

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**POTENCIAIS VACINAS E MARCADORES DE DIAGNÓSTICO
PARA TOXOPLASMOSE BASEADOS EM PEPTÍDEOS
QUIMÉRICOS.**

ANDREW DOUGLAS MOURA

**Natal
2018**

ANDREW DOUGLAS MOURA

**POTENCIAIS VACINAS E MARCADORES DE DIAGNÓSTICO
PARA TOXOPLASMOSE BASEADOS EM PEPTÍDEOS
QUIMÉRICOS.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica (Área de concentração: Biologia Molecular).

Orientadora: Prof^a. Dra. Daniella R. A. Martins Salha

Co-orientador: Prof^o. Dr. Oscar Bruña Romero

Co-orientadora: Dra. Carolina de O. Mendes Aguiar

**Natal
2018**

Moura, Andrew Douglas.

Potenciais vacinas e marcadores de diagnóstico para toxoplasmose baseados em peptídeos quiméricos / Andrew Douglas Moura. - Natal, 2018.

128 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Regina Arantes Martins Salha.

Coorientador: Prof. Dr. Oscar Bruña Romero.

Coorientadora: Dra. Carolina de Oliveira Mendes Aguiar.

1. Toxoplasmose - Tese. 2. Imunoinformática - Tese. 3. Epítomos - Tese. 4. Vacinas - Tese. 5. Imunodiagnóstico - Tese. I. SALHA, Daniella Regina Arantes Martins et al. II. Título.

ANDREW DOUGLAS MOURA

Potenciais vacinas e marcadores de diagnóstico para toxoplasmose baseados em peptídeos quiméricos

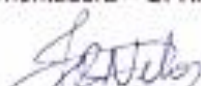
Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovado em: 28/03/2018

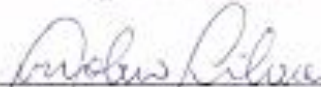
BANCA EXAMINADORA



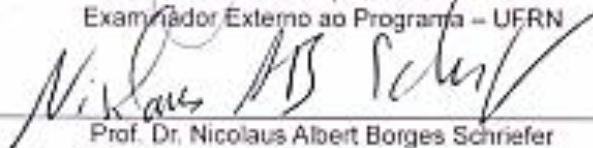
Prof.ª. Dr.ª. Daniella Regina Arantes Martins Salha
Orientadora – UFRN



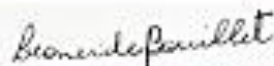
Prof. Dr. João Firmino Rodrigues Neto
Examinador Externo ao Programa - UFRN



Prof. Dr. Amébio Antônio da Silva Júnior
Examinador Externo ao Programa – UFRN



Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer
Examinador Externo à Instituição – UFBA



Prof.ª. Dr.ª. Leoneide Érica Maduro Bouillet
Examinadora Externa à Instituição – UEPA

APOIO FINANCEIRO

Esse trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico(CNPq), contanto também com financiamentos oriundos do Instituto de Medicina Tropical do Rio Grande do Norte (IMT-RN/UFRN) e pela Universidade Federal de Santa Catarina (MIP/UFSC).



Dedico esta obra:

À Deus, à comunidade científica, aos meus verdadeiros amigos, à toda minha família, em especial à minha mãe e meus amados avós Anselmo e Leonice.

“Não importa os desvios durante parte da jornada. Importa a segurança em refazer os caminhos mal percorridos.”

Chico Xavier- André Luiz

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, Maria Santíssima e aos bons espíritos que me guiaram e me auxiliaram nessa jornada;

À minha orientadora Prof^a Daniella (Dani), por ter me acolhido quando eu precisei, por ter me aceitado como primeiro doutorando e lutado juntamente comigo na elaboração de um novo projeto já com 2 anos de doutorado. Por ter me ensinado muito e também por ter aprendido comigo às metodologias inovadoras que juntos conseguimos executar. Por todos os momentos, pelos tristes e felizes os quais me possibilitaram a crescer muito pessoalmente também. Pelo carinho, risadas, paciência e todos esforços expendidos. Sempre tive muito orgulho de ser seu aluno;

