



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MICHELLE IGARASHI

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA A FORMAÇÃO DE  
CISTOS CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS VACINADOS  
PELA VIA NASAL COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
*TOXOPLASMA GONDII***

**MICHELLE IGARASHI**

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA A FORMAÇÃO DE  
CISTOS CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS VACINADOS  
PELA VIA NASAL COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
*TOXOPLASMA GONDII***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Sanidade Animal, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Odilon Vidotto  
Co-orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia

Londrina  
2006

**MICHELLE IGARASHI**

**PROTEÇÃO IMUNOLÓGICA CONTRA A FORMAÇÃO DE  
CISTOS CEREBRAIS EM CAMUNDONGOS VACINADOS  
PELA VIA NASAL COM PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE  
*TOXOPLASMA GONDII***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Italmir Teodorico Navarro

---

Prof. Dr. Odilon Vidotto

---

Prof. Dr. Izidoro Francisco Sartor

Londrina, 17 de fevereiro de 2006.

O projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina (UEL), como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, sob orientação do Prof. Dr. Odilon Vidotto e Co-orientação do Prof. Dr. João Luis Garcia;

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos juntos às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

- 1. CNPq – Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**
- 2. CPG – Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina**
- 3. CAPES – Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior**

## **DEDICATÓRIA**

**À DEUS,**

pela saúde em concretizar esse sonho

Aos meus pais, Kimiko e Seiji pelo incentivo,  
dedicação e amor em todos os momentos na busca deste sonho.

Aos meus irmãos André e Anderson e a minha querida avó  
por fazerem parte de minha vida em amor e amizade.

Agradeço a **Deus**

Por ser o autor de minha vida,  
Meu único Deus e Criador de Todo Universo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Seije** e **Kimiko Igarashi** pelo amor, cuidado e apoio incondicionais a mim dispensados, que nunca poderão ser retribuídos a altura, nessa existência. Te amo pai e mãe por serem os melhores pais para mim.

A minha **avó** (Batian) pelo carinho, atenção e dedicação. Pela presença indispensável em várias etapas de minha vida. Agradeço também pelas deliciosas refeições preparadas com tanto carinho.

Aos meus irmãos **André** e **Anderson**, pela paciência e atenção nos momentos que estava mais precisando para a finalização desse projeto.

Aos meus pastores **Shinze** e **Dilma Yahiro** pela amizade, carinho, atenção e principalmente pelas orações para a concretização desse sonho em minha vida. Agradeço pelos momentos de conversa, de risos e lágrimas que passamos juntos, momentos que apesar de terem sido poucos, foram muito importantes nessa etapa que passou.

Aos meus irmãos e irmãs em Cristo Jesus, **Gustavo, Cristina, Keiti, Elaine, Tatiana Horii, Karina Ito, Rodney, Mirian** e **Regina** pelo companheirismo e amizade, sempre dispostos a ajudar em todas as oportunidades. Por tantos momentos de alegrias e tristezas, pelas orações, nas horas em que estava mais precisando, pelo ombro amigo, pelas palavras de incentivo e carinho, que sempre estarão guardadas em meu coração.

Ao meu orientador, Prof. **Dr. Odilon Vidotto**, que teve a disposição em aceitar-me como orientada, pela paciência, dedicação e amizade durante todos esses anos. Pela força de vontade imprescindível a realização desse trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. **Dr. João Luis Garcia**, por ter me ensinado muito mais que pesquisa, mas a responsabilidade e a disciplina. Agradeço pela amizade, respeito, dedicação e paciência, por acreditar em mim, nesses dois anos de mestrado, pela confiança e pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. Dr. **Izidoro Francisco Sartor**, pela disposição, auxílio e conhecimentos indispensáveis nas correções desse trabalho. Agradeço pela participação na Banca de Defesa e contribuição para engrandecimento desse estudo.

A professora **Dr. Marilda Carlos Vidotto** pela colaboração e conhecimentos indispensáveis para a finalização desse trabalho. Agradeço pelo apoio técnico, fornecimento de materiais e por colocar seu laboratório a disposição para a realização desse projeto.

Ao Prof. **Dr. Italmir Teodorico Navarro**, pela disposição em participar de minha banca de qualificação e de defesa, pela disponibilidade em realizar correções nesta dissertação e pela contribuição para o engrandecimento deste estudo.

Ao Prof. **Dr. Amauri A. Alfieri**, pela amizade e pelas palavras de incentivo na realização desse trabalho. E pela disponibilidade em participar da banca de qualificação, assim como pelas correções nesta dissertação.

A Profa. **Dra. Rosângela Zacarias Machado** da Universidade Estadual Paulista (UNESP), pela colaboração e parceria com o Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Estadual de Londrina.

Aos professores do Laboratório de Parasitologia **Ademir Luz Pereira, José da Silva Guimarães Junior e Milton H. Yamamura** pelo convívio e amizade, sempre dispostos a ajudar em todas as horas as oportunidades.

A professora **Janis Regian Messias Gonzáles**, pelo apoio técnico em colocar a disposição a utilização dos aparelhos de raio x para a realização desse projeto.

Ao Prof. **Nosawa** do Laboratório de Virologia do centro de ciências biológicas, pelo apoio em colocar o seu laboratório a disposição para a finalização do trabalho.

A amiga e técnica do Laboratório de Parasitologia **Dalva**, pela amizade e dedicação durante todos esses anos de UEL.

Ao grande amigo de todas as horas e funcionário do Laboratório de Zoonoses **Ademir**, pela amizade, pelas conversas, risos, preocupação e disposição em auxiliar em várias fases desse trabalho.

Aos secretários **Nelson Alexandre Moretto, Reinaldo e Valdecir**, pela paciência e eficiência dispensadas sempre que requisitados.

Aos funcionários do Laboratório de Virologia Veterinária UEL: **Dalíria, Maria** e a médica veterinária **Kerlei C. Médice**, pelo auxílio, com paciência e gentileza.

Ao amigo e técnico do Laboratório de Microbiologia **Zé**, pelo carinho em que se dispôs a ajudar em várias etapas desse projeto, principalmente no auxílio com os experimentos com os coelhos.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária **João Cardoso, Inês e José** pela disposição em ajudar em todas as oportunidades.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Veterinária responsáveis pelos equipamentos de raio x **Klesio, Seu Toninho e Orlando** pela compreensão, paciência, e auxílio no uso dos equipamentos na realização dos inúmeros Western blotting.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas **Mari, Ediel e Zue**, pela paciência e me auxiliar no uso dos equipamentos e por se colocar a disposição em todos os momentos.

As funcionárias **Maria José e Neusa** pelos maravilhosos cafezinhos feitos com tanto amor e dedicação, tão importantes nas horas de descanso.

As minhas grandes amigas do coração e companheiras de laboratório **Flora Satiko Kano, Kátia Tamekuni e Paula M. Kawasaki**, por terem sido mais que amigas, mas verdadeiras irmãs em TODOS os momentos desses dois anos de mestrado. Por me proporcionarem momentos maravilhosos, em conversas, desabafos, muitos risos e muitos aprendizados tanto vida profissional como pessoal. Principalmente nos momentos de dificuldades, foram vocês

que me apoiaram e me ajudaram a levantar e a ver a situação com outros olhos, obrigada por terem adocicado essa etapa de minha vida.

As minhas novas amigas **Marisa Kawaichi** e **Renata** companheiras do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas, pelos momentos de alegrias que passamos juntas, pela disposição, paciência, apoio em me ajudar em vários momentos no laboratório e também fora da universidade. Agradeço pela amizade maravilhosa, por terem sido tão amorosas e prestativas comigo, vocês foram uns dos maiores tesouros que ganhei durante esses dois anos de mestrado.

A minha amiga e irmã **Jussevania**, do Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Biológicas, pelas orações, amizade, paciência e amor demonstrados a mim durante todo esse tempo juntas. Pela bondade, sabedoria e dedicação incondicional, guardarei para sempre, suas palavras de incentivo, de fé e de carinho em meu coração.

Aos amigos da Pós-Graduação do Mestrado **Vanessa Hashimoto, Eleine, Letícia, Juliana Galhardo, Melissa Lopes, Rafael Salmazo, Adriana Rosa, Andréia, Mykel (Dunga), Juliana Tiemi, Dengoso, Fabio Galli, Daniel (Frango), Alexandre Amude e Graziela** pelo companheirismo, amizade e carinho. Pelos momentos de cafezinho e descontração.

As amigas de Pós-Graduação do Doutorado **Betinha, Marlise, Ju Dias e Mara**, pela amizade, atenção e companheirismos. Pelos momentos de risadas juntas e auxílio em todos os momentos.

Aos residentes do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva **Kênio, Ronaldo e Kledir**, pela amizade e auxílio em todas as horas solicitadas.

E finalmente a Universidade Estadual de Londrina por toda infraestrutura disponibilizada para realização desse trabalho.

*“um homem sem ninguém, não tem filho nem irmã; contudo não cessa de trabalhar, e seus olhos não se fartam de riquezas; e não diz: Para quem trabalho eu, se nego a minha alma os bens da vida? Também isto é vaidade e enfadonho trabalho.”*

*“Melhor é serem dois do que um, porque tem melhor paga do seu trabalho.”*

*“Porque se caírem, um levanta o companheiro; ai, porém, do que estiver só; pois, caindo, não haverá quem o levante.”*

*“Se alguém quiser prevalecer contra um dois lhe resistirão; o cordão de três dobras não se arrebenta com facilidade.”*

**Eclesiastes 4: 8,9,10 e 12**

IGARASHI, Michelle. **Proteção imunológica contra a formação de cistos cerebrais em camundongos vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes do *Toxoplasma gondii***. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um parasita protozoário capaz de invadir e se replicar em uma ampla variedade de células de todos os animais de sangue quente, incluindo o homem. A invasão do parasita está associada à secreção de proteínas de três organelas distintas: micronemas, roptrias e grânulos densos. Esses antígenos excretados/secretados são considerados altamente imunogênicos para humanos e roedores, podendo induzir proteção imune humoral e celular. O objetivo do trabalho foi avaliar a proteção contra a formação de cistos cerebrais em camundongos imunizados pela via nasal com proteínas recombinantes do *Toxoplasma gondii*. As proteínas GRA5, GRA7 e ROP2 foram clonadas, expressadas e padronizadas para a imunização dos animais. Foram utilizados 30 camundongos Balb/C divididos em três grupos. O grupo 1 (G1,  $n = 11$ ), foi imunizado com duas doses (12,5  $\mu\text{g}$  de cada proteína + 0,5  $\mu\text{g}$  de toxina colérica) da vacina, o grupo 2 (G2,  $n = 11$ ) recebeu duas doses de tampão salina fosfato (PBS) + toxina colérica (0,5 $\mu\text{g}$ ) e o grupo 3 (G3,  $n = 8$ ) recebeu duas doses de PBS. As doses foram administradas nos dias 0 e 21 do experimento. Os camundongos foram desafiados com 50 cistos teciduais da cepa VEG do *T. gondii* pela via oral no dia 33. No G1, os animais apresentaram significativa produção de IgA (ELISA indireto) após a segunda imunização com a vacina de proteínas recombinantes. A resposta celular nesse grupo foi observada pela proliferação de esplenócitos. Os animais do G1 exibiram menor formação de cistos teciduais quando comparados ao grupo controle (G3,  $p < 0,05$ ). Esses resultados indicam que a imunização pela via intranasal com as proteínas ROP2, GRA5 e GRA7 associados à toxina colérica pode induzir resposta imune humoral e celular e uma proteção contra a formação de cistos teciduais após desafio.

**Palavras-chaves:** Proteínas recombinantes. Roptrias. Grânulos densos. Vacina. Imunização. Intranasal. Toxina colérica e cistos.

IGARASHI, Michelle. **Immunological protective against cerebral cysts formation in mice vaccinated with recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* by nasal route.** 2006. 78f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

### ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite which can invade and reside in a wide range of host cells. It can infect all warm-blooded animals, including human being. Parasite invasion is associated with protein secretion from three organelles: micronemes, rhoptries and dense granules. These excreted/secreted antigens were highly immunogenic in humans and rodents, that stimulates immune humoral and cellular protection. The purpose of this work was to evaluate protective activity against brain cyst formation in mice vaccinated with recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* by nasal route. Rhoptry and dense granule recombinant proteins of *Toxoplasma gondii* (ROP2, GRA5 and GRA7) were used in vaccine preparation. For experiment, 30 Balb/C mice were divided into three groups, group 1 (G1, vaccinated challenged,  $n = 11$ ) received two doses (12,5  $\mu\text{g}$  of each protein plus 0,5  $\mu\text{g}$  of choleric toxin) of recombinant vaccine, group 2 (G2, vaccinated challenged,  $n = 11$ ) received two doses (buffer saline phosfato - PBS plus 0,5 $\mu\text{g}$  of choleric toxin) and group 3 (G3, unvaccinated challenged,  $n = 8$ ) received two doses of PBS. Doses were performed at days 0 and 21. Mice were infected with 50 VEG strain brain cysts by oral infection at day 33. The G1 mice produced significantly immunoglobulin A (ELISA) after second dose of recombinant vaccine. A systemic cellular responses was observed by proliferation of splenocytes in response to recombinant proteins. Animals from G1 exhibited strong resistance to cysts formation in comparison with cholera toxin immunized groups controle (G2) and control group (G3,  $p < 0.05$ ). These results indicated that intranasal immunization in mice with recombinant proteins ROP2, GRA5 and GRA7 associated with cholera toxin can induce protection against tissue cysts formation after oral infection with tissue cysts of *T. gondii*.

**Keywords:** Recombinant proteins. Rhoptry. Dense granule. Vaccine. Immunization. Intranasal. Cholera toxin and cysts.

## LISTA DE FIGUAS

<b>Figura 1</b> - Construção dos plasmídeos recombinantes e clivagem com enzimas de restrição em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.....	56
<b>Figura 2</b> - Expressões das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> analisadas em gel SDS-PAGE 12% corada com comassie blue.....	57
<b>Figura 3</b> - Caracterização antigênica das proteínas rROP2, rGRA5 e rGRA7 por reação de Western blotting com soro policlonal de coelhos.....	58
<b>Figura 4</b> - Reação de imunofluorescência indireta em células VERO infectadas com taquizoítos.....	59
<b>Figura 5</b> - Dosagem de IgA no soro de camundongos inoculados pela via nasal com proteínas recombinantes do <i>T. gondii</i> .....	60
<b>Figura 6</b> - Dosagem de IgA do conteúdo do intestino delgado (a, n=3) e das fezes (b, n= 8) de camundongos.....	61
<b>Figura 7</b> - Dosagem de IgG no soro de camundongos inoculados pela via nasal com proteínas recombinantes do <i>T. gondii</i> .....	62
<b>Figura 8</b> - Resposta proliferativa de linfócitos esplênicos estimulados com antígenos de <i>T. gondii</i> .....	63
<b>Figura 9</b> - Número de cistos cerebrais observados por grupo experimental em camundongos desafiados com 50 cistos teciduais da cepa VEG.....	64
<b>Figura 10</b> - Sobrevivência dos camundongos desafiados pela via oral com 50 cistos teciduais da cepa VEG.....	65

## SUMÁRIO

<b>1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
1.1 Taxonomia e Biologia do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	14
1.2 Mecanismos de Evasão.....	16
1.3 Proteínas do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	18
1.4 Resposta imune.....	20
1.5 Vacinas para toxoplasmose .....	22
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	24
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos Específicos .....	24
<b>3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	25
Proteção imunológica contra a formação de cistos cerebrais em camundongos vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes de <i>Toxoplasma gondii</i> .....	26
Resumo .....	26
Abstract.....	27
Introdução.....	28
Material de Métodos.....	29
Resultados.....	35
Discussão .....	37
Conclusão .....	40
Referências bibliográficas .....	41
<b>4 CONCLUSÕES</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47
<b>APÊNDICES</b> .....	54
Apêndice A – Documentação Fotográfica .....	55
<b>ANEXOS</b> .....	66
Anexo 1 – Lista de Reagentes, Lista de soluções e tampões e Protocolos de Técnicas moleculares.....	67

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 TAXONOMIA E BIOLOGIA DO TOXOPLASMA GONDII

A toxoplasmose é causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*. É uma das doenças mais comuns no homem e em outros animais de sangue quente (DUBEY e BEATTIE, 1988). Este parasita é pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia, Família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, espécie *Toxoplasma gondii* (MONTROYA 2004). Foi primeiramente descrito por NICOLLE E MANCEAUX (1908) no Instituto Pasteur de Túnis na Tunísia, em um roedor (*Ctenodactylus gundi*) da África do Sul que o descreveram inicialmente como *Leishmania gondii* e posteriormente, em 1909, como *T. gondii* (NICOLLE e MANCEAUX, 1909). No Brasil, Splendore em 1908 também isolou o parasita em um coelho de laboratório em São Paulo, classificando-o como *T. cuniculli*.

Até a década de 30 somente os estágios assexuados (merozoito e cisto tecidual) do *T. gondii* eram conhecidos. Evidências a característica coccidiana foram observadas somente no final da década de 60, revelando similaridade entre os merozoitos extra-intestinais e intestinais da *Eimeria* (TENTER et al., 2000). Apesar de ter sido identificado no começo do século XX, apenas no início da década de 70 é que foram descritos os hospedeiros definitivos e intermediários (FRENKEL et al., 1970; MILLER et al., 1972).

A disseminação da infecção no ser humano é favorecida pela alta prevalência da infecção em espécies animais domésticas e selvagens, principalmente nos suínos e ovinos (NAVARRO, et al. 1992). O risco em adquirir a infecção através do consumo de carnes cruas ou mal cozidas, fato comum em várias regiões do Brasil, é relatada por VIDOTTO et al. (1990). A toxoplasmose tem sido encontrada em várias áreas geográficas do mundo, atingindo perto de um terço da população humana (DUBEY e BEATTIE, 1988; TENTER et al., 2000). *T. gondii* é considerado um dos parasitos de melhor adaptação e entre seus hospedeiros incluem-se, vertebrados aéreos (pássaros), mamíferos marinhos (baleias e golfinhos), herbívoros e carnívoros terrestres (roedores, animais de caça, animais de produção e o homem), não possuindo restrição geográfica. (CARRUTHERS, 2002). O *T. gondii* tem sido reportado em muitos animais marinhos, o que sugere uma maior possibilidade em adquirir a toxoplasmose por meio da água marinha. (DUBEY et al. 2003).

