNAs were: miR-155-5p, miR-29c-3p, miR-125b-5p, miR-9-5p, miR-21-5p and miR-146a-5p. Gene expression of each miRNA was determined by qPCR, after miRNA isolation and cDNA synthesis. Results are expressed as Relative Quantification that was determined by comparative  $C_t$  method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method. According to the Material and Methods section, all miRNA expression values were normalized to the values of the NI mouse group that were considered as 1.0. All samples were tested in triplicate

of tachyzoite-released EVs. Curiously, IL-10 was up-expressed only in splenocytes from the EV-IM group. Certainly, the immunization stimulated high production of IL-10 to prevent the infection.<sup>70,40</sup>

Previous studies have shown that miRNAs regulate different functions correlated with cellular immune responses<sup>49,50</sup> and some miRNAs can be detected in hosts infected with *T. gondii*.<sup>24, 26, 28, 29, 31, 33</sup> Consequently, in this study, the experiments were carried out to determine whether *T. gondii* could affect the expression of some miRNAs in murine models. A panel of miRNAs well known in human biological samples was assayed.<sup>55,59</sup>

Interestingly, results of miRNAs showed the expression of miR-155-5p, miR-29c-3p and miR-125b-5p in sera in the three groups studied, when they were compared with those of NI group. However, immunized mice expressed more than infected ones (ATC and CRH groups). Although many functions of miRNAs are unknown in toxoplasmosis, some of them already were established in both murine and human hosts. Studies demonstrated that in mice, miR-155-5p participates in modulation of immune cell activity during *T. gondii* infection. MiR-155-5p yet participates in the differentiation of Th1 response and it is required for cytokine expression by T-reg cells. In addition, miR-155-5p is highly expressed in Th17 cell subpopulations in humans and mice.<sup>22,23</sup> Patients with ocular toxoplasmosis presented exacerbated expression of miR-155-5p and miR-29c-3p. The elevated production of pro-inflammatory cytokines as IL-6, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  and IL-18 could be caused by the excess of miR-155-5p and miR-29c-3p.<sup>28,24</sup>

In the same way, miR-29c-3p participates as a regulator of Th1 and IFN- $\gamma$  in innate and adaptive immunity in natural infection. The host immune cells produce high levels of IFN- $\gamma$  by *T. gondii* induction. This process is uninterrupted in order to control acute and chronic infection. An imbalance production of inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and iNOS has a critical role in the immune response in intracellular infections.<sup>21,22</sup>

Individuals with asymptomatic toxoplasmosis expressed miR-125-5p.<sup>29</sup> However, an elevation of TNF- $\alpha$  can cause an up-regulation of miR-125-5p. This miRNA, yet, downregulated macrophages infected with *T. gondii*, RH strain.<sup>26,27</sup>

Amongst miRNAs investigated in this study, miR-9-5p, miR-21-5p and miR-146a-5p were poorly or not expressed in all studied mouse groups and it was not possible to correlate with the host infection.

Finally, these data can suggest that interaction between the host and *T. gondii* can also occur via EVs. Likewise, miRNAs participate in the modulation of cellular immune response against *T. gondii*. These data, yet, give subsidies to propose the discrimination between infect or noninfect hosts by concentration analyse of serum-derived EVs.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

VLP-C coordinated, designed and analysed experiments, and wrote the manuscript. MMM, ABC and VLP-C performed the immunization experiments; mouse *T. gondii* infections; EV isolation; particle quantifications in NanoSight-NTA; SDS-PAGE and immunoblotting; cellular response experiments. NNT and GMN performed experiments using transmission electron microscopy. ABC, MMM and ISP performed miRNA purifications and analysis. All authors contributed substantially to interpretation of the data and to the manuscript. In addition, they revised the manuscript, approved the final version submitted, published, and agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.