À Prof^a Selma por também me acolher com muito carinho juntamente com a Daniella, por sempre acreditar no meu potencial, me incentivando além de ser um bom cientista, a ser um ser humano que saiba olhar o próximo com compaixão e sempre tentar ajuda-lo. Por todo apoio e torcida para que esse trabalho se realizasse;

Ao Prof^o Oscar, pela amizade desde 2010, apoio e carinho. Por sempre me incentivar, aconselhar estando sempre presente e disposto a ajudar. Por ter tido a boa vontade e iniciativa de implantar a linha de pesquisa dele na UFRN, com intuito de contribuir com o crescimento científico, me ensinando assim, que o ego só atrapalha, e que para se fazer ciência é importante o estabelecimento de uma equipe que seja composta por parceiros comprometidos em prol de ajudar. Por nunca ter desacreditado de mim, pelo apoio, confiança em mim e na Dani, e suporte nesse projeto;

À Dra. Carolina (Carol) por ter vestido a camisa mesmo, por ter me ensinado muito sobre as metodologias imunológicas e ter assumido o meu papel na execução dos experimentos imunológicos quando eu adoeci e fiquei sem suporte para continuar. Pela amizade e carinho dispensados também fora do laboratório;

À Eliene (Eli) e Wilo por serem meus companheiros de laboratório no DBQ. Eli, obrigado por cada ajuda, por alegrar os meus dias, pelas conversas, gargalhadas. Wilo obrigado pelos anos

que me ajudou, nos quais pude te acompanhar durante a sua Iniciação Científica, ensinar o que eu sabia e aprender contigo também. Por todo carinho e amizade;

Ao Profº João Paulo e Ricardo pelas inúmeras contribuições da parte de bioinformática, ideias, ensinamentos, elaboração de figuras, e patente. Aos demais aluno laboratório do Profº João Paulo, em especial ao Diego e Juliana, por todo companheirismo e carinho expendido;

Ao Profº Arnóbio e Emmanuel por terem aberto as portas e possibilidades futuras para outras vertentes que possam ser geradas com nanotecnologia;

À equipe do laboratório do Profº Eliseu, em especial ao Antônio que se empenhou muito a me ajudar com os processos de purificação da proteína recombinante, estabelecendo estratégias e metodologias que possam contribuir para obtenção dessa. Por todo acolhimento e empenho;

Aos meninos do Departamento de Engenharia Química, Francisco, Vitor, Marcos e Luan que também se ofereceram para auxiliar com muita boa vontade e atenção;

Aos alunos do LBMG, Sinara, Rita, Lela e Berg que sempre estavam disponíveis a auxiliar. Pela amizade e torcida;

Aos alunos do antigo LAR-UFMG, Ana, Mariana, Gustavo, Leoneide e demais alunos que junto comigo integraram a equipe do Professor Oscar e sempre torceram por mim, foram companheiros de 2010 a 2011, me ensinaram grande parte das metodologias que pude executar nesse trabalho e sempre se mostraram solícitos e com boa vontade para ajudar;

À equipe do IMT, em especial à Glória que auxiliou muito na execução dos ELISAS e sempre se mostrou prestativa a qualquer ajuda;

Aos voluntários e participantes dessa pesquisa;

À todos da UFRN, desde a portaria à diretoria;

Aos meus amigos, de Natal, (Ronney, Fabrício, Ysmênia, André Leandro, Bruno, Lisianne, Fidel, Maria, Rob, Diogo) e em especial ao meu grupo *True Love* (Erika, Carol, Liugo e Henedy). Às torcidas organizadas de BH (Elaine, Dênis, Núbia, Bruno, Milene, Bruna, Pedro, Lívia, Lorena, Mara, Wanderley e demais amigos) e SP, todos amigos de décadas até os dias de hoje, simplesmente pelo fato de serem amigos verdadeiros, me aceitarem e me amarem do jeito que eu sou. Por serem presentes em todos os momentos da minha vida, nos bons e nos ruins. Pelos conselhos, risadas, lágrimas, carinho, cumplicidade e amor. Por serem a família

que Deus me permitiu escolher e trilharem comigo torcendo e me apoiando nessa jornada chamada vida;

To Thomas, Ingrid, Joshua and Angela. Thanks for making me go on and being present with messages, calls, always giving me some support and good words;

Ao Miguel pelos anos que estive ao meu lado em Natal me auxiliando;