Há três estágios de infecção do *T. gondii*: taquizoítos (livres e em grupos), bradizoítos (cistos em tecidos) e esporozoítos (oocistos) (DUBEY, 2004). O parasita é intracelular obrigatório e possui a capacidade de invadir uma enorme variedade de células, tecidos e hospedeiros (LINDSAY e CARRUTHERS, 1999), porém os gatos domésticos e felídeos selvagens são os únicos hospedeiros definitivos do parasito (FRENKEL et al., 1970), ou seja, os únicos a eliminarem oocistos pelas fezes. No epitélio intestinal dos felídeos ocorre a fase de esquizogonia. Nessa multiplicação, por gametogênese são formados os macrogametas (femininos) e microgametas (masculinos), culminando com a formação dos oocistos (DENKERS, 1999). Os gatos podem eliminar oocistos após a ingestão de taquizoítos, bradizoítos ou esporozoítos. Porém, menos de 50% dos gatos conseguem eliminar oocistos após a ingestão de taquizoítos ou oocistos comparado à ingestão de bradizoítos (DUBEY e FRENKEL, 1976).

Os oocistos são eliminados através das fezes de forma não esporulada (não infectante). A esporulação ocorre no meio ambiente entre 1 a 5 dias dependendo das condições de temperatura e umidade (DUBEY et al., 1998).

Hospedeiros intermediários, incluindo os gatos podem adquirir o *T. gondii* pela ingestão de tecidos de animais infectados com cistos, alimentos ou água contaminados com oocistos esporulados, ou por transmissão transplacentária. Após a ingestão, os bradizoítos ou esporozoítos são liberados dos cistos ou dos oocistos e invadem o tecido intestinal, transformam-se em taquizoítos, multiplicam-se localmente e se disseminam por todo o corpo por via sanguínea. Com o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro os taquizoítos encistam nos tecidos e a última geração destes dará origem aos bradizoítos, que se multiplicam lentamente após a formação de cistos teciduais. Estes cistos são evidenciados em diversos órgãos, principalmente, no sistema nervoso central (SNC), olhos, musculatura esquelética e cardíaca. Na maioria das espécies de hospedeiro intermediário estes cistos podem persistir por toda a vida (DUBEY et al. 2004 e MONTROYA, 2004).

O *T. gondii* é um eucarionte, estruturalmente, formado por uma membrana externa, anéis polares, conóide, microtúbulos, grânulos densos, micronemas, roptrias, mitocôndria, microtúbulos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático rugoso, microporo e um núcleo com parede bem definida (DUBEY, 1993; METSIS e PETERSEN, 1995). O *T. gondii* devido as suas características biológicas tais como acesso, multiplicação em grande número de hospedeiros e células tem sido utilizado como importante modelo de estudo biológico do filo Apicomplexa (ROOS et al. 1999).

## 1.2 MECANISMOS DE EVASÃO

Todos os parasitas coccidianos após a invasão colidem ao acaso com as células do hospedeiro e a penetração somente ocorre após reorientação da porção anterior do parasita com a superfície da célula parasitada (PERKINS, 1992).

Dentre os mecanismos que permitem a entrada do parasita na célula do hospedeiro estão os movimentos de contração do conóide e as secreções liberadas pelas organelas presentes no complexo apical. A invasão celular pode ocorrer de forma ativa ou por fagocitose (NICHOLS e CHIAPPINO, 1987; SETHI e PIEKARSKI, 1987; PACHECO SOARES e DE SOUZA, 2000).

A invasão da célula pelo taquizoíta é extremamente rápida, cerca de 15 a 40 segundos (SAFFER e SCHWARTZMAN, 1991; MORISAKI et al., 1995), e sofre influências da concentração de íons extracelulares, da motilidade do taquizoíta e de produtos secretados (McLEOD, et al., 1991). O processo de invasão celular do *T. gondii* é extremamente complexo e altamente coordenado, interferindo na sobrevivência do parasita na célula do hospedeiro (SAFFER et al., 1992; DUBREMETZ e SCHWARTZMAN, 1993; CARRUTHERS e SIBLEY, 1997).

Como outros parasitas intracelulares (*Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi*) a invasão bem como a saída celular do *T. gondii* é cálcio dependente (BOUCHOT et al., 1999; HOFF e CARRUTHERS, 2002).

Depois do reconhecimento e junção da porção anterior do parasita na membrana da célula do hospedeiro, formando uma área de adesão bastante firme, ocorre a protusão do conóide e a secreção ordenada das organelas do parasita (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997), que irão facilitar a penetração para o interior da célula com a formação de um vacúolo parasitóforo (VP) que não é acidificado e tão pouco se une ao lisossomo, permitindo ao parasita a sua multiplicação no interior desse vacúolo (SADAK et al., 1988; BONHOMME et al., 1990; LECORDIER et al., 1999).

A motilidade também é importante para a penetração do parasita na célula. NICHOLS e CHIAPPINO (1987) demonstraram que o conóide providencia a força mecânica para os movimentos do taquizoíta, por meio de suas rotações independentes e pelo fato dos microtúbulos estarem ancorados ao anel pré-conoidal, o que produz uma torção no corpo do *T. gondii*. A motilidade ocorre quando o pH interno é maior que o externo e envolve, provavelmente, filamento de actina, miosina e microtúbulos. Através dos movimentos, ocorre

uma junção entre as membranas citoplasmáticas do parasita e da célula do hospedeiro, que não se rompe, mas circunda todo o corpo do parasita (McLEOD et al., 1991).

Os produtos secretados pelas roptrias são mais importantes em uma fase precoce da infecção, enquanto as secreções dos grânulos densos numa fase mais posterior (LERICHE e DUBREMETZ, 1990). CARRUTHERS e SIBLEY (1997) relataram a cinética da secreção das três organelas do complexo apical, primeiro ocorre a secreção do conteúdo das micronemas e roptrias e posteriormente a dos grânulos densos.

Os eventos de secreção das micronemas ocorrem rapidamente após a ligação do parasita com a célula do hospedeiro (poucos segundos), e estas secreções não são transferidas para o VP, indicando que estas teriam importância na adesão. Logo após, na fase de penetração, as roptrias descarregam seus produtos, que estão associados a eventos precoces na formação do VP, principalmente pela ROP1. Porém, esses produtos das roptrias diminuem drasticamente da membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) após 6 horas da invasão, e finalmente as secreções dos grânulos densos só ocorrem quando o parasita já está dentro do vacúolo, com um pico máximo após 20 minutos da invasão, e elas não estão envolvidas na síntese do VP, mas na sobrevivência intracelular do *T. gondii* (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997).

KIMATA e TANABE (1987) já tinham descrito anteriormente que a MVP é uma membrana híbrida, pois proteínas migram do parasita para membrana e também descreveram uma rede intravacuolar membranosa que liga a superfície do parasita com a MVP, e que esta rede estaria relacionada à expansão do VP durante a multiplicação dos parasitas.

Os mecanismos pelos quais o parasita evita a sua destruição no VP ainda não estão totalmente esclarecidos (CAMUS et al., 1995). Sabe-se, que o parasita impede a acidificação do VP durante a sua formação (explosão aeróbica). E que as modificações que ocorrem na MVP decorrentes de proteínas do parasita, impedem a fusão com o lisossomo (KIMATA e TANABE, 1997; COPPENS et al., 1999).

A alta concentração de fosfatidilcolina e colesterol, originárias das roptrias e inseridas na MVP (FOUSSARD et al., 1991), poderiam contribuir para impedir a fusão com o lisossomo. Membranas com mais de 75% de fosfatidilcolina não se fundem com outras membranas (JOINER, 1991).

É possível que as modificações ocorridas na MVP, que impedem a fusão com o lisossomo, possam também impedir a acidificação do VP, e isto pode estar associado à exclusão ou inativação de bombas de proteínas ou canais de íons da membrana plasmática

(McLEOD et al., 1991). Com o advento da resposta imune os taquizoítos formam os bradizoítos, enquanto o VP da origem ao cisto tecidual (CAMUS et al., 1995). Os bradizoítos, dentro dos cistos teciduais, podem persistir por toda vida do hospedeiro e, reconversões ao estágio de taquizoítos podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos (LANZER et al., 1997).

### 1.3 PROTEÍNAS DO *TOXOPLASMA GONDII*

Os primeiros estudos sobre proteínas do *T. gondii* mostraram dificuldades de purificação devido a replicação intracelular e possíveis contaminações que possam ter ocorrido. Estes problemas foram solucionados por JOHNSON et al. (1981) que observaram fração solúvel do parasita com nove polipeptídeos com massa molecular variando de 20 a 133 KDa e a fração insolúvel contando com oito polipeptídeos de 28 a 80 KDa.

Três organelas secretoras estão presentes no citoplasma do *T. gondii*: as micronemas e as roptrias localizadas na porção apical e os grânulos densos localizados em superfícies apicais, laterais e posteriores. Até o momento, os conteúdos das três organelas secretoras tem sido estudados e seqüenciados de acordo com modelos de cascatas (CARRUTHERS e SIBLEY 1997; JOINER e ROSS 2002; NGO et al. 2000)

As proteínas das micronemas (MIC1-MIC11) são as primeiras a serem secretadas depois do primeiro contato com a célula hospedeira (BRECHT et al. 2001; CARRUTHERS et al. 1999; HUYNH et al. 2003). A função dessas ainda não foi totalmente estabelecida, mas por analogia com o *Plasmodium sp* estas devem ser responsáveis pela liberação de moléculas envolvidas no reconhecimento ou na junção do parasita com a célula do hospedeiro (PERKINS, 1992; DUBREMETZ et al., 1996).

Organelas de grânulos densos estão presentes em todos os parasitas do filo apicomplexa (CESBRON-DELAUW, 1994). Após a invasão do parasita a célula hospedeira e estabelecimento do vacúolo parasitóforo (VP) as proteínas contidas nos grânulos densos são liberadas. As proteínas denominadas GRA1- GRA9 são secretadas durante e após a invasão na célula hospedeira para a formação do vacúolo parasitóforo e esta secreção ocorre continuamente durante todo o desenvolvimento intracelular (DUBREMETZ e SCHWARTZMAN, 1993).

Foram descritas nove proteínas de grânulos densos do *T. gondii*; GRA 1 (22-27 KDa), GRA 2 (28-28,5 KDa), GRA 3 (30 KDa), GRA 4 (40 KDa), GRA 5 (21 KDa),

GRA 6 (32 KDa), GRA 7 (29 KDa), GRA 8 (38 KDa) e duas NTP ases, uma NT Pase I (69KDa) e NTPase II (REICHMMAN et al., 2002) sendo todas hidrofóbicas.

Essas proteínas são encontradas no espaço intravacuolar, na rede intravacuolar membranosa e na membrana do vacúolo parasitoforo (MVP) e apresentam como possíveis funções a manutenção e a maturação do VP, impedem a inibição da junção com o lisossomo e possibilitam a aquisição de nutrientes através de poros na MVP (MERCIER et al. 2002,) que são portanto fundamentais para a sobrevivência dos taquizoítos intracelularmente (TILLEY et al., 1997).

As proteínas dos grânulos densos são antígenicamente detectadas no soro por anticorpos de animais infectados. O hospedeiro é exposto às proteínas de grânulos densos quando há a secreção de antígenos das células infectadas ou quando ocorre a ruptura das células infectadas resultado de uma infecção parasitaria (FISHER et al. 1998). As formas recombinantes das proteínas de grânulos densos GRA6 e GRA7 são antígenos utilizados em técnicas de diagnóstico como ELISA para a infecção causada pelo *Neospora caninum* (CESBRON- DELAUW, 1994)

Imunologicamente, proteínas de grânulos densos são antígenos potenciais na indução de células T e B durante a infecção. Essa propriedade tem sido explorada para a vacinação em roedores utilizando proteínas secretadas nas células hospedeiras livres de *T. gondii*, proteínas purificadas ou DNA. Todos resultam em proteções parciais contra infecções letais (VERCAMMEN et al. 2000).

As proteínas das roptrias podem apresentar características ácidas e básicas. LYCK e NORBY (1966) mostraram evidências que o *T. gondii* apresenta um fator de facilitação da penetração (*Penetration enhancing factor* ou PEF) que seria uma proteína ácida e localizada nas roptrias (SCHWARTZMAN, 1986, KIMATA e TANABE, 1987).

O PEF, corresponde a ROP1, é um polipeptídeo hidrofílico de 60,5 KDa com Pi 5,8 (BONHOMME et al., 1990; LERICHE e DUBREMENTZ, 1991). SCHWARTZMAN e KRUG (1989) reconheceram a ROP1 em roptrias por meio de anticorpo monoclonal. A ROP1 associa-se a MVP durante a invasão da célula do hospedeiro (DUBREMENTZ e SCHWARTZMAN, 1993) bem como encontra-se associada a rede membranosa intravacuolar (SAM-YELLOWE, 1996).

As principais proteínas de roptrias foram identificadas como ROP1 (60,5 KDa) com Pi <6, ROP2 com 55KDa, ROP3 com 59KDa e ROP4 com 60KDa, ROP5 com 59,5KDa com Pi > 8, ROP6 com 42KDa e ROP7 com 56KDa, ROP8 com 52 KDa e

finalmente a ROP9 com 36KDa. Com exceção da ROP1 todas são hidrofóbicas (LERICHE e DUBREMENTZ, 1991; PERKINS, 1992).

A ROP2 tem como precursor uma outra proteína com massa molecular de 66 KDa (SADAK et al., 1988), que está intimamente ligada a MVP e correlacionada com outras proteínas de roptrias como a ROP 3, 4 e 7, pois compartilham determinantes antigênicos (LERICHE e DUBREMENTZ, 1991). Vários anticorpos monoclonais reagem com ROP 2 e 3, ROP 2, 3 e 4 e ROP 4 e 7, que apresentam PM similares e pH básico e, embora distintas, apresentam funções correlatas, como a interação com organelas da célula do hospedeiro (BECKERS et al., 1994). Proteínas de 66, 68 e 71 KDa são precursoras da ROP 2, ROP 4 e ROP 3, respectivamente (SADAK et al., 1988).

As funções das proteínas de roptrias têm sido discutida pelas suas características hidrofóbicas e anfipáticas, elas são hábeis em alterar a fluidez da membrana da célula do hospedeiro quando incorporadas nesta (ETZION e MURRAY, 1991), podendo também impedir a ligação com a membrana do lisossomo (FOUSSARD et al., 1991; JOINER, 1991). Algumas proteínas estão relacionadas à fase inicial da penetração do parasita, na formação da MVP e posteriormente, na sua manutenção. Outras estariam ligadas às atividades enzimáticas das próprias proteínas das roptrias, exocitose e expansão dos conteúdos das roptrias (DUBREMETZ e SCHWARZMAN, 1993).

A ROP2 é encontrada em todos os estágios do *T. gondii*, (HERION et al., 1993), porém Speer et al. (1995) estudando a cepa VEG do *T. gondii* verificaram que taquizoítos apresentavam maior quantidade de ROP 2 que os esporozoítos.

#### **1.4 RESPOSTA IMUNE**

A resposta do hospedeiro ao *T. gondii* está relacionada a resistência natural (inata) e adquirida (adaptativa). As diferenças de virulência entre as cepas do parasita são importantes na resistência do hospedeiro sendo que a base molecular dessas diferenças permanece desconhecida. Três linhagens clonais do *T. gondii* são reconhecidas e correlacionadas com a virulência do parasita. A linhagem tipo 1 esta associada a virulência na fase aguda em camundongos, a linhagem tipo 2 na indução da fase crônica e a linhagem tipo 3 é a menos virulenta (ALEXANDER e HUNTER, 1998). O número de hospedeiros acometidos pelo *T. gondii* é muito grande, contudo têm-se demonstrado que algumas espécies

(ratos e galinhas) exibem um alto grau de resistência natural. A idade é outro fator importante para a resistência natural. Onde os animais jovens, nas diferentes espécies, apresentam-se mais susceptíveis a infecção (DUBEY, 1993).

Estudos em camundongos transgênicos revelaram que a suscetibilidade pode estar vinculados a dois genes, um ligado ao H2 e outro ao H13 e, em humanos, existem evidências de que a suscetibilidade esteja associada ao locus HLA (DENKERS, 1993). Estão envolvidos ainda células exterminadoras naturais (EN) produtoras de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), que são importantes para a resistência na fase aguda da infecção e para direcionar a resposta imune adquirida.

Após a fase aguda o hospedeiro desenvolve uma boa imunidade que é duradoura e protetora para reinfecções e na fase crônica, os parasitas permanecem em cistos teciduais. Altos títulos de anticorpos específico na presença de complemento bem como citotoxicidade celular dependente de anticorpos podem lisar os parasitas extracelulares, bloqueando a invasão da célula do hospedeiro uma vez que a produção máxima de anticorpos coincide com o desaparecimento de taquizoítos viáveis (FRENKEL, 1990; WASTUNG et al., 1995).

Isoladamente a resposta humoral não é suficiente para promover proteção no hospedeiro, provavelmente devido a localização intracelular do parasita. Vários autores têm demonstrado a importância da resposta celular na imunidade do agente (FRENKEL, 1990; SHER e COFFMAN, 1992; BUXTON; 1993).

A principal porta de entrada do *T. gondii* é a via oral, sendo que nos herbívoros os oocistos são a principal via de transmissão. Portanto a imunidade local via linfócitos (principalmente linfócitos intraepiteliais que apresentam atividade CD8) e IgA são de fundamental importância na proteção contra o parasita (BOURGUIN et al. 1993; VELGE-ROUSSEL et al., 2000).

Os antígenos secretados-excretados pelo *T. gondii* têm uma função importante no estímulo de uma resposta imune, tanto na infecção aguda quanto crônica. Antígenos que estimulam células CD4 específicas estão envolvidos na imunidade duradoura em indivíduos saudáveis infectados cronicamente (SAAVEDRA et al., 1991; SAAVEDRA et al., 1996).

MARTIN et al. 1998 demonstraram que durante a infecção por toxoplasmose em humanos o antígeno ROP2 induz resposta imune humoral na fase aguda com a prevalência de imunoglobulinas como IgA e IgM.

A imunidade protetora é essencialmente associada com respostas do tipo Th1, o principal efeito está associado à proliferação de (linfócitos T e produção de interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) (GAZZINELLI et al. 1991; SUZUKI et al. 1988). Porém respostas imunes moderadas de Th2, também podem ser benéficas para o controle de fenômenos imunopatológicos de excesso de reações inflamatórias e de Th1 (GAZZINELLI et al., 1996).

## 1.5 VACINAS PARA TOXOPLASMOSE

Até o momento não existem vacinas comerciais para a toxoplasmose humana, que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (GOTTSTEIN, 1995). Para os animais existe uma única vacina comercial para uso em ovelhas (TOXOVAX<sup>®</sup>), que está disponível na Grã Bretanha e Nova Zelândia, e utiliza taquizoítos da cepa S-48, que não persistem nos tecidos dos animais, reduzindo a perda de fetos (BUXTON et al., 1993).

