

## PADRONIZAÇÃO DE COLETA DE PBMCs PARA AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR DE GATOS

Raul Fávero Perrone, Larissa Vieira Mazzucco, Faiane Reila Sousa Centenaro Duarte, Thayná Fiorentin Moreira, Rafaela Gil Bossle, Amanda Martins Ungri, Larissa Américo, Felipe Rieth de Lima, Ana Paula Remor Sebolt, Andreas Lazaros Chryssafidis

### INTRODUÇÃO

O controle da infecção por *Toxoplasma gondii* depende principalmente da resposta imune celular dos indivíduos infectados, sendo o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) um marcador essencial essa imunológica (INNES et al., 2019; YIN et al., 2015). O isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) é fundamental para estudar a ativação linfocitária em condições controladas e serve de base para ensaios funcionais (CARDONA; MONCADA; GÓMEZ-MARIN, 2015; MIKKELSEN et al., 2011). Entre esses, destaca-se o ensaio imunoenzimático de ponto (ELISPOT), sensível na detecção de células secretoras de citocinas como o IFN- $\gamma$  (SAHAY et al., 2018; FASQUELLE et al., 2023). Em felinos, o isolamento de PBMCs apresenta desafios, como o pequeno volume de sangue e a maior contaminação por neutrófilos, o que exige adaptações metodológicas (LEHLE et al., 2025). Assim, este estudo teve como objetivo padronizar o isolamento de PBMCs de gatos jovens infectados experimentalmente por *T. gondii*, visando sua aplicação em ensaios de ELISPOT.

### DESENVOLVIMENTO

As amostras de sangue foram processadas para isolamento de PBMCs por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Histopaque-1017. O sangue total foi previamente diluído em PBS (1:1) e cuidadosamente sobreposto ao gradiente, seguido de centrifugação controlada (400 g, 30 min, 22 °C). Após a centrifugação, a fração mononuclear (interface plasma–Histopaque) foi recuperada com pipetagem estéril, transferida para novos tubos e lavada em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS). Quando necessário, procedeu-se à lise osmótica de hemácias residuais com água ultrapura, imediatamente neutralizada com PBS estéril, para garantir maior pureza do concentrado celular mononuclear. Inicialmente, as células recuperadas foram lavadas de forma convencional apenas em PBS. Entretanto, observou-se a formação de agregados celulares, provavelmente associados à presença de DNA extracelular liberado por células lisadas. Para contornar esse problema, em um segundo momento foi testada a suplementação da primeira lavagem com RPMI contendo DNase, para reduzir a agregação e melhorar a homogeneidade da suspensão. Após essa etapa inicial, em ambos os protocolos, as células foram submetidas a lavagens adicionais até a completa remoção de contaminantes e resíduos do gradiente, assegurando a formação de pellet íntegro e viável. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio RPMI completo suplementado com soro fetal bovino e penicilina estreptomicina, homogeneizadas e avaliadas quanto à viabilidade pelo teste de exclusão com azul de Tripán. A quantificação foi realizada em câmara de Neubauer, considerando os campos padronizados de contagem. Para criopreservação, utilizou-se solução composta por meio RPMI completo + 10% de DMSO, acondicionando-se as células em criotubos previamente identificados. O congelamento foi realizado de forma gradual, em dispositivo de resfriamento controlado com declínio de 1 °C por min durante 24 h, e

armazenados em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até posterior utilização nos ensaios de ELISPOT para IFN- $\gamma$ .