À minha família potiguar, os Camargos, que me acolheram no seio familiar deles desde 2011 e sempre são presentes, em especial à minha mãe Simone, pai João e Andrea. Obrigado por não me deixarem cair, por sempre estarem presente e pelo amor que sempre expenderam por mim. Por fazer o papel verdadeiro de família, aconselhando, puxando orelha, incentivando e torcendo por mim. À Verônica, por entrar depois na minha vida, mas executando também o papel de família. Pelo carinho e amor que são recíprocos;

À minha família biológica, meus avós, minha mãe, padrasto (que também faz o papel de pai na minha vida), irmãos, tios, primos e sobrinhas. Vocês são minha base de tudo, meu verdadeiro tesouro. Não somos perfeitos, temos nosso gênio forte e as nossas imperfeições, mas aprendemos juntos uns com os outros o real sentido do amor, amparo e ser uma família. Agradeço não só pela participação nessa jornada, mas por serem as pessoas mais importantes da minha vida toda. Tenho muito orgulho das minhas origens e de toda a trajetória que passamos. Raízes e asas... Vó e Vô obrigado por me ensinarem a nunca mentir, a ser um homem íntegro e honrar sempre os meus valores morais. Vó Ednalva, obrigado por torcer e rezar para que isso acontecesse, obrigado por representar a memória do meu pai e se orgulhar por cada conquista minha. Mãe e Paulo, obrigado por me ajudarem na realização dos meus sonhos e por todos os suportes que necessitei durante toda a minha formação acadêmica. Cleo, Selma, Max, Tia Creuza, Madrinha e Celso obrigado por serem os melhores tios do mundo. Meus irmãos, primos e sobrinhas obrigado por me apoiarem e entenderem quando não pude estar presente, espero que vejam essa jornada difícil como algo motivador na vida de vocês, que sempre lutem com dignidade e hombridade pela realização dos seus sonhos, sendo gratos a todos que participam de alguma forma nas suas jornadas. Pedras no caminho sempre aparecerão, mas podemos usa-las a nosso favor. Viemos do mesmo seio familiar, recebemos o mesmo DNA e orientações, só depende de nós a nossa vitória. AMO VOCÊS. Muito obrigado a todos, por cada gesto simples, cada oração, palavra, sorriso e atos motivadores. Pela torcida, carinho, compreensão e companheirismo.

POTENCIAIS VACINAS E MARCADORES DE DIAGNÓSTICO PARA TOXOPLASMOSE BASEADOS EM PEPTÍDEOS QUIMÉRICOS.

RESUMO

A Toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), que pode infectar vários animais de sangue quente, incluindo humanos. Os sintomas mais graves geralmente são observados em indivíduos imunossuprimidos, podendo ser fatal. Devido à grande diversidade biológica de isolados não-clonais de *T. gondii* circulantes no hemisfério sul do globo terrestre, complicações severas tais como encefalites, miocardites e danos oculares também podem ser observadas em indivíduos imunocompetentes. Recentemente, um estudo revelou que o *T. gondii* está associado ao desencadeamento de doenças neurodegenerativas, e alguns tipos de câncer. Os avanços em imunoinformática colaboram com estratégias para melhorar a busca e identificação de epítomos imunodominantes contidos em proteínas de microorganismos, os quais podem ser reconhecidos pelas células B e T hospedeira. O objetivo deste estudo foi mapear, analisar e selecionar epítomos de células B e T contidos nas proteínas AMA1, GRA7 e SAG1 de *Toxoplasma gondii*, assim como, construir peptídeos quiméricos formados pela junção de epítomos de células B e T, analisar seus potenciais imunogênicos *in silico* e *in vitro*. Foram construídos quatro peptídeos quiméricos, os quais apresentaram afinidades de ligações com moléculas de MHC de murinos e humanos em análises *in silico*. Uma quimera multi-antigênica (TgAGS/BsT) composta por todos os epítomos dessas diferentes proteínas, foi construída, analisada *in silico*, e posteriormente obtida através da expressão em sistema recombinante. O potencial como marcadores de diagnóstico foi confirmado através da reatividade entre os peptídeos quiméricos e IgG de pacientes positivos para Toxoplasmose por ELISA (n=10). Através de estímulos antigênicos em cultura de PBMC de pacientes imunocompetentes IgG negativo e positivo para Toxoplasmose, foi induzida a expressão de CD25⁺ em células CD3⁺ no grupo de pacientes positivos com significância (p<0,05) quando comparados aos pacientes negativos. Além disso, foi verificada a produção de IFN- γ e IL-2 no sobrenadante de culturas estimuladas com os peptídeos quiméricos. Esses achados abrem perspectivas para o desenvolvimento de vacinas e reagentes de diagnóstico para Toxoplasmose através de produtos quiméricos formados por epítomos de células B e T.