Nas últimas décadas houve um grande aumento no número de técnicas e pesquisas imunológicas. Para a produção de novos imunógenos. As vacinas são classificadas em três grupos, as vivas (virulentas ou atenuadas), as de subunidades e as genéticas. As vacinas de subunidades apresentam como vantagem serem incapazes de replicar no hospedeiro e de reversão de virulência, não sendo transmissíveis para outros indivíduos. As vacinas vivas normalmente estimulam tanto a resposta imune humoral quanto a celular.

As estratégias para reduzir a transmissão da toxoplasmose incluem práticas de manejo e vacinação. A vacinação tem como objetivo reduzir os danos fetais, o número de cistos teciduais, além de prevenir a formação de oocistos em felinos (DUBEY, 1996).

Atualmente tem-se trabalhado com a possibilidade da utilização de vacinas de DNA para várias doenças como a malária, criptosporidiose, leishmaniose e toxoplasmose. A primeira geração de vacinas foram aquelas que utilizam antígenos atenuados ou mortos. A segunda geração compreende as vacinas de subunidade (proteínas purificadas ou recombinantes) e as vacinas de ácido nucleico são conhecidas como de terceira geração (KALINNA, 1997).

Vacinas de DNA contra o *T. gondii* têm evoluído no uso de vários tipos de antígenos, principalmente em vacinações estratégica de mucosas, com focos em vacinações intranasais com antígenos de superfícies de *T. gondii* (SAG1). Administrações de SAG1,

purificado de lisado do parasita adicionado com o adjuvante toxina colérica. (BOURGUIN et al., 1993; DEBARD et al., 1996; VELGE-ROUSSEL et al., 2000) ou utilizando enterotoxinas como adjuvantes (BONENFANT et al., 2001) obtendo como resultados induções de T-aux. do tipo 1 nas respostas imunológicas.

VERCAMMEM et al. (2000) vacinaram camundongos com plasmídeos liberando antígenos de GRA1, GRA7 e ROP2 e verificaram um estímulo específico de células T e secreção de IFN- $\gamma$ , em cultura de baço dos animais vacinados. A taxa de sobrevivência dos animais, foi maior no grupo vacinado que no controle e número de cistos cerebrais foi significativamente menor no grupo vacinado.

FREIRE (2003) imunizou suínos com uma vacina utilizando-se de um lisado de taquizoítos do *T. gondii* incorporados ao ISCOM e, após o desafio verificou que a vacina foi capaz de estimular uma forte resposta imune humoral.

GARCIA et al. (2005) estudaram o uso de proteínas de roptrias do *T. gondii* incorporadas ao ISCOM para proteger suínos frente a um desafio utilizando oocistos e verificaram proteção parcial do grupo vacinado, quando comparado ao grupo controle positivo, contra a formação de cistos teciduais. Relatam ainda que a imunização sistêmica pela via sub-cutânea não foi eficaz em estimular proteção de mucosa intestinal.

O uso de vacinas pela via mucosa associadas a adjuvantes apropriados pode induzir resposta imune tanto local quanto sistêmica. A via nasal é mais efetiva que a imunização gástrica por promover uma imunidade mais precoce e intensa (HY e MW, 1997). Esta via requer menos antígenos para promover a imunidade do que a via oral, pois a atividade proteolítica na via nasal é muito menor que na via oral (VELGE-ROUSSEL et al., 2000).

A imunização de mucosa foi estudada por DEBARD et al. (1996) através do uso de uma vacina aplicada pela via nasal em camundongos utilizando a SAG1 adicionada de toxina colérica, e induziram uma imunidade local e sistêmica que assegurou proteção parcial e persistente contra a infecção crônica.

VELGE-ROUSSEL et al. (2000) verificaram que a transferência passiva de células linfóides de camundongos doadores, imunizados com SAG1 pela via nasal associada a toxina colérica, foi capaz de reduzir o número de cistos cerebrais quando comparados ao grupo controle.

BONENFANT et al. (2001) obtiveram proteção contra a formação de cistos cerebrais do *T. gondii* em camundongos vacinados pela via nasal e desafiados com cistos pela via oral. Eles relacionaram esta imunidade aos altos títulos de anticorpos IgG anti *T. gondii* obtidos pela vacinação da SAG1 associada a enterotoxinas como adjuvante.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial imunogênico de proteínas recombinantes do *T. gondii* administrados pela via nasal em camundongos Balb/C.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clonar os genes que codificam as proteínas GRA5, GRA7 e ROP2 de *T. gondii* em vetor de expressão de proteínas.
- Expressar e purificar as proteínas GRA5, GRA7 e ROP2 de *Toxoplasma gondii* a partir de plasmídeos recombinantes.
- Caracterizar antigênicamente as proteínas recombinantes pela técnica de Western blotting.
- Imunizar camundongos pela via nasal e avaliar a resposta imune humoral e celular, bem como a proteção contra a formação de cistos cerebrais.

### **3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO**

**Proteção imunológica contra a formação de cistos cerebrais em camundongos vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes de *Toxoplasma gondii*.**

## **Proteção imunológica contra a formação de cistos cerebrais em camundongos vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes do *Toxoplasma gondii*.**

### **Resumo**

O objetivo do trabalho foi avaliar a proteção imunológica contra a formação de cistos cerebrais em camundongos imunizados pela via intranasal com proteínas recombinantes do *Toxoplasma gondii*. As proteínas GRA5, GRA7 e ROP2 foram clonadas, expressadas e padronizadas para a imunização dos animais. Foram utilizados 30 camundongos Balb/C divididos em três grupos. O grupo 1 (G1,  $n = 11$ ), foi imunizado com duas doses (12,5  $\mu\text{g}$  de cada proteína + 0,5  $\mu\text{g}$  de toxina colérica) da vacina, o grupo 2 (G2,  $n = 11$ ) recebeu duas doses de tampão salina fosfato (PBS) + toxina colérica (0,5 $\mu\text{g}$ ) e o grupo 3 (G3,  $n = 8$ ) recebeu duas doses de PBS. As doses foram realizadas nos dias 0 e 21 do experimento. Os camundongos foram desafiados com 50 cistos teciduais da cepa VEG do *T. gondii* pela via oral no dia 33. No G1, os animais apresentaram significativa produção de IgA (ELISA indireto) após a segunda imunização com a vacina de proteínas recombinantes. A resposta celular nesse grupo foi observada pela proliferação de esplenócitos. Os animais do G1 exibiram menor formação de cistos teciduais quando comparados com o grupo controle (G3,  $p < 0,05$ ). Os resultados observados indicaram que a imunização pela via nasal em camundongos Balb/C com as proteínas recombinantes ROP2, GRA5 e GRA7 associados à toxina colérica protegeram contra a formação de cistos teciduais quando comparados ao grupo controle.

*Palavras chaves:* Proteínas recombinantes, roptrias, grânulos densos, vacina, imunização, intranasal, toxina colérica e cistos.

**Immunological protective against cerebral cysts formation in mice vaccinated with recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* by nasal route.**

**Abstract**

The purpose of this work was to evaluate protective activity against brain cyst formation in mice vaccinated with recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* by nasal route. Rhoptry and dense granule recombinant proteins of *Toxoplasma gondii* (ROP2, GRA5 and GRA7) were used in vaccine preparation. For experiment, 30 Balb/C mice were divided into three groups, group 1 (G1, vaccinated challenged,  $n = 11$ ) received two doses (12,5  $\mu\text{g}$  of each protein plus 0,5  $\mu\text{g}$  of choleric toxin) of recombinant vaccine, group 2 (G2, vaccinated challenged,  $n = 11$ ) received two doses (buffer saline phosfato - PBS plus 0,5 $\mu\text{g}$  of choleric toxin) and group 3 (G3, unvaccinated challenged,  $n = 8$ ) received two doses of PBS. Doses were performed at days 0 and 21. Mice were infected with 50 VEG strain brain cysts by oral infection at day 33. The G1 mice produced significantly immunoglobulin A (ELISA) after second dose of recombinant vaccine. A systemic cellular responses was observed by proliferation of splenocytes in response to recombinant proteins. Animals from G1 exhibited strong resistance to cysts formation in comparison with cholera toxin immunized groups controle (G2) and control group (G3,  $p < 0.05$ ). These results indicated that intranasal immunization in mice with recombinant proteins ROP2, GRA5 and GRA7 associated with cholera toxin can induce protection against tissue cysts formation after oral infection with tissue cysts of *T. gondii*.

*Key words:* Recombinant proteins, rhoptry, dense granule, vaccine, immunization, intranasal, cholera toxin and cysts.

## INTRODUÇÃO

*T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório capaz de invadir e de se multiplicar em todas as células nucleadas do hospedeiro (DUBREMETZ 1998). Este parasita é responsável por infecções primárias durante a gestação, causando doenças fetais e abortamentos tanto nos animais quanto em humanos (VERCAMMEN et al., 2000). A infecção pelo *T. gondii* se inicia geralmente na superfície da mucosa intestinal, e rapidamente se dissemina para outros tecidos do hospedeiro (DEBARD et al., 1996). Estudos com vacina contra toxoplasmose são de grande importância para a profilaxia da infecção e podem minimizar as perdas econômicas na produção animal (DUBEY, 1996).

Durante a invasão intestinal o parasita entra em contato com os enterócitos, e neste ambiente é que ocorre a primeira linha de defesa contra o parasita. Evidências indicam que secreções específicas de imunoglobulina A (IgA) podem impedir a aderência de patógenos a superfície de mucosas dos hospedeiros (MICHETTI, et al., 1992; RENEGAR, et al., 1991; WINNER et al., 1991).

As proteínas ROP2 (VERCAMMEN et al., 2000), GRA5 (TILLEY et al., 1997) e GRA7 (FERGUSON et al., 1999) estão presentes nos três estágios do parasita: esporozoíto, taquizoíto e bradizoíto. A ROP2 assim como outras proteínas de roptrias são hábeis em alterar a fluidez da membrana da célula do hospedeiro (ETZION e MURRAY, 1991), podendo também impedir a ligação com a membrana do lisossomo (FOUSSARD et al., 1991; JOINER, 1991). As proteínas de grânulos densos GRA5 e GRA7 após secretadas podem se tornar solúveis no lúmen do vacúolo parasitóforo (PV), se associarem a membrana do vacúolo parasitóforo ou a rede tubulovesicular (MERCIER, et al. 2002). Por estes fatores estas proteínas são descritas como candidatas para o uso em vacinas (VERCAMMEN et al., 2000).

O trabalho teve como objetivo imunizar camundongos pela via nasal com proteínas recombinantes do *T. gondii* e avaliar a proteção contra formação de cistos cerebrais.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras de *T. gondii***

Foram utilizadas duas amostras de *T. gondii* a RH e a VEG. A amostra RH, isolada por Sabin (1941) de uma criança com encefalite, foi utilizada para a extração do DNA, amplificação dos genes e incorporação em vetores para expressão das proteínas ROP2, GRA5 e GRA7. A amostra VEG foi utilizada no desafio experimental.

### **Animais: camundongos e coelhos**

Registrado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o nº 46/05, processo nº 27146/05.

Os princípios e os cuidados com os animais utilizados neste experimento seguiram as normas do Instituto Nacional de Saúde Humana para o uso de animais em laboratório.

### **Preparo da suspensão de taquizoítas de *T. gondii***

Para a obtenção dos taquizoítos puros da amostra RH de *T. gondii*, cinco camundongos albinos fêmeas suíços Webster, entre 45 a 60 dias (pesando entre 20g a 25g), foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítos vivos ( $10^5$ / ml) em solução fisiológica estéril, obtidos por meio de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. Quarenta e oito horas após a inoculação o exsudato foi obtido por lavagem da cavidade peritoneal com 3 ml de solução fisiológica estéril. Para a purificação dos taquizoítos a amostra foi filtrada em membrana de policarbonato (Nucleopore) com diâmetro dos poros de 3 $\mu$ m, para remover possíveis células do hospedeiro. Após a purificação, as amostras foram centrifugadas três vezes em tampão salina-fosfato (PBS), pH 7,2 e o sedimento padronizado em  $10^7$  taquizoítos /ml por contagem em câmara de Neubauer (LUNDÉN, 1995).

## Construção dos plasmídeos de expressão

A extração de DNA dos taquizoítos de *T. gondii* foi efetuada pelo Kit Qiagen segundo as orientações do fabricante, com lise de células. O material foi hidratado em TE e refrigerado durante a noite, sendo quantificado em gel de agarose e observado com luz UV em Image Master® VDS (Pharmacia Biotech) e fotografado por Fuji Film®, Thermal Imaging system. As amostras foram estocadas a -20° C até o uso. Os segmentos de DNA, das proteínas ROP2, GRA5 e GRA7 foram obtidos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes *rop2* FW(5'-CACC ATG GAA AAC TGT GCG TCG GTC-3') e RW (5'- TGC CGG TTC TCC ATC AGT TTG-3'), gene *gra5* FW(5'-CACC ATG GCG TCT GT AAA AC-G CGT C-3') , RW(5'-CTC TTC CTC GGC AAC TTC TTC-3') e *gra7* FW (5'- CACC AT GGC CCG CCG ACA CGC AAT TTT) e RW ( 5'- CTG GCG GGC ATC CTC CC) confeccionados a partir de sequências conhecidas (figura 1). Para a realização da PCR foram utilizados 2,5 µl de tampão 10 vezes concentrado, 2 µl dNTPs (0,2 mM), 20 pmol. de cada conjunto de primers, 0,25 µl da enzima taq polimerase Platinum® (Invitrogen) e 50 ng de DNA de *T. gondii* , em um volume total de 25 µl. O material foi submetido a um ciclo de 94 °C/5 minutos e ciclos específicos de anelamento para cada primer (gene *rop2* 59 °C/1 minutos com 30 ciclos , gene *gra5* 59 °C/ 1 min. 30 ciclos e o gene *gra7* 55 °C/1 min 30 ciclos). Para a reação de amplificação do DNA em moldes de clonagem, foi utilizada a enzima Pfx polimerase Platinum ® (Invitrogen) que amplifica os DNA moldes em extremidades abruptas, importante na ligação com o vetor. Para a realização do PCR foram utilizados 0,5 µl da enzima Pfx polimerase platinun (Invitrogen) e 50 ng de DNA de *T. gondii* em um volume final de 25µl. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose e cada gene da *rop2*, *gra5* e *gra7* foi utilizada na reação de clonagem.

## 5. Clonagem dos genes *rop2*, *gra5* e *gra7*, expressão em *Escherichia coli* e purificação

Os produtos de amplificação foram clonados usando o vetor pET102/D-TOPO de acordo com as recomendações do Kit de clonagem pET102 ® Directiona TOPO ® (Invitrogen, life Technologies). Cada clone foi linearizado a partir de enzimas de restrição para confirmação do tamanho esperado após a clonagem. Os plasmídeos recombinantes foram inseridos pela reação de transformação em *E. coli* TOP10 competente quimicamente. Os

clones pET102/rop2, pET102/gra5 e pET102/gra7 foram cultivados em 3,0 ml de caldo LB contendo ampicilina, com o objetivo de multiplicação dos plasmídeos, os quais, foram extraídos por extração QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol (Qiagen) seguindo orientações do fabricante. A confirmação da presença do inserto em fase de quadro de leitura para transcrição no vetor pET102 /TOPO10 foi realizada com o uso de enzima de restrição para a observação do tamanho esperado do plasmídeo linearizado. Após a confirmação da presença do inserto, uma nova reação de transformação foi realizada para a incorporação dos plasmídeos recombinantes em *E. coli* BL21 para a expressão das proteínas recombinantes.

As proteínas recombinantes devido a presença dos 6 tag de histidinas do vetor na região C- terminal podem ser purificadas por afinidade em coluna de resina de níquel (Qiagen), segundo protocolos Qiagen por condições desnaturante seguindo orientações do fabricante.

### **Produção de anticorpos policlonais**

Foram utilizados seis coelhos fêmeas da raça Nova Zelândia, machos, com 120 dias (pesando entre 1,5 kg a 2,0 kg). Os animais foram divididos em três grupos com dois coelhos cada (G1, G2 e G3). Os animais foram imunizados pela via subcutânea com 75 µg de proteína recombinante rROP2, rGRA5 e rGRA7, respectivamente.

Os animais receberam três doses de imunizações sendo a primeira dose com a emulsão do adjuvante completo de Freund's e as outras duas com emulsão de adjuvante incompleto de Freund's em intervalos de 14 dias. Seis dias após a última imunização foram realizadas colheitas de sangue sem anticoagulante por via intracardiaca para a obtenção do soro policlonal monoespecífico de cada proteína recombinante. O soro foi armazenado a -20 °C até a realização da prova de Western Blotting e Imunofluorescência Indireta

### **Reação de Imunofluorescência Indireta**

Células VERO foram cultivadas em meio RPMI 1640 em placas de 24 cavidades contendo lamínulas com 12 mm de diâmetro. As células foram infectadas com  $10^5$  taquizoítos, por 18 horas. Após a infecção as lamínulas foram lavadas (PBS) pH 7,2 fixadas com metanol (-20°C) e permeabilizada com acetona (-20 °C). Amostras de soro dos coelhos foram diluídos em 1:100 em 1% PBS/BSA (soro albumina bovino) e pipetadas em cada lamínula delimitada sobre as lâminas. As lâminas foram incubadas a 37 °C durante 60 min., em câmara úmida.

Após três lavagens com PBS pH 7,2, as lâminas foram secas e adicionadas o anticorpo secundário anti-IgG de coelho na diluição 1:900 em 1% PBS/ BSA. Após 35 min a 37 °C foram realizadas novas lavagens para remoção do conjugado livre remanescente. As lâminas, assim preparadas, foram cobertas com glicerina tamponada (pH 8,0) e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio e epifluorescência (Leica DMLB 30s).

### **Gel de poliacrilamida SDS- PAGE e Western Blotting**

As proteínas rROP2, rGRA5 e rGRA7 foram separados por eletroforese em placa vertical em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE, na concentração 12%, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram transferidas eletroforéticamente para membrana de nitrocelulose de 0,45µm de poro (Pharmacia) conforme o preconizado por Towbin (1979). Após a transferência, a membrana foi corada com *Ponceau* para testemunhar a eficiência da transferência e bloqueado com tampão de saturação (7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 140 mMNaCl ; leite desnatado a 5%; pH 7,2) por 1 h à temperatura ambiente e sob agitação lenta. O papel de nitrocelulose foi cortado em tiras para incubação com os soros (1:100) por 2 hrs e então lavadas em tampão de lavagem pH 7,2 contendo TWEEN 20 (0,05%) com intervalo de 2 min entre cada troca de tampão. O conjugado anti-IgG de coelho marcado com peroxidase (Sigma) foi diluído (1:5000) em tampão de lavagem e colocado sobre as fitas. Após 1 hora a 37 °C as tiras foram lavadas em tampão de lavagem durante 1 h à temperatura ambiente, trocando-se a solução a cada 2 min e posteriormente reveladas em solução quimioluminescencia (ECL) (Amersham Pharmacia, Biotech).