#### DISCLOSURES

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entire with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

#### PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://publons.com/publon/10.1111/pim.12869>.

## ORCID

Vera Lucia Pereira-Chioccola  <https://orcid.org/0000-0003-3317-195X>

## REFERENCES

- Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:581-593.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics*. 2010;73:1907-1920.
- Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res*. 2006;66:4795-4801.
- Delabranche X, Berger A, Boisrame-Helms J, Meziani F. Microparticles and infectious diseases. *Med Mal Infect*. 2012;42:335-343.
- Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;363:1965-1976.
- Hill DE, Chirukandath S, Dubey JP. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Ann Health Res Rev*. 2005;6:41-61.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol*. 2008;55:467-475.
- Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, Su C. *Toxoplasma gondii* infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients. *Future Microbiol*. 2009;4:1363-1379.
- Elbez-Rubinstain A, Aijzenberg D, Dardé ML, et al. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy: case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. *J Infect Dis*. 2009;199:280-285. <https://doi.org/10.1086/595793>
- Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr Infect Dis*. 2011;30:1056-1061.
- Dubey JP. Toxoplasmosis in sheep-the last 20 years. *Vet Parasitol*. 2009;7:1-14.
- Rani S, Cerqueira-Cézar CK, Murata FHA, et al. *Toxoplasma gondii* tissue cyst formation and density of tissue cysts in shoulders of pigs 7 and 14 days after feeding infected mice tissues. *Vet Parasitol*. 2019;269:13-15.
- Glasner PD, Silveira C, Kruszon-Moran D, et al. An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am J Ophthalmol*. 1992;114:136-144.
- Mattos CC, Meira CS, Ferreira AI, et al. Contribution of laboratory methods in diagnosing clinically suspected ocular toxoplasmosis in Brazilian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:362-366.
- Ferreira AI, De Mattos CC, Frederico FB, et al. Risk factors for ocular toxoplasmosis in Brazil. *Epidemiol Infect*. 2014;142:142-148.
- Previato M, Frederico FB, Murata FH, et al. A Brazilian report using serological and molecular diagnosis to monitoring acute ocular toxoplasmosis. *BMC Res Notes*. 2015;8:746.
- Vidal JE, Hernandez AV, de Oliveira AC, Dauer RF, Barbosa 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;19:840-848.
- Vidal JE, Oliveira AC. AIDS-related cerebral toxoplasmosis in São Paulo State, Brazil: marked improvements in the highly active antiretroviral therapy-era but the challenges continue. *Braz J Infect Dis*. 2013;17:379-380.
- Hernandez AV, Thota P, Pellegrino D, et al. A systematic review and meta-analysis of the relative efficacy and safety of treatment regimens for HIV-associated cerebral toxoplasmosis: is trimethoprim-sulfamethoxazole a real option? *HIV Med*. 2017;18:115-124.
- Bossi R, Bricaire F. Severe acute disseminated toxoplasmosis. *Lancet*. 2004;364:579.
- Carruthers VB. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop*. 2002;81:111-122.
- Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40:71-80.
- Noor S, Habashy AS, Nance JP, et al. CCR7-Dependent immunity during acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infect Immun*. 2010;78:2257-2263.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood*. 2007;110:3234-3244.
- Wovk PF, Zardo ML, Miot HT, Goldenberg S, Carvalho PC, Mörking PA. Proteomic profiling of extracellular vesicles secreted from *Toxoplasma gondii*. *Proteomics*. 2017;17:15-16.
- Silva VO, Maia MM, Torrecilhas AC, et al. Extracellular vesicles isolated from *Toxoplasma gondii* induce host immune response. *Parasite Immunol*. 2018;40:e12571.
- Li Y, Liu Y, Xiu F, et al. Characterization of exosomes derived from *Toxoplasma gondii* and their functions in modulating immune responses. *Int J Nanomed*. 2018;19:467-477.
- Aline F, Bout D, Amigorena S, Roingeard P, Dimier-Poisson I. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T gondii* infection. *Infect Immun*. 2004;72:4127-4137.
- Beauvillain C, Ruiz S, Guiton R, Bout D, Dimier-Poisson I. A vaccine based on exosomes secreted by a dendritic cell line confers protection against *T gondii* infection in syngeneic and allogeneic mice. *Microbes Infect*. 2007;9:1614-1622.
- Maia MM, Cruz AB, Taniwaki NN, et al. Immunization with extracellular vesicles excreted by *Toxoplasma gondii* confers protection against infection in mice activating cellular and humoral responses. *Int J Parasitol*. 2021;51(7):559-569. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.010>
- Fleming A, Sampey G, Chung M, et al. The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. *Pathog Dis*. 2014;71:109-120.
- Rappa G, Puglisi C, Santos MF, Forte S, Memeo L, Lorico A. Extracellular vesicles from thyroid carcinoma: The new frontier of liquid biopsy. *Int J Mol Sci*. 2019;20:e1114.
- Spaull R, McPherson B, Gialeli A, et al. Exosomes populate the cerebrospinal fluid of preterm infants with post-haemorrhagic hydrocephalus. *Int J Dev Neurosci*. 2019;73:59-65.
- Matsumoto J, Stewart T, Sheng L, et al. Transmission of alpha-synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathol Commun*. 2017;13:71.
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Likhil S, Wood MJ. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol*. 2011;29:341-345.
- Cruz AB, Maia MM, Pereira IS, et al. Human extracellular vesicles and correlation with two clinical forms of toxoplasmosis. *PLoS One*. 2020;15:e0229602.
- Howe DK, Sibley LDT. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 1995;172:1561-1566.
- Meira-Strejévitch CS, Pereira IS, Hippólito DDC, et al. Ocular toxoplasmosis associated with up-regulation of miR-155-5p/miR-29c-3p and down-regulation of miR-21-5p/miR-125b-5p. *Cytokine*. 2020;127:154990.
- Pereira IS, Maia MM, Cruz AB, et al. Plasma extracellular microRNAs are related to AIDS/cerebral toxoplasmosis co-infection. *Parasite Immunol*. 2020;42:e12696.