Palavras-Chave: Toxoplasmose, Imunoinformática, Epítomos, Vacinas, Imunodiagnóstico.

POTENTIAL VACCINES AND DIAGNOSTIC MARKERS FOR TOXOPLASMOSIS BASED ON CHIMERIC PEPTIDES.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonotic worldwide disease caused by the protozoan *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), which can infect several warm-blooded animals, including humans. The most severe symptoms are usually observed in immunosuppressed patients and could even be fatal. Due to the great biological diversity of non-clonal *T. gondii* isolates circulating in the southern hemisphere of the terrestrial globe, serious complications such as encephalitis, myocarditis and ocular damage can also be observed in immunocompetent individuals. Recently, a study revealed that *T. gondii* is also associated to the delineation of neurodegenerative diseases and a few types of cancers. Advances in immunoinformatics have been contributing with strategies to improve research on immunodominant epitopes contained in proteins from microorganisms, which can be recognized by host B and T cells. The study aims were to screen, analyze and select B and T cell epitopes contained in the *Toxoplasma gondii* AMA1, GRA7 and SAG1 proteins, as well as to construct chimeric peptides formed by the junction of B and T cell epitopes, and to analyze their immunogenic potential *in silico* and *in vitro* approaches. Four chimeric peptides were constructed, which showed binding affinities with murine and human MHC molecules *in silico* analyzes. A multi-antigenic epitopes chimera (TgAGS / BsT) was constructed from *Toxoplasma gondii* AMA1, GRA7 and SAG1 proteins by *in silico* analyzes, and expressed in recombinant system. The potential as diagnostic markers was confirmed by IgG recognition in serum-positive (n=10) for Toxoplasmosis by ELISA. Through antigenic stimuli in PBMC culture from immunocompetent serum-negative and serum-positive Toxoplasmosis persons, the expression of CD25⁺ in CD3⁺ cells was induced in the positive group of persons, with significance results (p<0.05), when compared to negative individuals. In addition, the production of IFN- γ and IL-2 cytokines were found in supernatant cultures stimulated by the chimeric peptides. These findings open perspectives for the development of vaccines and diagnostic reagents for Toxoplasmosis through chimeric products formed by B-cell epitopes and T.

Key-words: Toxoplasmosis, Immunoinformatic, epitopes, vaccines, Immunodiagnostic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico do <i>T. gondii</i>	20
Figura 2. Formas estruturais do <i>Toxoplasma gondii</i>	21
Figura 3. Processo de invasão do <i>T.gondii</i> à células hospedeiras ilustrando as organelas e proteínas do parasito envolvidas nesse processo.	26
Figura 4. Caracterização dos possíveis tipos resposta imunológica gerados em camundongos infectados com <i>T.gondii</i> , tendo implicância de como essa resposta pode ser gerada em humanos.....	29
Figura 5. Tipos de ELISA utilizados para o diagnóstico sorológico na captura de antígenos e ou anticorpos..	33
Figura 6. Captura e complexidade no processamento antigênico através de um esquema generalizado incorporando muitos dos caminhos adicionais que levam para a apresentação do epítopo na superfície celular.....	37
Figura 7. Estrutura 3D da molécula de MHC-II humano, alelo HLA- DRB1*1413.	39
Figura 8. Processo evolutivo no desenvolvimento de vacinas e marcador de diagnóstico contra a Toxoplasmose.	40
Figura 9. Mapa do vetor de clonagem pJET1.2/blunt mostrando o tamanho do plasmídeo, a região do sítio de clonagem onde o produto de PCR é inserido, assim como alguns sítios de restrição próximo desse produto.....	55
Figura 10. Mapa do plasmídeo pET-28a ilustrando as regiões de origem, o sítio múltiplo de clonagem, onde observa-se a preensão de sítos para as enzimas HindIII e BamHI.	59
Figura 11. Presença de colônias (pontos brancos) da bactéria <i>E.coli</i> NEB5- α transformadas com o plasmídeo pET-TEV contendo o gene que codifica a proteína TgAGS/BsT.....	61
Figura 12. Regiões antigênicas (epítomos preditos) e as características físico-químicas foram identificadas na sequência das proteínas de <i>T.gondii</i>	68
Figura 13. Construção dos peptídeos quiméricos TgGRA7/BsT(A), TgSAG1/BsT (B), TgAMA1seqI/BsT (C) e TgAMA1seqII/BsT (D).....	71
Figura 14. Visualização da estrutura do peptídeo TgAMA1seqI/BsT, resultante da modelagem por homologia.....	72
Figura 15. Visualização da estrutura do peptídeo TgAMA1seqII/BsT, resultante da modelagem por homologia.....	72