### **Imunização dos camundongos Balb/C com a vacina de proteínas recombinantes**

Foram utilizados trinta camundongos fêmeas da linhagem Balb/C entre 45 e 60 dias (pesando entre 18 a 21g) provenientes do biotério da Faculdade de Campinas (UNICAMP-SP). Os animais foram divididos em três grupos, grupos 1 e 2 (G1 e G2) com onze animais cada, grupo 3 (G3) com oito animais. Um “pool” das três proteínas (GRA5, GRA7 e ROP2) foi realizado e posteriormente liofilizado para padronização da vacina. Após a ressuspensão das proteínas em salina, os animais do G1 foram imunizados pela via nasal com 12,5µg de cada proteína recombinante do *T. gondii* adicionadas a 0,5µg de toxina colérica em um volume total de 10 µl. Os camundongos do G2 receberam PBS adicionada de 0,5µg de toxina

colérica e G3 apenas PBS, respectivamente. Todos os grupos receberam duas doses sendo a primeira no dia 0 e a segunda no dia 21 do experimento. Três camundongos do G1, G2 e G3 foram eutanizados no dia 33, para a avaliação da imunidade celular, antes de receberem o desafio, dos quais foram colhidos fragmentos do baço intestino delgado e fezes. Os camundongos restantes dos G1, G2 e G3 foram desafiados com 50 cistos teciduais da cepa de *T. gondii* VEG no dia 33, 12 dias após o último reforço. Amostras de sangue foram obtidas do plexo oftálmico, nos dias -7, 0, 32 e 47. O soro foi armazenado a -20°C até a realização da prova de ELISA e Western Blotting. Os animais foram examinados diariamente quanto a alterações clínicas.

### **Obtenção da suspensão fecal**

As amostras de fezes foram coletadas antes do desafio. As fezes dos animais foram maceradas e homogeneizadas em 1 ml de PBS pH 7,2, em seguida foram centrifugadas a para a separação da fase sólida.

### **Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG e IgA no soro, conteúdo intestinal e suspensões fecais.**

Adsorção das microplacas Nunc immunoplates (Life Technologies) foi realizada com a solução de antígenos utilizando as proteínas recombinantes ROP2, GRA5 e GRA7. Esta solução foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 na concentração de 5 µg/ml de proteínas, e distribuída em cada cavidade das microplacas e deixadas em repouso a 4° C em câmara úmida por uma noite, após a adsorção, as microplacas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (10mM TRIS-HCl e 150 mM NaCl, pH 7,5) e então bloqueadas com 200 µl de tampão de bloqueio (tampão carbonato-bicarbonato 8% de leite em pó desnatado) por 1 h. Alíquotas de soros (1:10), conteúdo intestinal (1:2) e suspensões de fezes (1:2) foram diluídos em tampão de lavagem adicionado com 5 % de leite em pó desnatado e pipetados nas cavidades (100 µl) em câmara úmida a 37 °C. Após a incubação por 1 h o soro foi retirado e adicionado 100 µl de conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase diluído 1:10000 e anti-IgA de camundongo na diluição de 1:10000 e novamente incubado por 1 h. A revelação foi realizada com 100 µl da solução de substrato cromógeno contendo 40 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%), 40 mg de OPD (*Ophenylenediamine dihydrochloride*-Sigma) e 100 ml de tampão

de substrato, depois de 15 minutos a reação foi interrompida com 50 µl de solução de ácido sulfúrico a 1%. A cada intervalo entre as soluções foram feitas três lavagens com solução de lavagem (NaCl (9,0g) e Tween 20 (0,5 ml) em 1000 ml de H<sub>2</sub>O). A densidade óptica (DO) a 490 foi medida em espectrofotômetro Titerk Multiskan (Labsystems). Os títulos de anticorpos IgG e IgA foram determinados como a maior diluição do soro, conteúdo intestinal e fecal que exibir uma absorbância de no mínimo 2 vezes a absorbância do soro controle negativo.

### **Proliferação de células esplênicas**

Os três animais do G1, G2 e G3 que foram eutanaziados antes do desafio tiveram seus baços colhidos para proliferação das células T, segundo BONENFANT et al. (2001) modificado. Esses órgãos foram lavados sobre condições estéreis e pressionados sobre uma membrana de “nylon”. Para remover os eritrócitos do baço e submetido a um choque hipotônico (0,155 M de NH<sub>4</sub>Cl pH 7,4). As células foram então suspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal bovino, HEPES (25 mM, Sigma), L-glutamina (1mM), piruvato de sódio (1mM), β-mercaptoetanol (50µM) e penicilina-estreptomicina (1mM). Foram adicionados 5 x 10<sup>5</sup> células por cavidade em triplicata em microplacas contendo 96 cavidades (Costar) em 200 µl de meio de cultura adicionado 10 µg de concanavalina A por ml como um controle positivo de proliferação e como amostras 5 e 10 µg de proteínas recombinantes. As placas foram incubadas em estufa em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 4 dias e 12 mM de MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Molecular Probe) foi adicionada no final de 18 hrs de cultura. Após 4 h de incubação a 37 °C foi adicionado as células 0,01 mM de SDS-HCl e novamente incubadas a 37 °C por 4 a 18 hrs. A contagem de células foi realizada em espectrofotômetro com absorbância de 540 nm.

### **Quantificação dos cistos cerebrais dos camundongos**

Cérebros dos camundongos foram homogenizados com pestilho em cadinho adicionados de 2 ml de PBS. De 100 µl (quatro alíquotas de 25 µl cada) foram analisadas em microscópio óptico, para enumeração dos cistos.

## **Análise Estatística**

O teste t de Student foi utilizado para averiguar diferenças estatísticas na quantificação dos cistos cerebrais e o teste exato de Fisher foi utilizado para verificar diferenças entre as taxas de sobrevivência entre os camundongos Balb/C dos grupos G1, G2 e G3.

## **RESULTADOS**

### **Construção dos plasmídeos de expressão pET102/ ROP2, pET102/GRA5 e pET102/GRA7**

Os plasmídeos recombinantes construídos a partir da clonagem dos genes ROP2 (1681pb), GRA5 (360pb) e GRA7 (716pb) em vetor de expressão pET102/D-TOPO (6315pb) podem ser observados na Figura 1.

### **Expressão e purificação das proteínas recombinantes.**

A expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* pode ser observada na Figura 2. As proteínas rROP2, rGRA5 e rGRA7 foram recuperadas em sua fração insolúvel e posteriormente purificadas. As eluições apresentaram as respectivas proteínas com tamanhos variando entre 37 e 70 kDa (Figura 2). O nível de produção de cada proteína aproximou-se de 300 a 500 µg/ml nas culturas de bactérias obtidas.

### **Caracterização antigênica das proteínas recombinantes**

As proteínas recombinantes foram reconhecidas pelo soro dos animais imunizados com rROP2, rGRA5 e rGRA7 (Figura 3). A reação dos anticorpos IgG contra rROP2 (Figura 3b) e rGRA5 (Figura 3d), evidenciou uma reação somente nas amostras de proteínas purificadas, com a presença de bandas específicas nas alturas estimadas de 70 e 36 kDa, respectivamente. Várias bandas foram observadas na reação com a GRA7 (Figura 3f). Pode ser observado a não reação das proteínas em soros pré-ímmunes e a presença de bandas específicas de cada proteína em tamanhos esperados, nas amostras de soros imunizados.

### **Reação de imunofluorescência indireta**

A reação de imunofluorescência indireta evidenciou reação com os soro policlonais mono-específicos produzidos para as proteínas recombinantes ROP2, GRA5 e GRA7, observando-se fluorescências em porções basais e apicais das células infectadas com os taquizoítos (Figura 4).

### **Avaliação da resposta imune humoral específica ( IgG e IgA) pelo ELISA**

A cinética da resposta imune humoral representada pela indução de anticorpos IgA foi avaliada (Figura 5). Nota-se que o maior nível de IgA foi verificado no grupo de animais imunizados com as proteínas recombinantes em associação a toxina colérica, no dia do desafio dos animais. A avaliação de anticorpos IgA do conteúdo intestinal e das fezes dos animais (Figura 6) mostrou títulos bem superiores nos animais do G1 quando comparados com os animais do G2 e G3. A resposta humoral representada pela produção de IgG foi avaliada (Figura 7). Os níveis desta imunoglobulina permaneceram abaixo do ponto de corte até 16 dias pós desafio.

### **Avaliação da resposta imune celular induzida pela vacinação das proteínas recombinantes.**

A Figura 8 apresenta os dados da proliferação celular dos animais do G1, G2 e G3. Verificou-se maior proliferação celular quando as células foram estimuladas com 5 $\mu$ g de “pool” de proteínas recombinantes quando comparado ao controle positivo estimulado pela concanavalina A grupo 1. Respostas celulares menos vigorosas podem ser observadas nos animais do G2 e G3.

### **Eficácia de proteção contra a formação de cistos teciduais e mortalidade**

Os animais do G1 apresentaram 58,3% de proteção contra a formação de cistos cerebrais que os animais do grupo controle (G3,  $P < 0,05$ , Figura 9). Os animais do G2 apresentaram 43% de proteção quando comparados ao grupo controle (G3,  $p < 0,10$ ). A média de cistos/ cérebro observada foi G1 média =  $299 \pm 91$ , G2 média =  $406 \pm 110$ , G3 média =  $718 \pm 330$ . Camundongos do G1 tiveram 58,3% de proteção. Não houveram diferenças

estatísticas significativas na taxa de mortalidade observada entre os camundongos do G1 (25%), G2 (37,5%) e G3 (20%) (Figura 10,  $P > 0,4$ ).

## DISCUSSÃO

Poucos trabalhos utilizando a via nasal como alternativa de imunização para toxoplasmose em camundongo foram encontrados (Debart et al., 1996; Velge-Roussel et al., 2000; Bonenfant et al., 2001; Dimier-Poisson et al., 2005). Nenhum destes, no entanto, avaliou o uso de proteínas recombinantes. Portanto, esse trabalho é o primeiro a avaliar a proteção contra formação de cistos teciduais em camundongos imunizados pela via nasal com proteínas recombinantes do *T. gondii*.

A via intranasal, requer menos antígenos que a via oral devido a menor atividade proteolítica na cavidade nasal. Essa via foi descrita como uma rota capaz de estimular a imunidade local e sistêmica em resposta a um antígeno. (VELGE-ROUSSEL et al., 2000).

As proteínas ROP2, GRA5 e GRA7 foram escolhidas para a clonagem porque são expressas nas três fases do ciclo do *T. gondii* (taquizoitos, bradizoitos e esporozoitos). Este fato torna essas proteínas candidatas ao uso em vacinas de subunidades.

O potencial imunogênico da ROP2 requer suficientes quantidades da proteína recombinante purificada por não ser considerada uma proteína abundante no *T. gondii* (JACQUET et al., 1999). A produção da proteína recombinante tem se mostrado de baixa expressão e as técnicas de solubilização tem gerado altos graus de degradação da proteína (VAN GELDER, et. al. 1993). Isso pode ser atribuído à sensibilidade dessa proteína as proteases do hospedeiro. Algumas formas de proteínas truncadas da ROP2, são expressas fusionadas com o peptídeo Cro-LacI ou com o seis resíduos de tag de histidinas (MARTIN et al. 1998; COUGHLAN et al. 1995).

A rROP2 obtida nesse trabalho teve nível de expressão bem baixo sendo encontrada sempre na fração insolúvel. Características como a alta degradabilidade foi verificada na expressão e na purificação desta proteína. Apesar da dificuldade de expressão, houve uma eficiente produção da rROP2 com um nível estimado de 220 mg em 1 litro de cultura induzida.

O vetor escolhido (pET 102) apresenta a expressão da proteína recombinante fusionada ao resíduo de His-pach (HP) thioredoxin, que melhora a solubilidade da proteína,

porém, isto pode resultar em um peso molecular superior àquele esperado para as proteínas nativas.

A reação antigênica cruzada entre famílias de proteínas de grânulos densos foi sugerida por LECORDIER et al. (1993 e 1995). Anticorpos monoclonal anti-GRA5 detectaram com similaridade de intensidade duas bandas sendo uma de 21 e outra de 32 kDa e os anticorpos contra a proteína recombinante de 32 kDa revelando uma banda única de 32 kDa. Esses resultados confirmam a existência de uma família de moléculas que compartilham determinantes antigênicos e/ou imunogênicos. Essa reação cruzada é devido a um alinhamento da seqüência primária da GRA6 (32 kDa) com a GRA5 (21kDa) mostrando 24% de identidade. Contudo na reação de Western blotting houve a presença de uma banda característica de peso molecular de 37 kDa, tamanho esperado da rGRA5 em associação ao resíduo de His-pach (HP) thioredoxin. A rGRA5 teve um nível de expressão mais alto comparado a da rROP2, sendo também sempre encontrado na fração insolúvel. Houve um nível eficiente na expressão da proteína com um nível estimado de 350 mg em 1 litro de cultura bacteriana.

A GRA7, proteína de 29 kDa, é importante para a sobrevivência intracelular do *T. gondii* (FERGUNSSON et al. 1999). No presente trabalho, a rGRA7 foi verificada na fração insolúvel, portanto, purificada em condições desnaturantes. Também foi verificado um nível de expressão baixo e um tamanho superior ao esperado (45kDa) devido a fusão com a thioredoxina. A proteína rGRA7 apresentou bandas inespecíficas o que resultou em uma quantificação elevada (630 mg/ litro) na cultura induzida.

O reconhecimento de proteínas específicas do parasita pelos anticorpos policlonais produzidos em coelhos foi demonstrado pela reação de imunofluorescência indireta em célula VERO infectadas com *T. gondii*. Observou-se uma intensa fluorescência nos taquizoítos encontrados nas células hospedeiras em reação aos três soros monoespecíficos policlonais.

Níveis significativos de IgA sérica foram detectados após a segunda dose da imunização nos animais do G1. A IgA sérica tem um importante papel no controle de bacteremias por enterobactérias, que ao invadirem a circulação são expostas a IgA sérica, e então fagocitadas pelas células de Kupffer do fígado, evitando, desta forma, septicemias (VAN EGMONT et. al., 2001). A resposta secretória intestinal de IgA é a resposta imune mais importante no controle da toxoplasmose intestinal pois esta imunoglobulina impede a infecção do parasita (BONEFANT et al., 2001).

Alguns estudos demonstraram que a IgG, juntamente com a IgA, produzida no intestino de gatos infectados atuava na diminuição da penetração dos parasitas de *T. gondii*

em fibroblastos, demonstrando assim a importância da presença dessa imunoglobulina no trato intestinal na prevenção da infecção (OMATA et al., 1997).

A resposta proliferativa das células do baço, estimuladas *in vitro* com as proteínas recombinantes rROP2, rGRA5 e rGRA7 do *T. gondii*, apresentou níveis maiores nos animais do G1 principalmente quando estimuladas com 5µg de proteínas recombinantes, o que demonstra um estímulo sistêmico do sistema imune. A imunização intranasal de camundongos com SAG1 associada à toxina colérica revelou altos níveis de proliferação de linfócitos esplênicos, o qual foi atribuído ao aumento de expressão de IL-2 e IL-5 (DEBARD et al., 1996).

Não houveram diferenças estatísticas significativas na taxa de mortalidade observada entre os camundongos dos 3 grupos. Porém a contagem dos cistos cerebrais nos camundongos sobreviventes, revelou uma relevante redução nos animais do G1 quando comparados ao grupo da toxina colérica (G2) e ao grupo controle (G3).

Da mesma forma, BOURGUIN et al. (1993) verificaram uma proteção significativa, associada ao baixo número de cistos cerebrais, em animais vacinados pela via oral com a SAG1 associada a toxina colérica comparado ao grupo controle não vacinado. Porém, estes autores usaram três doses desta vacina. Ainda, DEBARD et al. (1996) também utilizaram três doses de uma vacina contendo a proteína SAG1, obtida a partir de taquizoítos por imunoafinidade com anticorpos monoclonais, em associação com a toxina colérica para imunizar camundongos pela via nasal, e verificaram diminuição na formação de cistos teciduais ( $P < 0.01$ ).

Com esta mesma linha de pesquisa utilizando a proteína SAG1 foi obtido proteção contra a formação de cistos cerebrais de *T. gondii* em camundongos vacinados pela via nasal (BONENFANT et al., 2001). Estes resultados foram interessantes pois os autores descreveram altos níveis de IgG no soro e IgA em lavado intestinal, após estímulo de SAG1 com enterotoxinas mutantes (LTK63), porém, sem estímulo da imunidade celular tanto em linfonodos mesentéricos como em esplenócitos. Eles descreveram que três a quatro doses poderiam ser necessárias para o desenvolvimento deste tipo de imunidade.

O fato das duas imunizações não terem produzido níveis de IgG detectáveis no ELISA indireto pode estar correlacionado ao uso de apenas duas doses do imunógeno, porém, esta suspeita necessita ainda de maiores investigações. Em gatos tem sido descrito correlações imperfeitas entre a imunidade intestinal para o *T. gondii* e o nível de IgG sérico (DUBEY & FRENKEL, 1972; FRENKEL et al., 1991). Alguns gatos podem desenvolver um ciclo enteroepitelial se tornarem imunes para a re-eliminação de oocistos sem desenvolver

anticorpos séricos. A infecção de taquizoítos pela via sistêmica gera uma produção de altos níveis de IgG no sangue, no entanto, não impedem a eliminação de oocistos por gatos (FRENKEL et al., 1991; FREIRE et al., 1993)

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam a necessidade de se estudar a via nasal como opção de imunização. Principalmente porque a principal porta de entrada do *T. gondii* nos hospedeiros é a mucosa intestinal e a primeira barreira contra o parasita é a imunidade aí localizada.

## **CONCLUSÃO**

Camundongos Balb/C imunizados pela via nasal com as proteínas recombinantes rROP2, rGRA5 e rGRA7 associados a toxina colérica apresentaram redução significativa de cistos cerebrais quando comparados aos animais do grupo controle negativo.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

BOURGUIN, I.; CHARDES, T.; BOUT, D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhances protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 2082-2088, 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for teh quantation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analogy Biochemistry**,v.72, n.7, p. 248-254, 1976.

BONENFANT, C.; DIMIER-POISSON, I.; VELGE-ROUSSEL, F.; BUZONI-GATEL, D.; RAPPUOLI, R.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605-1612, 2001.

COUGHLAN, S. N.; SAMAN, S.; JACOBS, D.; MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW. M. F.; TREES, S. J. Cellular and humoral immune response to recombinant antigens in sheep infected with *Toxoplasma gondii*. **Parasite Immunology**, v. 17, p. 465-468, 1995.

DEBARD, N. D.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2158-2166, 1996.