## RESULTADOS

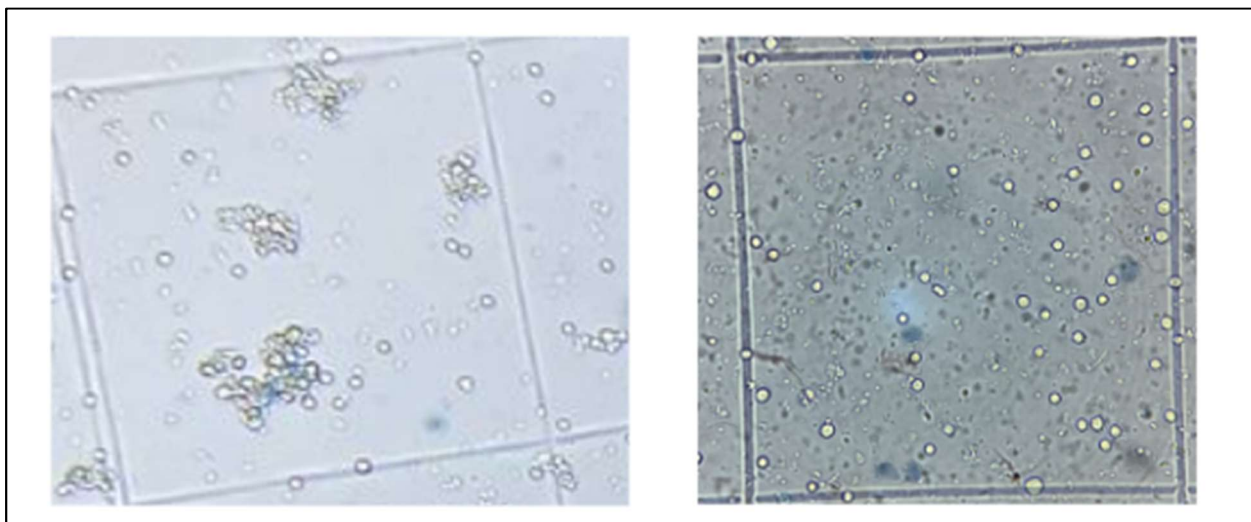
O isolamento de PBMCs foi consistente em ambas as abordagens testadas. Observou-se que a utilização de DNase reduziu a formação de grumos celulares e facilitou a homogeneização da suspensão celular, resultando em maior recuperação de células viáveis e contagem mais precisa em câmara de Neubauer (Figura 1). Até o momento, os ensaios de ELISPOT não foram realizados com as amostras isoladas; contudo, os testes de padronização estabelecem as condições necessárias para a aplicação dessa metodologia em gatos.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços metodológicos alcançados estabelecem bases sólidas para futuros estudos de imunidade celular e vacinação experimental contra *T. gondii* em felinos. Apesar dos desafios técnicos associados à criopreservação e ao manejo de pequenos volumes de sangue, os avanços metodológicos já alcançados permitem a obtenção de resultados consistentes, estabelecendo bases para futuras investigações em imunologia felina e em estudos de vacinação experimental.

**Palavras-chave:** felinos; PBMCs; ELISPOT; imunidade celular.

## ILUSTRAÇÕES



**Figura 1.** Isolamento de PBMCs felinas sem DNase (esquerda), com formação de agregados, e com DNase (direita), mostrando células mais homogêneas e dispersas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDONA, Néstor I.; MONCADA, Diego M.; GÓMEZ-MARIN, Jorge E. Uma abordagem racional para selecionar peptídeos imunogênicos que induzem resposta de IFN- $\gamma$  contra *Toxoplasma gondii* em leucócitos humanos. **Immunobiology**, v. 220, n. 12, p. 1337–1342, 1 dez. 2015.
- DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Toxoplasma Centennial Issue. v. 39, n. 8, p. 877–882, 1 jul. 2009.
- FASQUELLE, François *et al.* Nasal vaccination of six squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*): Improved immunization protocol against *Toxoplasma gondii* with a nanoparticle-born vaccine. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 22, p. 69–74, 1 dez. 2023.
- GARCÍA-PIÑERES, A. J. *et al.* DNase treatment following thawing of cryopreserved PBMC is a procedure suitable for lymphocyte functional studies. *Journal of Immunological Methods*, v. 313, n. 1–2, p. 209–213, 2006.
- INNES, Elisabeth A. *et al.* A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Food and Waterborne Parasitology**, v. 15, p. e00053, 1 jun. 2019.
- LEHLE, S. *et al.* Effect of delayed isolation of peripheral blood mononuclear ... *BMC Immunology*, 2025.
- MIKKELSEN, S. Rochelle *et al.* Partial Regulatory T Cell Depletion Prior to Acute Feline Immunodeficiency Virus Infection Does Not Alter Disease Pathogenesis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e17183, 25 fev. 2011.
- SAHAY, Bikash *et al.* Utilization of Feline ELISpot to Evaluate the Immunogenicity of a T Cell-Based FIV MAP Vaccine. In: KALYUZHNY, Alexander E. (Org.). **Handbook of ELISPOT**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1808 p. 197–219.
- YIN, Qing *et al.* Detecção precoce de gatos infectados por *Toxoplasma gondii* por meio de ensaio de liberação de interferon gama. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 145–149, 1 out. 2015.

---

**DADOS CADASTRAIS**

---

**BOLSISTA:** Raul Fávero Perrone

**MODALIDADE DE BOLSA:** Voluntário/PIVIC

**VIGÊNCIA:** 09/2024 a 07/2025 – Total: 11 meses

**ORIENTADOR:** Andreas Lazaros Chryssafidis

**CENTRO DE ENSINO:** CAV

**DEPARTAMENTO:** Medicina Veterinária

**ÁREAS DE CONHECIMENTO:** Ciências Agrárias/ Medicina Veterinária/ Medicina Veterinária Preventiva/ Doenças Parasitárias dos Animais

**TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA:** Avaliação da resposta imunológica de gatos a vacinas experimentais contra *Toxoplasma gondii*.

**Nº PROTOCOLO DO PROJETO DE PESQUISA:** 7783280224