Figura 16. Visualização da estrutura do peptídeo TgGRA7/BsT, resultante da modelagem por homologia.....	72
Figura 17. Visualização da estrutura do peptídeo TgSAG1/BsT, resultante da modelagem por homologia.....	73
Figura 18. Docking molecular dos modelos propostos (peptídeos) com cada tipo de moléculas do MHC.....	74
Figura 19. Docking ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgAMA1seqI/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos,	75
Figura 20. Docking ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgAMA1seqII/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos,	76
Figura 21. Docking ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgGRA7/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos,	77
Figura 22. Docking ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgSAG1/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos,	78
Figura 23. Esquema de construção da quimera TgAGS/BsT formada através dos epítomos de células B e T contidos nas sequências dos peptídeos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT.....	79
Figura 24. Estrutura 3D da proteína quimérica TgAGS/BsT. São apresentadas estruturas secundárias como alfa-hélice e beta-pregueadas.....	80
Figura 25. Alinhamento final da proteína TgAGS/BsT ilustrando as possíveis regiões imunogênicas na sequência de aminoácidos que compõem essa proteínas, assim como, possíveis sítios de clivagem.....	80
Figura 26. Tradução reversa da sequência de aminoácidos da proteína TgAGS/BsT..	81
Figura 27. Estimativa de peso molecular da proteína recombinante TgAGS/BST após expressão em bactérias <i>E.coli</i> , utilizando o plasmídeo pET-TEV, o qual irá conferir uma cauda de seis histidinas na porção N- terminal da proteína.....	82
Figura 28. Eletroforese de gel em agarose do produto de PCR do gene TgAGS/BsT.....	83
Figura 29. Eletroforese de gel de agarose para a confirmação da clonagem do gene TgAGS/BsT através de digestão enzimática.	84

Figura 30. Subclonagem do gene TgAGS/BsT no plasmídeo de expressão pET-TEV..	84
Figura 31: Expressão da proteína rTgAGS/BsT analisada através de SDS-PAGE.....	86
Figura 32. Análise da ativação de células T para validação dos peptídeos quiméricos in vitro.	89
Figura 33. Detecção da produção de IFN- γ nos sobrenadantes de células estimuladas com os peptídeos quiméricos, realizada pela técnica de citometria de fluxo..	91
Figura 34. Detecção da produção de TNF nos sobrenadantes de células estimuladas com os peptídeos quiméricos,. realizada pela técnica de citometria de fluxo.....	92
Figura 35. Detecção da produção de IL-2 nos sobrenadantes de células estimuladas com os peptídeos quiméricos, realizada pela técnica de citometria de fluxo.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene que codifica a proteína TgAGS/BsT.....	53
Tabela 2. Resultado final da predição de epítomos de células B.....	69
Tabela 3. Predição de epítomos de células T.....	70
Tabela 4. Características físico-químicas dos peptídeos quiméricos contendo epítomos de células B e T.	73
Tabela 5. Comparação das técnicas sorológicas utilizadas nesse estudo.	87
Tabela 6. ELISA utilizando o soro dos pacientes positivos para análise de reatividade no reconhecimento de epítomos por anticorpos de pacientes crônicos assintomáticos para Toxoplasmose.....	87
Tabela 7. Dados de ativação celular mensurados a partir da expressão de CD25 + em células T CD3.....	90
Tabela 8. Dados estatísticos da produção de citocinas nas culturas celulares dos pacientes negativos.....	93
Tabela 9. Dados estatísticos da produção de citocinas nas culturas celulares dos pacientes positivos.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
AMA1	Antígeno de Membrana Apical-1
AgTx	Antígeno Total de <i>Toxoplasma gondii</i>
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD3	Grupamento de diferenciação- 3
CD25	Receptor de interleucina-2
CDC	Centro de Controle de Doenças Infecciosas
DC	Células dendríticas
ECLIA	Eletroquimioiluminescência
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
GRA	Antígenos de Grânulo Denso
GRA-7	Antígeno de Grânulo Denso-7
HLA	Sistema Antígeno Leucocitário Humano
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Inteleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Inteleucina-17
IL-23	Interleucina-23