DIMIER-POISSON, I.; ALINE, F.; BOUT, D.; MEVELEC, M. N. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by immunization with *Toxoplasma gondii* RNA. **Vaccine**, in press, 2005.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cysts-induced toxoplasmosis in cats. **Journal Protozoology**, v. 19, p. 155-177, 1972.

DUBREMETZ, J. F.; Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Trends Microbiol**, v. 6, p. 27-30, 1998

DUBEY, J.P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology** v. 64, p. 65-70, 1996.

ETZION, Z.; MURRAY, C. M., Isolation and characterization of rhoptries of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 47, p. 51-62, 1991.

FERGUSON, D. J.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; DUBREMETZ, J. F.; WRIGHT, S. E. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in exoenteric (tachyzoite,bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 119, p. 259-265, 1999.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis in humans beings. **Journal of American Veterinary Association**, v. 196, n. 2, p. 240-248, 1991.

FREYRE, A.; CHOROMANSKI, L.; FICHBACK, J. L.; POPIEL, I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 79, p. 716-719, 1993.

FOUSSARD, F.; LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. **Parasitology**, v. 102, p. 367-370, 1991.

GELDER, V.; BOSMAM, P.; MEUTER, D. F.; HEUVERSWYN, H.; HÉRION, P. Sodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli* . **Journal Clinical Microbiology**, v. 31, p. 9-15, 1993

JACQUET, A.; DAMINET, V.; HAUMONT, M.; GARCIA, L.; CHAUDOIR, S.; BOLLEN, A.; BIEMANS, R. Expression of a recombinant *Toxoplasma gondii* ROP2 fragment as fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. **Protein expression and purification**, v. 17, p. 392-400, 1999.

JOINER, K. A Rhoptry lipids and parasitophorous vacuole formation: a slippery issue. **Parasitology Today**, v.7, n.9, p.226-227, 1991.

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

LECORDIER, L.; MERCIER, C.; TORPIER, G.; TOURVIEILLE, B.; DARCY, F.; LIU, J. L.; MAES, P.; TARTAR, A; CAPRON, A; CESBRON-DELAUW, M. F. Molecular structure of *Toxoplasma gondii* dense granule antigen (GRA5) associated with the parasitophorous vacuole membrane. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 59, n. 1, p. 143-153, 1993.

LECODIER, L.; MOLEON-BORODOWSKY, I.; DUBREMETZ, J. F.; TOURVIEILLE, B.; MERCIER, C.; DESLLE, D., CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 70, p. 85-94, 1995.

MARTIN, V.; ARCAVI, M.; SANTILLAN, G.; AMENDOEIRA, M. R. R.; DE SOUSA NEVES, E.; GRIEMBERG, G.; GUARNERA, E.; GARBERI, J. C.; ANGEL, S. O. Detection of human *Toxoplasma*-specific immunoglobulins A, M e G with a recombinant *toxoplasma gondii* rop2 protein. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 627-631, 1998.

MERCIER, C.; DUBREMETZ, J.F.; RAUSHER, B.; LECORDIER, L.; SIBLEY, M. F.; CESBRON-DELAUW. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. **Molecular Biology Cell**, v. 13, p. 2397-2409, 2002.

MICHETTI, P.; MAHAN, M. J.; SLAUCH, J. J.; MEKALANOS, AND NEUTRA, M. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1786-1792, 1992.

RENEGAR, K. B.; AND SMALL, P. A. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. **Journal Immunology**, v. 146, p. 1972-1978, 1991.

OMATA, Y.; TERADA, K.; TAKA, A.; ISAMIDA, T.; KANDA, M. & SAITO, A. Positive evidence that anti-*Toxoplasma gondii* IgA antibody exists in the intestinal tract of infect cats and exerts protective activity against infection. **Veterinary Parasitology**, v. 73, p. 1-11, 1997.

TILLEY, M.; FICHERA, M. E.; JEROME, M. E.; ROSS, D. S.; WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. **Infection and Immunity**, p. 4598-4605, 1997.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J., Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VAN EGMONT, M.; DAMEM, C. A.; VAN SPRIEL, A. B.; VIDARSSON, G.; VAN GARDEREM, E. & VAN WINKEL, J. G. IgA and the IgA Fc receptor. **Trends immunol.** P. 22, p. 205-211, 2001.

VAN GELDER, P.; BOSMAN, F.; DE MEUTER, F.; VAN HEUVERSWYN, H.; HÉRION, P. Sorodiagnosis of toxoplasmosis by using a recombinant form of the 54-kilodalton rhoptry antigen expressed in *Escherichia coli*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 31, p. 9-15, 1993.

VELGE-ROUSSEL, F.; MARCELO, P.; LEPAGE, A. C.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. T. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969-972, 2000.

WINNER, L.; MACK, III. J.; WELTZIN, J. J.; MEKALANOS, J. P.; KRAEHENBUHL, AND NEUTRA, M. R. New model for analysis of mucosal immunity: intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 977-982, 1991.

#### 4 CONCLUSÕES

- Imunização nasal com as proteínas recombinantes rROP2, rGRA5 e rGRA7 associado a toxina colérica, produz uma proteção significativa em modelos experimentais de camundongos, na diminuição cistos teciduais dos animais imunizados.
- Uso de proteínas recombinantes associado a toxina colérica por via nasal induz a produção de imunoglobulina IgA, no soro de camundongos.
- Uso de proteínas recombinantes associado a toxina colérica induziram alto nível de IgA em conteúdo intestinal e excreções fecais, evidenciando forte imunidade de mucosas.
- Houve proliferação quantitativa de células esplênicas *in vitro* estimuladas pelas proteínas recombinantes no grupo imunizado com a vacina. Concluindo dessa maneira a presença de uma resposta imune humoral e celular.

## REFERÊNCIAS

ALEXANDER, J.; HUNTER, C. A. Immunoregulating during toxoplasmosis. In: LIEW, F.Y.; FEG, C. (eds) **Immunology of intracellular Parasitism**. v. 70, p. 81-102, 1998

BECKERS, C. J. M.; DUBREMETZ, J. F.; MERCEREAU-PUIJALON, O.; JOINER, K. A. The *Toxoplasma gondii* rhoptry protein ROP2 is inserted into the parasitophorous vacuole membrane, surrounding the intracellular parasite, and is exposed to the host cell cytoplasm. **Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 4, p. 947-961, 1994.

BONENFANT, C.; DIMIER-POISSON, I.; VELGE-ROUSSEL, F.; BUZONI-GATEL, D.; RAPPUOLI, R.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605-1612, 2001.

BONHOMME, A.; BOULANGER, F.; BHARADWAJ, L. M.; PUYGAUTHIER-TOUBAS, D.; BONHOMME, P.; PLUOT, M.; PINON, J. M. *Toxoplasma gondii*: immunocytochemistry of four immunodominant antigens with monoclonal antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 71, p. 439-451, 1990.

BOUCHOT, A.; ZIEROLD, K.; BONHOMME, A.; KILIAN, L.; BELLONI, A.; BALOSSIER, G.; PINON, JM.; BONHOMME, P. Tachyzoite calcium changes during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 85, p. 809-818, 1999.

BOURGUIN, I.; CHARDES, T.; BOUT, D. Oral immunization with *Toxoplasma gondii* antigens in association with cholera toxin induces enhances protective and cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 5, p. 2082-2088, 1993.

BUXTON, D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitology Today**, v. 9, n. 9, p. 335-337, 1993.

CAREY, K. L.; DONAHUE, C. G.; WARD, G. E. Identification and molecular characterization of GRA 8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 105, p. 25-37, 2000.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, n. 2, p. 114-123, 1997.

CARRUTHERS, V. B.; MORENO, S. N.; SIBLEY, L. D. Ethanol and acetaldehyde elevate intracellular  $[Ca^{2+}]$  and stimulate microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. **Biochemical Journal**, v. 342, p. 379-386, 1999.

CESBRON-DELAUW, M. F. Dense granule organelles of *Toxoplasma gondii*: their role in the host-parasite relationship. **Parasitology Today**, v. 10, n. 8, p. 293-296, 1994.

COPPENS, I.; ANDRIES, M.; LIU, J. L.; CESBRON-DELAUW. Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. **European Journal of Cell Biology**, v. 78, p. 463-472, 1999.

DEBARD, N. D.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. **Infection and Immunity**, v. 64, p. 2158-2166, 1996.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T.; MARTIN, P.; SHER, A. Emergence of NK1.1+ cell as effector of INF- $\gamma$  dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I – deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, p. 1465-72, 1993.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. In KRIER, J.P. **Parasitic Protozoa**, p. 1-157, 1998.

DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. **Veterinary Parasitology**, v. 74, p. 75-77, 1998.

DUBEY, J. P.; LUNNEY, J. K.; SHEN, S. K.; KWOK, O. C. H. Immunity to toxoplasmosis in pigs fed irradiated *Toxoplasma gondii* oocysts. **Journal Parasitology**, v. 84, p. 749-752, 1998.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, p. 65-70, 1996.

DUBREMETZ, J. F.; SCHWARTZMAN, J. D. Subcellular organelles of *Toxoplasma gondii* and host cell invasion. **Research In Immunology**, v. 144, n. 1, p. 31-33, 1993.

ETZION, Z.; MURRAY, C. M., Isolation and characterization of rhoptries of *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 47, p.51-62, 1991.

FISHER, H-G.; STACHELHAUS, S.; SAHM, M.; MEYER, H.; REICHMANN, G. GRA7, na excretory 29 KDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, p. 251-262, 1998.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stage identified as coccidia oocysts. **Science**, v. 167, p. 893-896, 1970.

FREIRE, R. L.; NAVARRO, I. T.; BRACARENSE, A. P. R. L.; GENNARI, S. M. Vaccination of pigs with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated in immunostimulation complexes (ISCOM). **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 388-396, 2003.

FRENKEL, J. K. Transmission of toxoplasmosis and the role of immunity in limiting transmission and illness. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 2, p. 233-240, 1990.

FOUSSARD, F.; LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Characterization of the lipid content of *Toxoplasma gondii* rhoptries. **Parasitology**, v. 102, p. 367-370, 1991.

GARCIA, J. L.; GENNARI, S. M.; NAVARRO, I. T.; MACHADO, R. Z.; SINHORINI, I. L.; FREIRE, R. L.; MARANA, E. R. M.; TSUISUI, V.; CANTENTE, A. P. A.; BEGALE, L. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 129, p. 209-217, 2005.

GOTTSTEIN, B. *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Medical Wochenschr.**, v.65, p. 89S-95S, 1995.

HÉRION, P.; HERNANDEZ-PANDO, R.; DUBREMETZ, J-F.; SAAVEDRA, R. Subcellular localization of the 54-KDa antigen of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 2, p. 216-222, 1993.

HOFF, E. F.; CARRUTHERS, V. B. Is *Toxoplasma* egress the first step in invasion? **TRENDS in Parasitology**, v. 18, n. 6, p. 251-255, 2002.

JOHNSON, A. M.; McDONALD, P. J.; NEOH, S. H. Molecular weight analysis of the major polypeptides and glycopeptides of *Toxoplasma gondii*. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v. 100, p. 934-943, 1981.

KALINNA, B. H. DNA vaccines for parasitic infections. **Immunology And Cell Biology**, v. 75, n. 4, p. 370-375, 1997.

KIMATA, I.; TANABE, K. Secretion by *Toxoplasma gondii* of na antigen that appears to become associated with the parasitophorous vacuole membrane upon invasion of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 88, p. 231-239, 1897.

LANZER, M.; GROSS, U.; MOLL, H. Mechanisms of parasite persistence and immune evasion. **Parasitology Today**, v. 13, n. 1, p. 1-2, 1997.

LECORDIER, L.; MERCIER, C.; SIBLEY, L.D.; CESBRON-DELAUW. Transmembrane insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 protein occurs after soluble secretion into the host cell. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 1277-1287, 1999.

LERICHE, M. A.; DUBREMETZ, J. F. Exocytosis of *Toxoplasma gondii* dense granules into the parasitophorous vacuole after host cell invasion. **Parasitology Research**, v. 76, p. 559-562, 1990.

LINDSAY, D. S.; BLAGBURN, B. L.; DUBEY, J. P. Infection of mice with *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) does not protect against challenge with *Toxoplasma gondii*. **Infectious and Immunity**, v. 58, n. 8, p. 2699-2700, 1990.

McLEOD, R.; MACK, D.; BROWN, C. *Toxoplasma gondii* – new advances in cellular and molecular biology. **Experimental Parasitology**, v. 72, p. 109-121, 1991.

MERCIER, C.; LECORDIER, L.; DARCY, F.; DESLEE, D.; MURRAY, A.; TOURVIEILLE, B.; MAES, P.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. Molecular characterization of a dense granule antigen (Gra2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 71-82, 1993.

METSIS, A.; PETTSERSEN, E. *Toxoplasma gondii*: characterization of a monoclonal antibody recognizing antigens of 36 and 38 Kda with acid phosphatase activity located in dense granules and rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 81, n. 4, p. 472-479, 1995.

MILLER, N. L.; FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P. Oral infections with *Toxoplasma* cysts and oocysts in felines, other mammals and birds. **Journal Parasitology**, v. 58, p. 928-937, 1972.

MORISAKI, J. H.; HEUSER, J. E.; SIBLEY, L. D. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2457-2464, 1995.

NAVARRO, I. T.; VIDOTTO, O.; GIRALDI, N.; FREIRE, R.L. *Toxoplasma gondii*: Isolamento a partir de carne e cérebro de suínos comercializados na região de Londrina, Pr. **Semina**, v. 13, p. 15-18, 1992.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisme voisins) du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 147, p. 736-766, 1908.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur un protozoaire nouveau du gondi. **Compte Rendu Hygiene Academic Science Paris**, v. 148, p. 369-372, 1909.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L. Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. **Journal Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 217-226, 1987.

PACHECO-SOARES, C.; DE SOUZA, W. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 86, n. 1, p. 11-17, 2000.

PERKINS, M. E. Rhoptry organelles of Apicomplexa parasites. **Parasitology Today**, v. 8, n. 1, p. 28-32, 1992.

REICHMANN, G.; DLUGONSKA, H.; FISHER, H.G. Characterization of TgROP9 (p36), a novel rhoptry protein of *Toxoplasma gondii* tachyzoites identified by T cell clone. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 119, p. 43-54, 2002.

ROOS, D. S.; CRAWFORD, M. J.; DONALD, R. G.; FOHL, L. M.; HAGER, K. M.; KISSINGER, J. C.; REYNOLDS, M. G.; STRIEPEN, B.; SULLIVAN, W. J. Transport and trafficking: *Toxoplasma* as a model for *Plasmodium*. Novartis Found. Symp. v. 226, p. 176-198, 1999.

SAAVEDRA, R.; BECERILL, M. A.; DUBEAUX, C.; LIPPENS, R.; DE VOS, M. J.; HÉRION, P.; BOLLEN, A. Epitopes recognized by human T lymphocytes in the ROP 2 protein antigen of *Toxoplasma gondii*. **Infectious and Immunity**, v. 64, p. 3858-3862, 1996.

SAAVEDRA, R.; DE MEUTER, F.; DECOURT, J. L.; HERION, P. Human T-cell clone identifies a potentially protective 54-KDa protein antigen of *Toxoplasma gondii* cloned and expressed in *Escherichia coli*. **Journal Immunology**, v. 147, p. 1975-1982, 1991.

SAAVEDRA, R.; HERION, P. Human T-cell clones against *Toxoplasma gondii*: production of interferon gamma, interleukin 2 and strain cross reactivity. **Parasitology Research**, v. 77, p. 379-385, 1991.

SADAK, A.; TAGHY, Z.; FORTIER, B. and DUBREMETZ, J.F. Characterization of a family of rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biochemical Parasitology** v. 29, p. 203-212, 1988.

SAFFER, L. D.; MERCEREAU-PUIJALON, O; DUBREMETZ, J. F.; SCHWARTZMAN, J. D. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. **Journal of Protozoology**, v. 39, n. 4, p. 526-530, 1992.

SAFFER, L. D.; SCHWARTZMAN, J. D. A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. **Journal Protozoology**, v. 38, n. 5, p. 454-460, 1991.

SAM-YELLOWE, T. Y. Rhoptry organelles of the Apicomplexa: their role in host cell invasion and intracellular survival. **Parasitology Today**, v. 12, n. 8, p. 308-316, 1996.

SETHI, K. K.; PIEKARSKI, G. Immunological aspects of toxoplasmosis. In: SOULSBY, E. J. L. Immune responses in **Parasitic infectious: immunology; immunopathology and immunoprophylaxis**. v. 3, 1987.

SIBLEY, L. D.; SHARMA, S. D. Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 2137-2141, 1987.

SIBLEY, L. D.; KRANENBUHL, J. L. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 KDa protein. **European Journal of Cell Biology**, v. 47, p. 81-87, 1988.

SHER, A. COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annu Veterinary Immunology**, v. 10, p. 385-409, 1992.

SPEER, C. A.; TILLEY, M; TEMPLE, M.E.; BLIXT, J.A.; DUBEY, J.P.; WHITE, M. W. Sporozoites of *Toxoplasma gondii* lack dense granule protein GRA3 and form a unique parasitophorous vacuole. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 75-86, 1995.

SCHWARTZMAN, J. D. Inhibition of a penetration-enhancing factor of *Toxoplasma gondii* by monoclonal antibodies specific for rhoptries. **Infection and Immunity**, v. 51, p. 760-764, 1986.

SCHWARTZMAN, J. D.; KRUG, E. C. *Toxoplasma gondii*: characterization of monoclonal antibodies that recognize rhoptries. **Experimental Parasitology**, v. 68, p. 74-82, 1989.

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

TILLEY, M.; FICHERA, M. E.; JEROME, M. E.; ROSS, D. S.; WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. **Infection and Immunity**, p. 4598-4605, 1997.

VELGE-ROUSSEL, F.; MARCELO, P.; LEPAGE, A. C.; BUZONI-GATEL, D.; BOUT, D. T. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969-972, 2000.