40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). *Methods*. 2001;25:402-408.
41. Schwab A, Meyering SS, Lepene B, et al. Extracellular vesicles from infected cells: potential for direct pathogenesis. *Front Microbiol*. 2015;20:1132.
42. Yang XX, Sun C, Wang L, Guo XL. New insight into isolation, identification techniques and medical applications of exosomes. *J Control Release*. 2019;17:50168-3659.
43. Daryani A, Hosseine AZ, Dalimi A. Immune response against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol*. 2003;113:123-134.
44. Pope SM, Lasser C. *Toxoplasma gondii* infection of fibroblasts causes the production of exosome-like vesicles containing a unique array of mRNA and miRNA transcripts compared to serum starvation. *J Extracell Vesicles*. 2013;11:2.
45. Kalra H, Adda CG, Liem M, et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. *Proteomics*. 2013;13:3354-3364.
46. Nematian SE, Mamillapalli R, Kadakia TS, Majidi Zolbin M, Moustafa S, Taylor HS. Systemic inflammation induced by microRNAs: endometriosis-derived alterations in circulating microRNA 125b-5p and Let-7b-5p regulate macrophage cytokine production. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103:64-74.
47. Denker EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:569-588.
48. 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-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1996;157:798-805.
49. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-297.
50. Verma P, Pandey RK, Prajapati P, Prajapati VK. Circulating microRNAs: Potential and emerging biomarkers for diagnosis of human infectious diseases. *Front Microbiol*. 2016;7:1274.
51. Kim MJ, Jung BK, Cho J, et al. Exosomes secreted by *Toxoplasma gondii*-infected L6 cells: their effects on host cell proliferation and cell cycle changes. *Korean J Parasitol*. 2016;54:147-154.
52. Canella D, Brenier-Pinchart MP, Braun L, et al. miR-146a and miR-155 delineate a microRNA fingerprint associated with *Toxoplasma* persistence in the host brain. *Cell Rep*. 2014;6:928-937.
53. Escobar TM, Kanellopoulou C, Kugler DG, et al. miR-155 activates cytokine gene expression in Th17 cells by regulating the DNA binding protein Jarid2 to relieve polycomb mediated repression. *Immunity*. 2014;40:865-879.
54. Maia MM, Meira-Strejevitich CS, Pereira-Chioccola VL, et al. Evaluation of gene expression levels for cytokines in ocular toxoplasmosis. *Parasite Immunol*. 2017;3:12462.
55. Meira CS, Pereira-Chioccola VL, Vidal JE, et al. Cerebral and ocular toxoplasmosis related with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 levels. *Front Microbiol*. 2014;5:492.
56. Wei B, Pei G. MicroRNAs: critical regulators in Th17 cells and players in diseases. *Cell Mol Immunol*. 2010;7:175-181.
57. Li S, Yag J, Wang L, et al. Expression profile of microRNAs in porcine alveolar macrophages after *Toxoplasma gondii* infection. *Parasit Vectors*. 2019;12:65.

How to cite this article: Maia MM, da Cruz AB, Pereira IDS, Taniwaki NN, Namiyama GM, Pereira-Chioccola VL. Characterization of murine extracellular vesicles and *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol*. 2021;00:e12869. <https://doi.org/10.1111/pim.12869>