IL-27	Interleucina-27
IL-33	Interleucina-33
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida
LB	Meio de cultura Luria Bertani
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIC	Proteínas de Micronema
MJ	Complexo de Junção Móvel
MW	Peso molecular
NK	Células Exterminadoras Natural (<i>Natural Killer</i>)
NO	Óxido Nítrico
ORF	Janela de leitura aberta
PAGE	Gel de Eletroforese de Poliacrilamida
PBMC	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
PBS	Tampão Fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Ponto Isoelétrico
PV	Vacúolo Parasitóforo
RE	Retículo Endoplasmático
ROM	Proteases Romboidais
ROP	Proteínas de Roptrias
SAG	Antígenos de Superfície
SAG-1	Antígeno de Superfície-1
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOC	Meio de cultura Caldo Super Ideal
TAP	Enzimas transportadoras associadas ao processamento de antígenos
TCR	Receptores de células T
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TGF- β	Fator de transformação do crescimento- β

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> e aspectos gerais da Toxoplasmose	19
1.2 Processo de invasão à célula hospedeira e resposta imunológica	25
1.3 Tratamento, diagnóstico sorológico e vacinas contra a Toxoplasmose.	31
1.4 Bioinformática aplicada ao desenvolvimento de vacinas e marcador de diagnóstico para Toxoplasmose	36
1.5 Antígenos alvos	41
1.5.1 <i>Antígeno de Membrana Apical-1 (AMA-1)</i>	41
1.5.2 <i>Antígeno de Grânulos Denso-7 (GRA-7)</i>	43
1.5.3 <i>Antígeno de Superfície 1 (SAG-1)</i>	44
2. JUSTIFICATIVA	46
3. OBJETIVOS	47
3.1 Objetivo Geral	47
3.2 Objetivos Específicos	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 Considerações Éticas	48
4.2 Predição de epítomos, construção das quimeras e análises <i>in silico</i>	48
4.2.1 <i>Sequências referências de nucleotídeos e aminoácidos</i>	48
4.2.2 <i>Predição de epítomos de células B contidos nas sequências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1</i>	48
4.2.3 <i>Predição de epítomos T contidos nas sequências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1</i>	49
4.2.4 <i>Construção dos peptídeos quiméricos contendo epítomos de células B e T</i>	49
4.2.5 <i>Estimativa de tamanho, ponto isoelétrico e detecção de possíveis regiões alergênicas</i>	49
4.2.6 <i>Modelagem molecular</i>	50
4.2.7 <i>Docking protéico</i>	51
4.2.8 <i>Alinhamento final da quimera TgAGS/BsT, predição de região de ubiquitinação e tradução reversa</i>	51