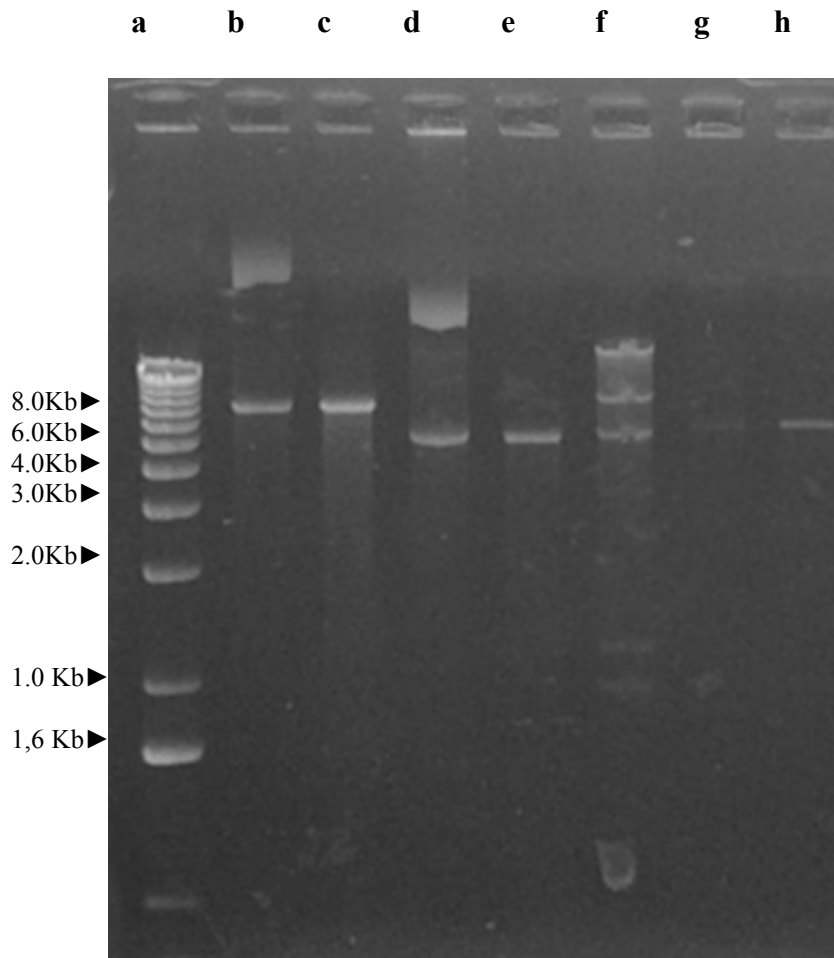
VERCAMMEN, M.; SCORZA, T.; HUYGEN, K.; DE BRAEKELEER, J.; DIET, R.; JACOBS, D.; SAMAN, E.; VERSCHUEREN, H. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, p.38-45, 2000.

VIDOTTO, O.; NAVARRO, I. T.; GIRALDI, N.; FREIRE, R. L.; MITSUKA, R. Estudos epidemiológicos da toxoplasmose em suínos da região de Londrina –Pr. **Semina**, v. 11, n. 1, p. 53-59, 1990

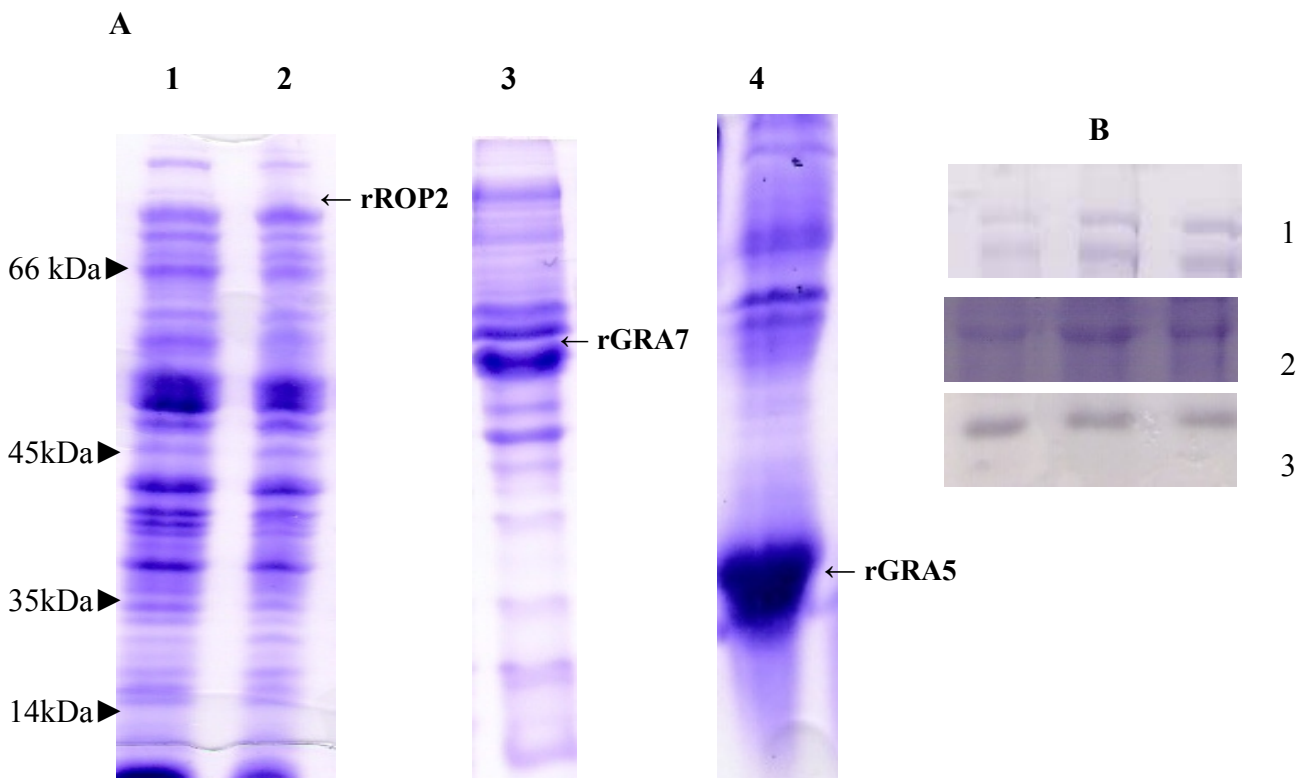
WASTUNG, J. M.; HARKINS, D.; MALEY, S.; INNES, E.; PANTON, W.; THOMSON, K.; BUXTON, D. Kinetics of the local and systemic antibody response to primary and secondary infection with S48 *Toxoplasma gondii* in sheep. **Journal Compendion Pathology**, v. 112, p. 53-62, 1995.

## APÊNDICES

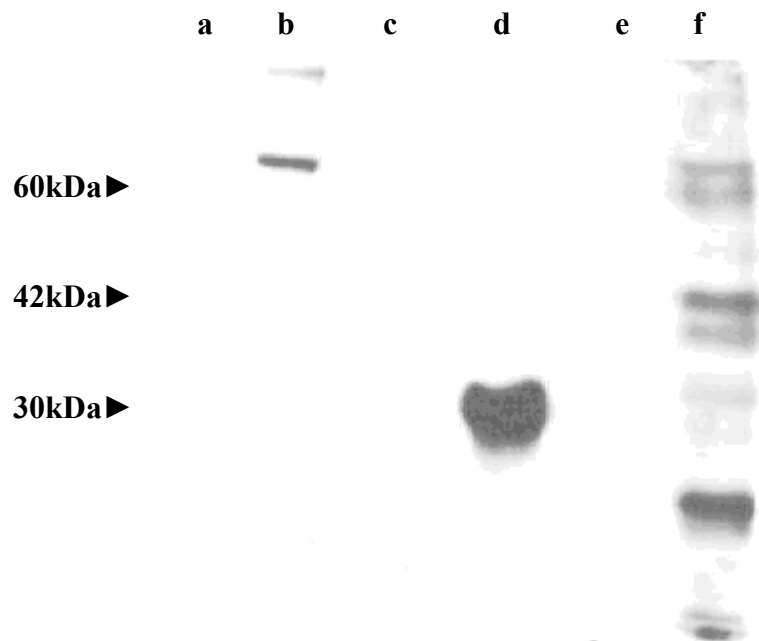
**Apêndice A**  
**Documentação fotográfica**



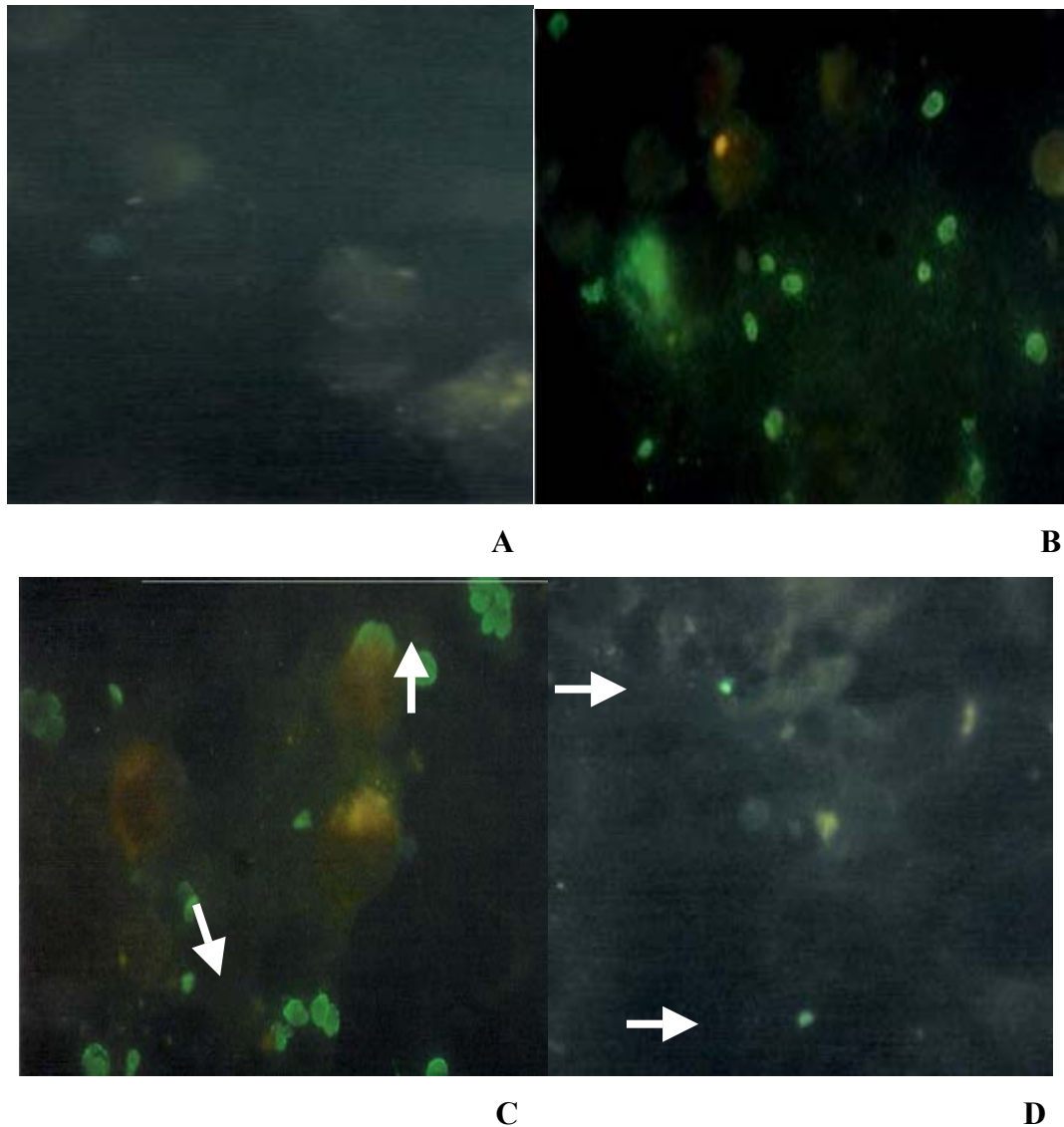
**Figura 1** - Construção dos plasmídeos recombinantes e clivagem com enzimas de restrição em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Os seguintes vetores clonados são verificados pET102/ ROP2 (b); pET102/ GRA5 (d) e pET102/GRA7 (g). Estes vetores foram respectivamente clivados com Hind III (c) BamHI (e) e BamHI (h) exibindo tamanhos esperados de 7.996 Kb, 6.675 Kb e 7.031 Kb respectivamente. Os marcadores moleculares (a) bem como  $\lambda$ hind (f) são observados.



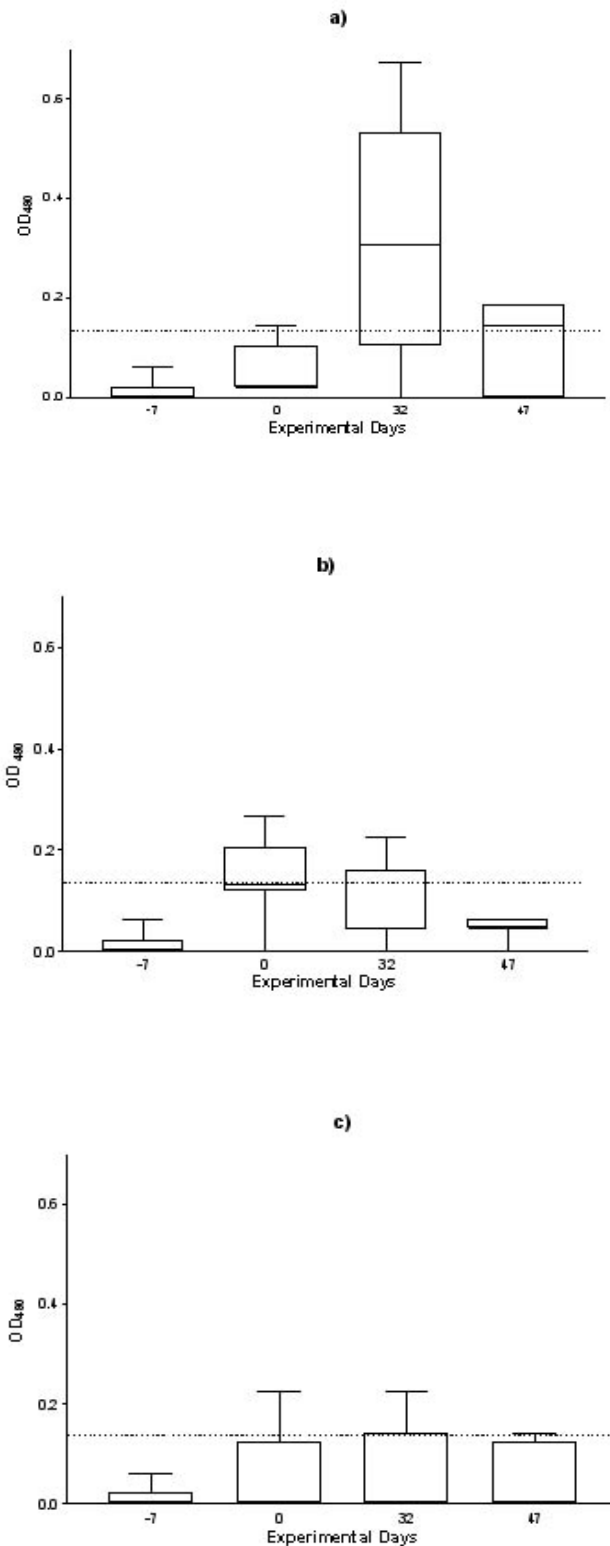
**Figura 2** - Expressões das proteínas recombinantes em *Escherichia coli* analisadas em gel SDS-PAGE 12% corada com comassie blue. Em (A) são verificadas as proteínas expressas em BL21/pET102 após estímulo com IPTG (2, 3 e 4). A BL21 star pura foi utilizada como controle da reação (A). A purificação das proteínas foi realizada por eluições em colunas contendo resina de níquel (B). Proteínas purificadas ROP2 (B1), GRA7 (B2) e GRA5 (B3). A esquerda da figura são apresentados os padrões de peso molecular.



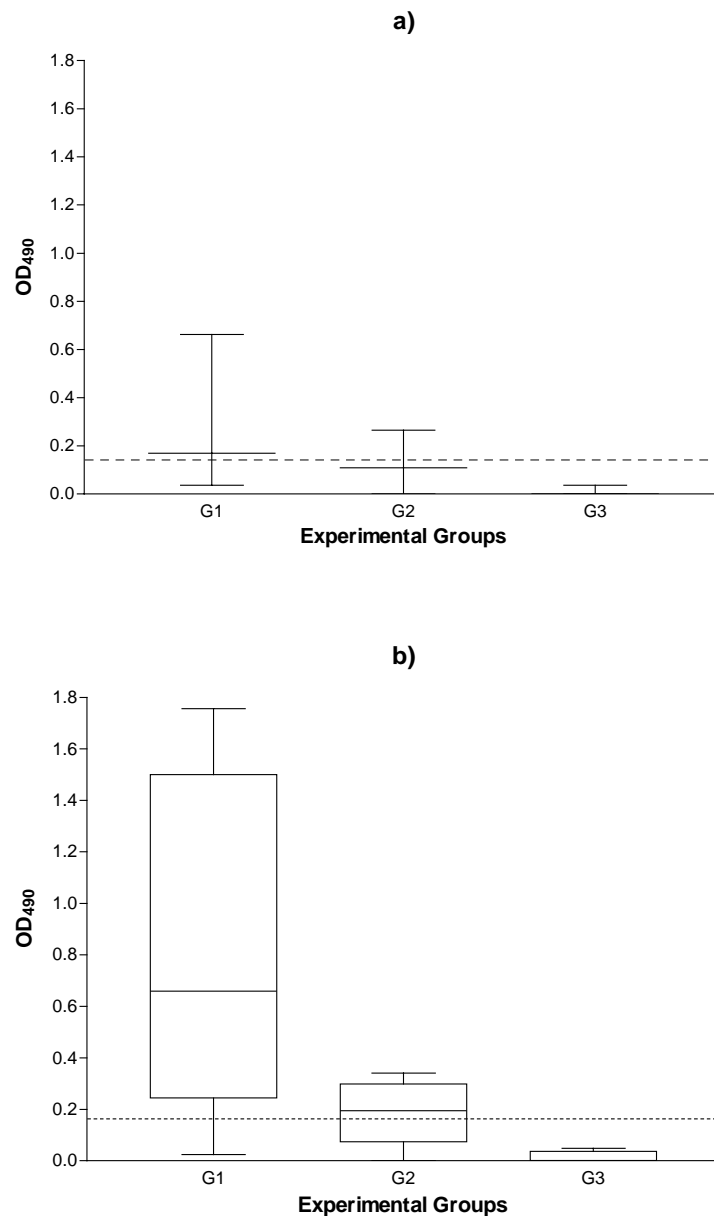
**Figura 3** - Caracterização antigênica das proteínas rROP2, rGRA5 e rGRA7 por reação de Western blotting com soro policlonal de coelhos. As proteínas recombinantes purificadas foram submetidas à reação com soro pré-imune (a, c, e,) e soro pós-imune (b, d, f) de coelhos imunizados com as proteínas recombinantes. A rROP2 é verificada em (a) e (b); a rGRA5 em (c) e (d), e a GRA7 em (e) e (f).



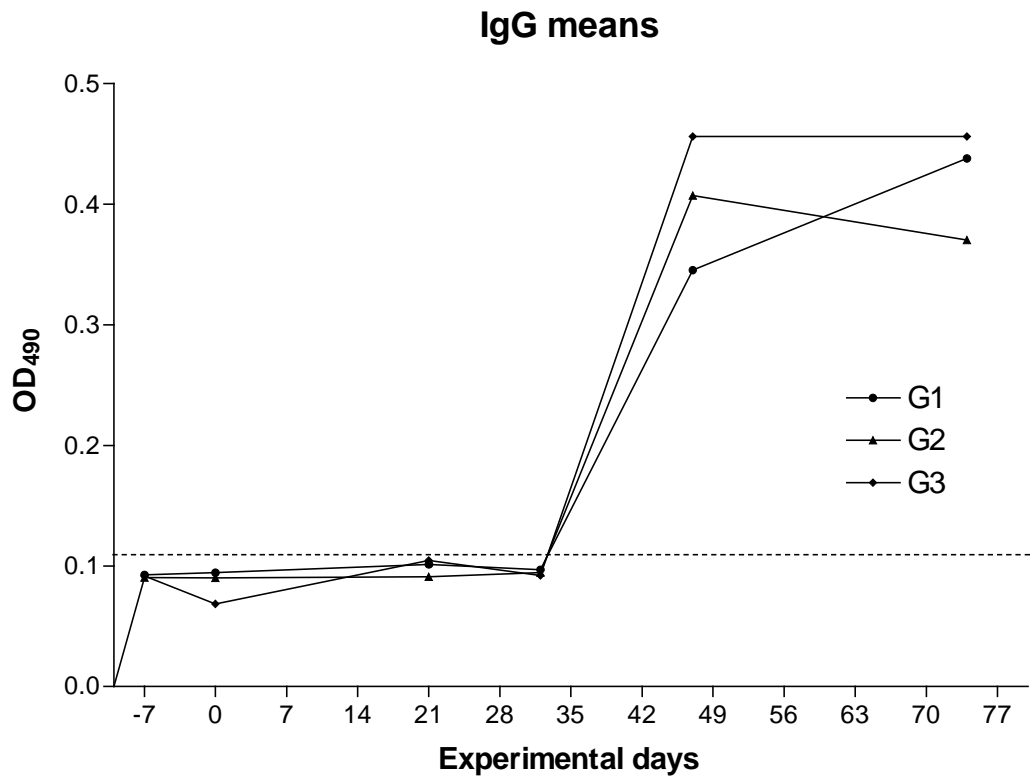
**Figura 4** - Reação de imunofluorescência indireta em células VERO infectadas com taquizoítos de *T. gondii*. As reações foram realizadas da seguinte forma: “pool” de soros de coelhos negativos para *T. gondii*, controle negativo (A); “pool” de soros de camundongos positivos para *T. gondii*, controle positivo(B); “pool” de soros de coelhos inoculados com as proteína rGRA5 (C) e rGRA7 (D) purificadas. (C) Localização intracelular de taquizoítos em reação com anti-rGRA5. (D) Visualização específicas de grânulos densos dos taquizoítos infectando células VERO.



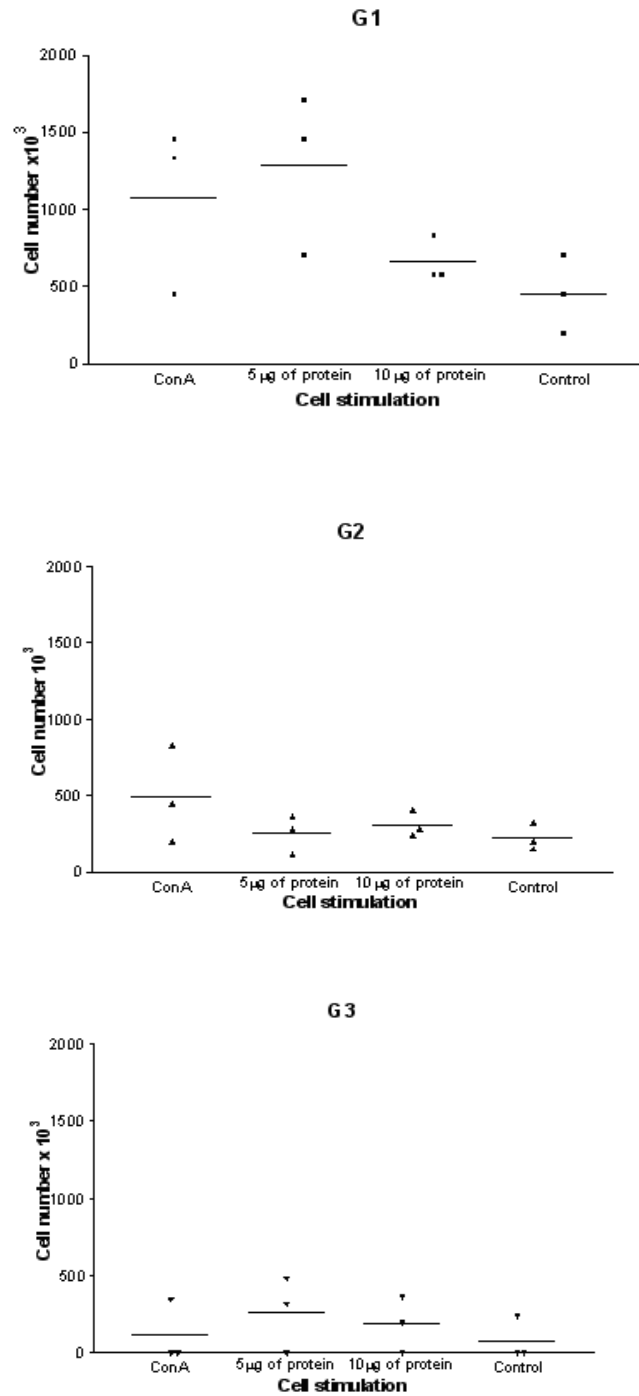
**Figura 5** - Dosagem de IgA no soro de camundongos inoculados pela via nasal com proteínas recombinantes do *T. gondii* (GRA5, GRA7 e ROP2), a) Grupo 1 (proteínas recombinantes associado a toxina colérica), b) Grupo 2 (somente toxina colérica) e c) Grupo 3 (salina). A linha pontilhada é o ponto de corte (DO = 0,166). As DOs foram corrigidas:  $DO_{corr} = \text{média das DOs da amostra} - \text{média das DOs do controle negativo} / \text{média das DOs do controle positivo} - \text{média das DOs do controle negativo}$



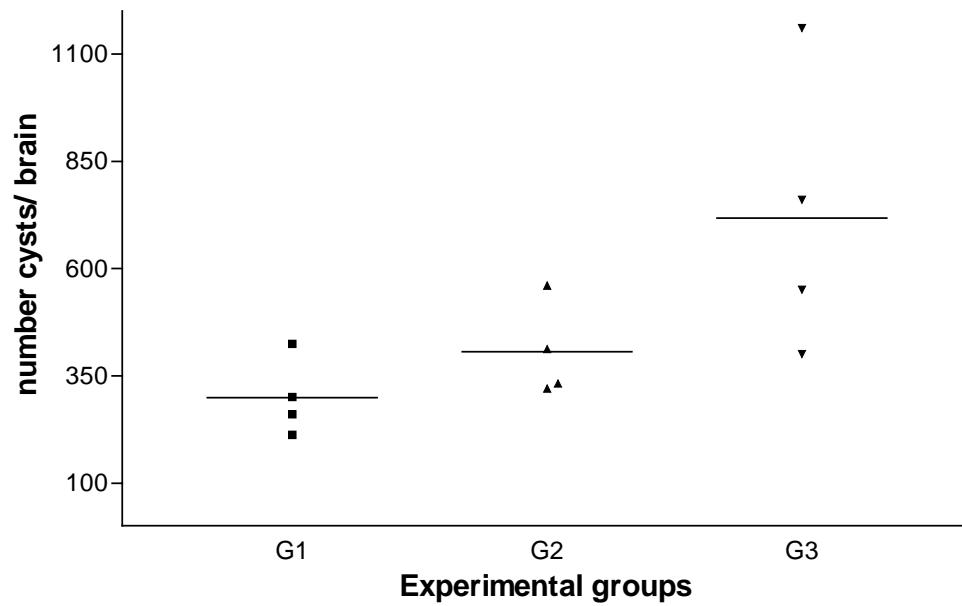
**Figura 6** - Dosagem de IgA do conteúdo do intestino delgado (a, n=3) e das fezes (b, n= 8) de camundongos (no dia do desafio) vacinados pela via nasal com proteínas recombinantes (GRA5, GRA7 e ROP2) do *T. gondii*. Grupo 1 (proteínas recombinantes com toxina colérica , b) Grupo 2 (toxina colérica) e c) Grupo 3 (salina). Linha pontilhada é o ponto de corte (DO = 0,142). As DOs foram corrigidas:  $DO_{corr} = \text{média das DOs da amostra} - \text{média das DOs do controle negativo} / \text{média das DOs do controle positivo} - \text{média das DOs do controle negativo}$



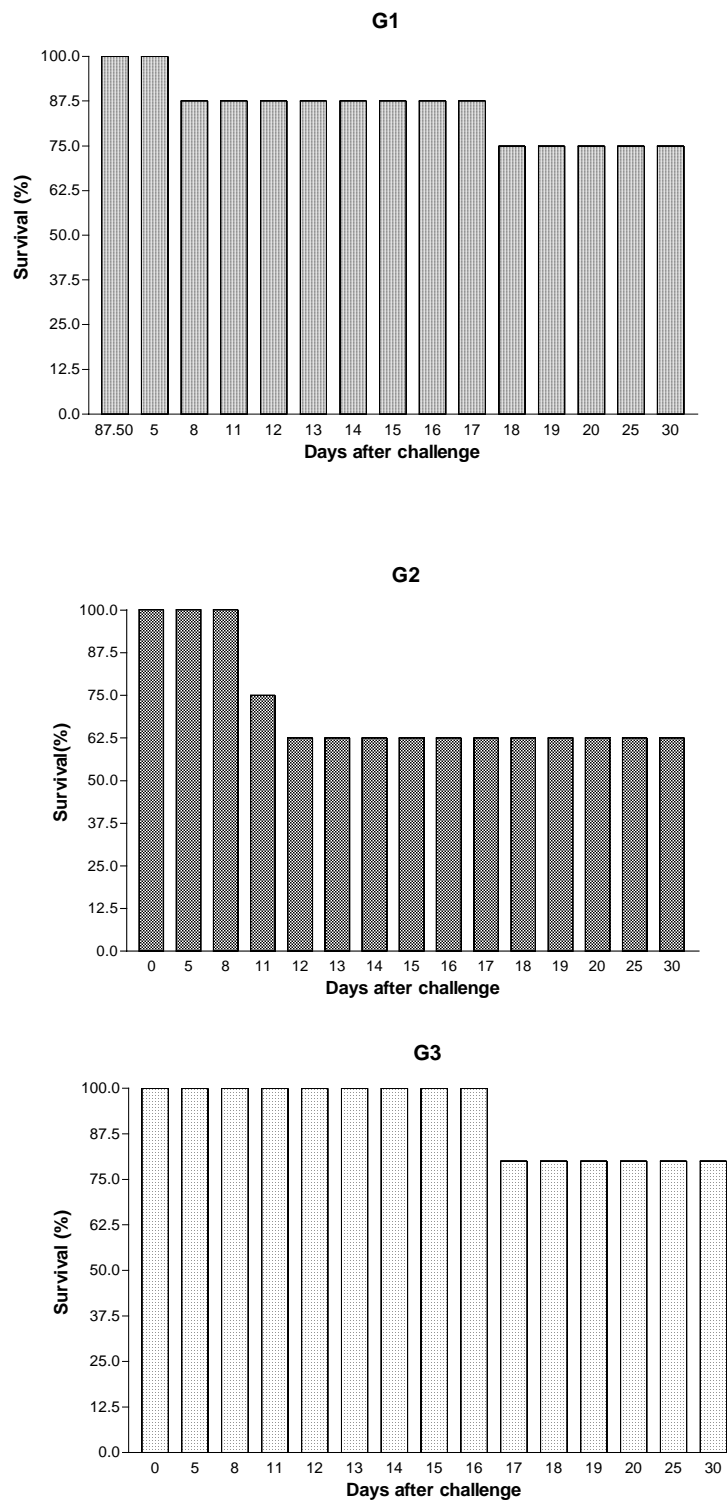
**Figura 7** - Dosagem de IgG no soro de camundongos inoculados pela via nasal com proteínas recombinantes do *T. gondii* (rGRA5, rGRA7 e rROP2), Grupo 1 (proteínas recombinantes associado a toxina colérica), Grupo 2 (somente toxina colérica) e Grupo 3 (salina). A linha pontilhada é o ponto de corte (DO = 0,166). As DOs foram corrigidas:  $DO_{corr} = \frac{\text{média das DOs da amostra} - \text{média das DOs do controle negativo}}{\text{média das DOs do controle positivo} - \text{média das DOs do controle negativo}}$



**Figura 8** - Resposta proliferativa de linfócitos esplênicos estimulados com antígenos de *T. gondii*, obtidos de animais imunizados com duas doses da vacina de proteínas recombinantes associadas com toxina colérica. As células foram cultivadas por 72 horas. a) Grupo 1 (proteínas recombinantes com toxina colérica), b) Grupo 2 (toxina colérica) e c) Grupo 3 (salina).



**Figura 9** - Número de cistos cerebrais observados por grupo experimental em camundongos desafiados com 50 cistos teciduais da cepa VEG. O G1 foi vacinado com duas doses de proteínas recombinantes do *T. gondii* mais toxina colérica pela via nasal, o G2 foi inoculado com toxina colérica e o G3 recebeu apenas PBS, permanecendo como grupo controle negativo.



**Figura 10** - Sobrevivência dos camundongos desafiados pela via oral com 50 cistos teciduais da cepa VEG. (Teste exato de Fisher;  $p > 0,4$ ). G1- Camundongos imunizados com proteínas recombinantes associado a toxina colérica; G2- camundongos imunizados somente com toxina colérica; G3- grupo controle – salina.

**ANEXOS**

**Anexo 1****Lista de reagentes****Lista de soluções e tampões****Protocolos de técnicas moleculares**

## Lista de reagentes

### PCR

#### Material e reagentes

01. Termociclador programado para o seu DNA
02. Tampão de amplificação
03. Solução de Sulfato de Magnésio 50 mM
04. Mistura de dNTP 10 mM
05. Primer inicial e Primer reverso
06. Fragmento do DNA da amostra (template)
07. Polimerase
08. Água Ultrapura
09. Micropipeta regulável de 10 µL
10. Micropipeta regulável de 1 µL
11. Micropipeta regulável de 2 µL
12. Ponteiras para 10 µL
13. Luvas descartáveis
14. Lixo branco para descarte diferenciado
15. Microtubos de 200 µL com tampa abaulada
16. Gelo picado
17. Proteinase K – Sigma P 2308 100 mg para Biologia Molecular (EC 3.4.21.64)  
Tritirachium álbum (39450-01-6) EEC № 254-457-8 14,5 U/mg sólido.  
DNAse, RNAse e Mckase 17,20 U/mg proteína Biureto
18. Platinum Pfx DNA Polimerase — 100 U (2,5 U/ µL) GIBCOBRL  
Cat. Nº 11708-013. Life Techn Logies.
19. Bench Mark™ Prestained (250 µL). Protein Ladder. Cat Nº 10748-010. INVITROGEN
20. Acrilamida Anydrous PM 71,08 (500 g) - SIGMA A 8887.
21. Brilliant Blue G – 250: PM 854 C<sub>47</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Na - SIGMA B 1131. Corar proteína.
22. Papel Celofane para conservação de gel de poliacrilamida: utilizado papel celofane especial para assar carne em forno, churrasqueira – Big Forno (045 226-6363), encontrado em supermercado, açougues e lojas de vendas de produtos para churrasco e assados.

## Protocolos de técnicas moleculares

### EXTRAÇÃO PELO KIT QUIAGEN

1. 1,5 ml de cultura centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm na microcentrifuga. Remova o sobrenadante completamente e descarte, tomando cuidado com o pelete.
2. Ressuspenda o pelte com PBS com o volume final de 200 µl.
3. Adicione 20 µl de proteinase K do QUIAGEN.
4. Adicione 200 µl de Buffer AL e vortex por 15 segundos
5. Incubar por 56 graus Celsius por 10 minutos.
6. Centrifugar somente para retirar o resto da tampa
7. Adicione 200 µl de etanol (96 – 100 %) na amostra, vortex por 15 segundo, centrifugue por alguns segundos para remover as gotas da tampa.
8. Cuidadosamente transfira a solução para o QIAAMP SPIN COLUMN e centrifugue por 8000 rpm por 1 minuto e depois descarte o tudo contendo o filtrado.
9. Cuidadosamente abra a QIAamp SPIN COLUMN e adicione 500 µl de buffer AW1 e centrifugue por 8000 rpm por 1 minuto e depois descarte o filtrado.
10. Adicione 500µl de buffer AW2 por 14.000 rpm por 3 minutos. Posteriormente centrifugue novamente para eliminar outras formas de gotas.
11. Transfira a coluna para um novo ependorffe e adicione 50-100µl de água mili-Q incube por 1 minuto a temperatura ambiente, centrifugue por 8000 rpm por 1 minuto.

### ÁGAR DE AGAROSE

O gel de Agarose é utilizado para a verificação da presença de DNA na amostra em gel com quinze canalizas (a tampa de placa de ELISA com 96 cavidades com capacidade para 50 mL).

Concentração do Gel	0,8%	1,0%	1,5%
Agarose	0,4 g	0,5 g	0,75 g
TE [1X] novo	50 mL	50 mL	50 mL
Brometo de Etídeo	25 µL	25 µL	25 mL

### Modo de preparar

1. Pese o ágar de agarose em erlenmeyer previamente tarado ( $\pm 165,166\text{g}$ ) em balança semi-analítica
2. Adicione o diluente TE. Verifique quanto perde de peso pela evaporação de água no aquecimento médio do microondas por aproximadamente 2 min. Acrescente o peso perdido com água destilada.
3. Adicione o brometo de etídeo quando estiver a  $50\text{-}60^\circ\text{C}$ .
4. Coloque o ágar em forma previamente preparada para a solidificação, observando o nivelamento da mesa. (O pente pode ser usado como molde para as canaletas apoiado em duas lâminas de microscopia e prendedores de placas de eletroforese. São utilizados dois pentes, um de cada lado).
5. Após a solidificação, retire os pentes e divida o ágar em dois, no sentido longitudinal. Identifique a concentração de agarose utilizada, data e nome de quem preparou.