4.3 Síntese dos peptídeos quiméricos e da sequência de nucleotídeos que codifica a quimera TgAGS/BsT	52
4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	53
4.5 Clonagem do gene TgAGS/BST ao Plasmídeo pJET 1.2/blunt -Reação de ligação	54
4.6 Transformação de bactérias <i>Escherichia coli</i> XL-1 Blue com o plasmídeo recombinante pJET1.2/blunt contendo o gene TgAGS/BsT	56
4.7 Extração de DNA plasmidial, digestão enzimática e análises dos plasmídeos recombinantes pJET1.2+TgAGS/BsT	57
4.8 Subclonagem do gene TgAGS/BsT no plasmídeo de Expressão pET-TEV e transformação de bactérias NEB5-alpha	58
4.9 Extração de DNA plasmidial e análises por enzima de restrição dos plasmídeos recombinantes pET-TEV+TgAGS/BsT	60
4.10 Transformação da bactéria <i>E. coli Arctic Express</i> com os plasmídeos recombinantes pET-TEV+TgAGS/BsT , expressão e purificação da proteína rTgAGS/BST	61
4.11 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE	63
4.12 Obtenção do antígeno total de <i>Toxoplasma gondii</i> (AgTx)	63
4.13 Triagem sorológica por ECLIA dos participantes da pesquisa	64
4.14 Análise dos peptídeos quiméricos no reconhecimento de anticorpos anti- <i>T.gondii</i> no soro de humanos por ELISA	64
4.15 Estímulo celular com os peptídeos quiméricos.	65
4.16 Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura (CBA)	66
4.17 Análises Estatísticas	67
5. RESULTADOS	68
5.1 Identificação e exclusão de domínios estruturais das sequências referências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1	68
5.2 Identificação de epítomos de células B	68
5.3 Identificação de epítomos de células T	70
5.4 Construção dos peptídeos quiméricos <i>in silico</i> , modelagem molecular e características físico-químicas	71
5.5 <i>Docking</i> protéico entre os peptídeos quiméricos e moléculas de MHC	74
5.6 Construção da proteína quimérica TgAGS/BsT e caracterizações <i>in silico</i>	78
5.7 Amplificação, clonagem e expressão da proteína TgAGS/BsT em sistema recombinante	82
5.8 Análise do potencial como marcador sorológico dos peptídeos quiméricos em reconhecer anticorpos anti- <i>Toxoplasma gondii</i> por ELISA.	86
5.9 Análise <i>in vitro</i> de ativação de células T por estímulos de cultura de PBMC com os peptídeos quiméricos	88
5.10 Análise da produção de citocinas em culturas celulares após estímulo com os peptídeos quiméricos pela técnica de CBA	90
6. DISCUSSÃO	95

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
8. ANEXOS	105
APÊNDICE A -PATENTE DEPOSITADA	105
APÊNDICE B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E TCLE	107
9. REFERÊNCIAS	112

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Toxoplasma gondii* e aspectos gerais da Toxoplasmose

O *Toxoplasma gondii* foi descoberto há mais de 100 anos atrás, concomitantemente por pesquisadores que trabalhavam na África do Norte e no Brasil, em 1908. Nicolle e Manceaux identificaram acidentalmente a presença do *T. gondii* em tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi*, o qual era estudado como reservatório de *Leishmania*, pelo Instituto Pasteur na Tunísia. O termo *Toxoplasma* (do Grego, τόξο= arco, curva; plasma= criatura) foi atribuído devido às características morfológicas observadas nos estágios de taquizoítos do organismo identificado pelos cientistas, e o termo *gondii* oriundo da espécie do hospedeiro estudado. Praticamente no mesmo ano, o cientista Alfonso Splendore, constatou a presença desse protozoário em coelhos no Brasil, a princípio identificado erroneamente como *Leishmania*. Tendo recebido de Nicolle anotações sobre o *Toxoplasma gondii*, Splendore confirmou que realmente se tratava de uma nova espécie de parasito, e que não haveria surpresas caso esse parasito desenvolvesse alguma doença em humanos (DUBEY, 2008; FERGUSON, 2009; INNES, 2010; MEIRA, 2010).