## TRANSFORMAÇÃO DA BACTÉRIA

### I- Preparação da Bactéria Competente

1. Acerte o banho maria para  $42^\circ\text{C}$ .
2. Prepare as placas com ágar LB com ampicilina a  $50\text{-}100\ \mu\text{g/mL}$  ( $50\ \mu\text{g/mL}$ )  
Ampicilina estoque [ $5\text{mg/mL}$ ]  $\Rightarrow 5000\ \mu\text{g}$

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$5000 \cdot X = 50 \cdot 20 \text{ (cada placa)}$$

$$X = 1000 / 5000$$

$$X = 0,2\ \text{mL} \Rightarrow 200\ \mu\text{L} / 20\ \text{mL} \text{ (cada placa de cultivo).}$$

3. Aqueça o meio SOC ( $-20^\circ\text{C}$ ) à temperatura ambiente.
4. Retire a bactéria *E. coli* TOP 10 do freezer  $-80^\circ\text{C}$ , e descongele em gelo picado.

### II – Transformação

01. Adicione  $3\ \mu\text{l}$  da solução contendo o vetor com o fragmento do DNA em um microtubo contendo a célula imunocompetente (*E. coli* One Shot TOP 10, freezer  $-20^\circ\text{C}$ ).
02. Incube no gelo por 30 minutos. Faça o choque térmico por 30 segundos à  $42^\circ\text{C}$ .
03. Coloque imediatamente no gelo.
04. Adicione  $250\ \mu\text{l}$  do meio SOC à temperatura ambiente.
05. Agite o tubo horizontalmente a  $200\ \text{rpm}$  (Shaker - BOD) à  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos.

06. Semeie, utilizando alça de Drigalski, as placas de Petri com ágar LB 100 e 200  $\mu\text{L}$  de cada microtubo de transformação, para obtenção de colônias isoladas. Incube-as *durante a noite* a 37 °C.
07. Selecione 5 colônias isoladas da placa com ágar LB com para análise na seqüência do experimento.
08. Repique cada colônia em tubo com 3 ml de caldo LB com 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina (60  $\mu\text{L}$  da solução 5mg/ml cada tubo). Incube à 37 °C sob agitação (Shaker) *durante a noite*.
09. Deposite 500  $\mu\text{L}$  da cultura em microtubo e centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
10. Despreze o sobrenadante.
11. Adicione 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura ao pellet e ressuspenda-o.
12. Ferva por 10 minutos e centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
13. Retire 75  $\mu\text{L}$  para verificação dos clones através da PCR.

#### **EXTRAÇÃO DE PLASMÍDIO POR LISE ALCALINA (MINI PREP)**

01. Inocule a bactéria em 3 ml de caldo LB com ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  por 18 a 24 horas a 37 °C.
02. Passe 1,5 ml da cultura para o microtubo, centrifugue a 14000 rpm por 1 minuto.
03. Despreze o sobrenadante vertendo o microtubo, deixando o pellet com a bactéria o mais seco possível.
04. Adicione 100  $\mu\text{L}$  da **solução I** gelada (para lavar), ressuspenda o pellet no Vortex, incube no gelo à – 20 °C por 5 minutos.
05. Adicione 200  $\mu\text{L}$  da **solução II** (para estourar e precipitar o material genético em pH 13), misture várias vezes por inversão e incube no gelo por 5 minutos.
06. Adicione 150  $\mu\text{L}$  da **solução III** (precipita todo o material genético e refaz o ext do plasmídeo pequeno), misture várias vezes por inversão.  
\* Trate cada microtubo com 1 $\mu\text{L}$  com RNase (10 mg/mL) e incube no gelo por 5 minutos.
07. Centrifugue a solução por 5 minutos a 13000 rpm à temperatura ambiente.
08. Transfira cuidadosamente o sobrenadante para microtubo novo.
09. Adicione 450  $\mu\text{L}$  de isopropanol. Misture por inversão. Incube a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos.
10. Sedimente o DNA à temperatura ambiente a 14000 rpm por 15 minutos.
11. Despreze o sobrenadante, invertendo o microtubo para secar na ventilação do fluxo laminar por 5 minutos.

11. Adicione 25  $\mu$ L de TE Tris-HCl 10mM – EDTA 0,1 mM pH 8,0 ou água ultrapura.
12. Proceda a corrida em gel de agarose 1%: 5  $\mu$ L da amostra + 5 $\mu$ L de água + 2 $\mu$ L de Ficoll.

### **EXPRESSÃO (piloto)**

01. Inocule 500  $\mu$ L da cultura, incubada durante a noite, em erlenmeyer contendo 10 mL de caldo LB com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina.
02. Incube por 2 horas sob agitação a 200 rpm a 37°C.  
Verifique a DO<sub>600</sub>  $\Rightarrow$  0,5 – 0,8 (mid log).
03. Divida a cultura em culturas de 5 mL, **A** cultura induzida por IPTG\* e **B** cultura não induzida. Adicione IPTG de modo que tenha uma concentração final de 0,5 a 1,0 mM, na cultura **A**.
04. Remova 500  $\mu$ L de cada cultura, centrifugue a velocidade máxima (13000 rpm) em microcentrífuga por 30 segundos.
05. Congele o pellet de células a – 20°C. Este é o tempo do ponto 0 das amostras.
06. Continue a incubar as culturas a 37°C com agitação. Tome alíquotas 500  $\mu$ L de cada cultura, induzida e não induzida, de uma em uma hora, por 4 a 6 horas e proceda conforme o descrito nos passos 4 e 5.

\* **Indutor:** são moléculas menores que as proteínas, similares às estruturas de lactose capazes induzir genes *lac*-operon mesmo que elas não possam ser hidrolisadas pela  $\beta$ -galactosidase, como isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), utilizada em estudos genéticos do *lac*-operon porque pode se difundir para dentro da célula, visto que não é metabolizada, sua concentração se mantém constante por todo o experimento (LODISH, Harvey; BERK, Arnold; ZIPURSKY, S. Lawrence; MATSUDAIRA, Paul; BALTIMORE, David; DARNELL, James E. Molecular Cell Biology 4<sup>a</sup> ed. Media Connected W. H. Freeman and Company 2000, Cap. 10, p. 342-343, 1084 p.)

### **PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA PROTEÍNAS SOLÚVEIS/INSOLÚVEIS**

01. Descongele o pellet obtido e ressuspenda-o em 500  $\mu$ L de tampão de lise.
02. Congele a amostra em gelo seco ou nitrogênio líquido e descongele a 42°C.  
Repita 2 a 3 vezes.  
**Nota:** Para facilitar a lise, pode ser necessário adicionar lisozima ou sonicar as células.
03. Centrifugue a 13000 rpm em microcentrífuga por 1 minuto a 4°C para a obtenção de pellets de proteínas insolúveis. Transfira o sobrenadante para microtubo resfriado.

## **MONTAGEM DA PLACA SDS PAGE PARA CUBA VERTICAL PEQUENA**

01. Limpe bem as duas placas de vidro, uma retangular e outra cavada em um dos lados com maior comprimento, com a solução álcool-éter 1:2 ou apenas álcool 70°GL.
02. Coloque espaçadores da mesma espessura e tamanho nas laterais entre as placas, sendo um em cada lado e outro na parte inferior, onde a placa é inteira.
03. Prenda com duas presilhas em cada lado e duas na parte inferior, para a montagem das placas.
04. Vede com agarose reciclada (sem brometo de etídeo) as parte laterais e a parte inferior.
05. Coloque a placa na vertical, verifique e corrija o nível antes de aplicar o gel.
06. Coloque o *slab gel* deixando cerca de 3,5 cm da borda superior. Adicione um a dois mL de água para que polimerize, pois o oxigênio dificulta ou impede a polimerização do gel.
  - \* Evite a formação de bolhas depositando delicadamente o gel.
  - \* Caso forme bolhas. tire-as co auxílio de papel de filtro ou papel-toalha de boa qualidade.
07. Adicione delicadamente o *staking gel* após a polimerização do *slab gel*, evitando a formação de bolhas. Coloque cuidadosamente o pente da mesma espessura dos espaçadores na parte superior das placas e espere polimerizar.
08. Passe vaselina nas margens da placa cavada, que fica voltada para o depósito superior do tampão de corrida da cuba, de onde parte a corrente elétrica. Retire o espaçador inferior para que possibilite a corrida eletroforética e o pente colocado para a formação de poços para inoculação das amostras.
09. Fixe cuidadosamente a placa na cuba de corrida vertical com presilhas, com a parte face cavada voltada para o depósito superior do tampão de corrida.
10. Coloque o tampão de corrida nos depósitos superior e inferior da cuba.
11. Retire as bolhas que se formarem na porção inferior do conjunto das placas, no lugar deixado pelo espaçador retirado, ao ser colocada no depósito de tampão de corrida, com auxílio de uma seringa e uma agulha dobrada em “L”.
12. Inocule lentamente as amostras nos poços formados pelos dentes do pente colocado na porção superior do conjunto.
13. Ajuste a voltagem para 20 V e 10 mA e deixe correr overnight.

O tampão de corrida pode descer, escorrer quando as placas não estão devidamente acopladas. Complete o volume do tampão de corrida no depósito superior e deixe correr por mais 4 horas a 100 V.

## **RETIRADA DO GEL, COLORAÇÃO, DESCOLORAÇÃO E FOTOGRAFIA**

01. Retire os tampões de corrida e coloque-os em frascos de vidro âmbar.

Retire o gel de poliacrilamida da cuba de corrida. Não use nada de metal como alavanca para separar as placas do gel, porque podem danificar as arestas das placas de vidro da cuba.

02. Retire o gel stacking do gel de poliacrilamida, as aparas do restante do gel. Marque o lado do gel onde começam as canaletas com a seqüência das amostras para não dificultar a identificação das amostras. Padroniza-se cortar um pedaço do canto esquerdo inferior, facilitando a identificação da posição do padrão.

03. Coloque o gel em solução corante em uma cuba por 1 a 2 horas, sob agitação suave.

04. Retire a solução corante e coloque no respectivo frasco.

05. Coloque a solução descorante na cuba e deixe sob agitação suave, retirando o descorante quando estiver com coloração azul, filtrando em carvão ativado, para ser reutilizada.

Coloque nova alíquota da solução descorante, que deverá ser trocada toda vez que estiver com coloração azulada, até a obtenção do gel descorado que possibilite a visualização das bandas de proteínas.

06. Fotografe o gel. Para isto troque o filtro azul do equipamento pelo filtro amarelo para se obter um imagem nítida, devido à utilização do Comassie Brilliant Blue (corante com cor complemento do azul).

\* Não apertar o filtro para que não risque a outra lente do equipamento.

07. Troque a bandeja de fundo escuro do equipamento, usada para fotografias em UV (violeta), para a bandeja de fundo branco, para fotografias gel de poliacrilamida.

## **TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING**

\* Utilizada para análise de proteínas em gel desnaturante SDS-PAGE.

01. Monte o sanduíche, para a transferência de proteínas pela técnica de Western Blotting, em uma cuba contendo o tampão de transferência para evitar que a formação de bolhas interfira no processo de transferência.

02. Coloque o gel de modo que forme um sanduíche: a primeira metade do suporte da cuba de transferência, a esponja embebida no tampão de transferência, assim como o papel de filtro, depois o gel que contém as proteínas a serem transferidas, o papel de nitrocelulose com as mesmas medidas do gel, que irá receber a transferência das proteínas, outro papel de filtro, esponja embebidos com tampão de transferência e a outra metade do suporte da cuba de transferência.

03. Fixe o sanduíche e coloque-o corretamente no encaixe da cuba cheia com tampão de transferência, de modo que o papel de nitrocelulose fique voltado para o pólo positivo (vermelho), que receberá a corrente elétrica vinda do pólo negativo (preto).
04. Transfira *overnight* com 30 V ou por 2 horas a 70 V a 0°C ou em refrigerador.
05. Desmonte o sanduíche. Retire da membrana de nitrocelulose e marque a posição do padrão de peso das proteínas, para não trocar a face que recebeu a transferência. Faça o bloqueio da membrana de nitrocelulose com tampão de saturação por 1 hora à temperatura ambiente e sob agitação lenta. O papel de nitrocelulose será então cortado em tiras para incubação com soros (1:50) por 2 horas e então lavadas em tampão de lavagem cinco vezes contendo TWEEN 20 (0,05%) com intervalo de 2 min entre cada troca de tampão.
06. Conjugado anti IgG de suíno marcado com peroxidase (sigma) será diluído em tampão de lavagem e colocado sobre as fitas. Após 1 hora a 37 C as tiras serão lavadas em tampão de lavagem durante 1 hora à temperatura ambiente, trocando-se a solução a cada 2 min e posteriormente reveladas com solução de revelação até o aparecimento das bandas.
07. A reação será interrompida em água destilada e as fitas estocadas no escuro até serem fotografadas.
08. Monte o cassete para Raios-X em câmara escura, colocando a membrana de nitrocelulose envolta no filme de PVC com a face que recebeu a transferência voltada para cima, depois a chapa de filme fotográfico e feche o cassete. Deixe 1 minuto para que vele o filme e revele em equipamento de Raio X.  
\* O tempo de exposição pode variar de acordo com a intensidade da luminescência a que o filme ficou exposto, sendo um tempo maior ou menor.

### **PREPARAÇÃO DO LISADO DE CÉLULAS DE *E. COLI* DESNATURANTE (QIAGEN)**

- Somente para proteínas insolúveis
  - Quando se quer preservar a atividade protéica
01. Ressuspenda o pelete de cultura em buffer B com 5ml de buffer para cada grama de pelete seco.
  02. Manter as células em temperatura ambiente por 60 minutos. A lise estará completa quando a solução estiver translúcida.
  03. Centrifugue o lisado a 13000 rpm por 5 minutos e guarde o sobrenadante.

## **PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

01. Purifique a proteína recombinante ligada ao tag de histidina na coluna Pré-equilibrada (buffer B) contendo a resina em duas alíquotas de 5 mL do lisado.
02. Agite delicadamente a coluna por 60 minutos.
03. Ressuspenda a resina contendo o níquel. Deixe-a ligar-se completamente a polihistidina.
04. Fixe a coluna Pré-equilibrada em suporte vertical para que a resina com níquel se ligue ao tag de polihistidina com a proteína recombinante e sedimente por gravidade e o tampão seja escoado delicadamente do sobrenadante ou centrifugação a baixa velocidade, 800 X g, aspirando o sobrenadante
05. Repita com a segunda alíquota.
06. Lave 2 vezes com tampão de lavagem C
07. Elua a proteína recombinante 4 vezes com 0,5ml tampão de eluição D e em seguida 4 vezes com 0,5 ml de tampão E. Guarde o eluido para ser analisado em SDS PAGE.

## **DOSAGEM PROTÉICA PELO MÉTODO DE BRADFORD**

### **Preparo do Corante**

01. Dissolva 25 mg (0,025 g) de Brilliant Blue (Comassie Brilliant Blue G Anhydrous – Sigma B 1131 PM 854 C<sub>47</sub>H<sub>48</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S<sub>2</sub>Na) em 12,5 mL de Etanol 95%.
02. Adicione 25 mL de Ácido Orto-Fosfórico 85%.
03. Complete o volume para 250 mL com Água Bidestilada. Filtre em Papel de Filtro.

Obs.: \* Homogeneizar bem em todas as etapas para evitar formação de grumos.

\* O corante deve ser de cor tijolo.

\* Armazene a temperatura ambiente em frasco escuro com tampa esmerilhada.

\* Verifique se há formação de grumos toda vez que for utilizado.

\* O corante é estável indefinidamente. Só há necessidade de filtração antes da confecção de outra curva.

## **IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA CULTURA DE CÉLULAS**

1. Cresça a cultura de células transfectadas que expressa a proteína fusionada à histidinasobre uma lamínula estéril à 37 °C.
2. Lave as células cuidadosamenteem PBS
3. Fixe as células com metanol (-20 °C) durante 10 minutos e então, com acetona (-20 °C) durante 1 minuto
4. Lave as lamínulas 2 vezes em PBS durante 5 minutos (cada lavagem)

OBS: bloqueie com PBS contendo 1% BSA durante 10 minutos em temperatura ambiente. Depois seque para incubar com o anticorpo primário.

5. Incube com o anticorpo primário diluído em PBS com 1% BSA durante 60 minutos
6. Lave 3 vezes em PBS
7. Incube com o anticorpo secundário marcado com isotiocianato de fluoresceína diluído em PBS com 1% BSA, durante 30 minutos.
8. Lave 3 vezes em PBS
9. Seque e adicione glicerina e lamínula para fazer a leitura em microscópio epifluorescente.

#### **ELISA INDIRETO (Garcia et al., 2005)**

1. Sensibilizar as placas com 100 µL de solução de antígeno + tampão de sensibilização (Tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6). Concentração do antígeno 5 µg/mL (proteína recombinante) ou 10 µg/mL (antígeno bruto /*Anaplasma*). Deixar “overnight” a 4 °C.
2. Lavar 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20;
3. Cobrir os orifícios com 200 µL de tampão de bloqueio (Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó desnatado);
4. Lavar 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20;
5. Adicionar em duplicata 100 µL do soro diluído (1:50). O soro deve ser diluído em PBS-Tween 20 contendo 5% de leite em pó desnatado. Incubar a placa a 37 °C por 45 minutos em câmara úmida.
6. Lavar 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20;
7. Adicionar 100 µL de conjugado peroxidase espécie específica diluído 1:\_\_\_\_\_ (anti-mouse sigma – 1:10.000) em PBS-Tween 20. Incubar a 37 °C durante 45 minutos em câmara úmida;
8. Lavar 3 vezes com 200 µL de PBS-Tween 20;
9. Adicionar 100 µL de Tampão substrato cromógeno. Manter em agitação
10. Parar a reação com \_\_\_\_\_ minutos adicionando 50 µL de 1M HCl. Fazer a leitura com filtro de 490 nm.

**Soluções:****Tampão de sensibilização (0,05 M Carbonato/bicarbonato pH 9,6)**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 1,59 gNaHCO<sub>3</sub> \_\_\_\_\_ 2,93 g

Para 1 litro pH 9,6

**Tampão de bloqueio**

Tampão de sensibilização + 8% de leite em pó

Ex para 1 placa: 25 mL de tampão sensibilização

2 g de leite em pó desnatado

**PBS-Tween 20**

NaCl \_\_\_\_\_ 8,0 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> \_\_\_\_\_ 0,2 gNa<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O \_\_\_\_\_ 2,9 g (se for 7H<sub>2</sub>O – 2,14 g)

KCl \_\_\_\_\_ 0,2 g

Tween 20 \_\_\_\_\_ 0,5 mL

Para 1 litro pH 7,4

**Tampão de substrato cromógeno**

0,1 M Ácido cítrico (21 g/1 litro) \_\_\_\_\_ 24,3 mL

0,2 M Fosfato (28,4 g Na<sup>2</sup>HPO<sub>4</sub>/1 litro) \_\_\_\_\_ 25,7 mL

água dest \_\_\_\_\_ 50 mL

**Substrato cromógeno**

Tampão substrato \_\_\_\_\_ 100 mL

OPD \_\_\_\_\_ 40 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PA 30% \_\_\_\_\_ 40 µL