Muitos pesquisadores começaram a estudar o *Toxoplasma gondii* naquela época, e descobriram que se tratava de um parasito intracelular obrigatório, capaz de infectar todos os tipos de animais de sangue quente, incluindo humano, sendo esse o protozoário responsável pela doença denominada Toxoplasmose (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Um levantamento feito por DUBEY, 2008 sumariza os principais pontos de referência na história do *T. gondii*, como: i) A obtenção do primeiro isolado viável do parasito proveniente de animais em 1937 por Sabin e Olitsky; ii) Obtenção do primeiro isolado em humanos em 1939 por Wolf; iii) Primeiro caso fatal da infecção em humanos adultos em 1940 por Pinkerton e Weinman; iv) Constatação que os isolados obtidos de animais e humanos eram idênticos, assim como o primeiro caso infecção em crianças, em 1941 por Sabin. Até então, apenas a forma assexuada do parasito havia sido identificada, apenas na década de 70, foi elucidado o ciclo biológico do parasito (DUBEY, 1996, 2008). A classificação taxonômica do *T. gondii* foi estabelecida em 1977 por Levine, sendo esse protozoário pertencente ao Reino: Protista, Sub-Reino: Protozoários, Filo: Apicomplexa, Classe: Sporozoa, Ordem: Eucoccidiorida, Família: Sarcocystidae, Gênero: *Toxoplasma*, Espécie: *Toxoplasma gondii* (LEVINE, 1977).

A Toxoplasmose é uma das parasitoses mais difundidas no mundo. Foram descritas mais de 350 espécies de animais domésticos e silvestres apresentando parasitismo pelo *T. gondii*, sendo a grande maioria dessas espécies silvestres (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os felinos são os únicos hospedeiros definitivos, devido ao fato do parasito se reproduzir de forma sexuada no intestino delgado desses animais, produzindo assim um estado parasitário resistente ao ambiente (oocistos), os quais são eliminados nas fezes de gatos infectados, contaminando o ambiente, representando dessa forma uma peça chave na disseminação da Toxoplasmose (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Tal processo, caracteriza a fase coccidiana do ciclo de vida do parasito, o qual é heteróxico (Figura 1).

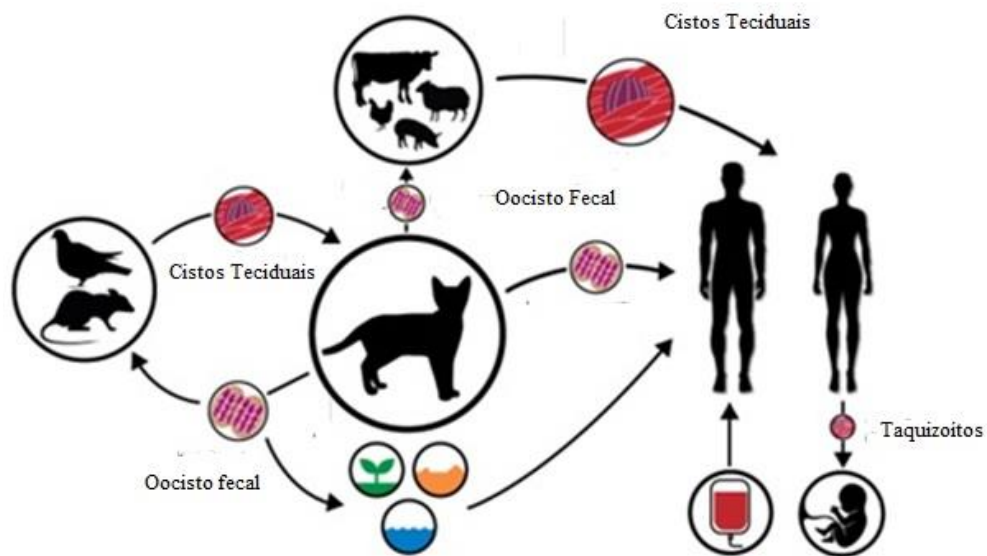


Figura 1. Ciclo biológico do *T. gondii*. Adaptado de (SANTOS, 2016)

Humanos e outros animais, se infectam principalmente por via oral, através da ingestão de cistos teciduais contendo bradizoítos (figura 2.A), presentes na carne de animais infectados, taquizoítos (figura 2.B) contidos no leite, e/ou oocistos previamente liberados no ambiente contendo esporozoítos (figura 2.C), forma infectante oriunda do processo reprodução sexuada do *T. gondii*. Após a ingestão dos cistos ou oocistos, tanto os bradizoítos como os esporozoítos se diferenciam em taquizoítos nos enterócitos do hospedeiro. O taquizoíto é a forma assexuada do parasita que se divide rapidamente dentro de diferentes tipos de células

nucleadas, iniciando a fase aguda da doença. Esse processo de conversão de bradizoítos em taquizoítos é um processo biológico importante, com significância clínica, pois os bradizoítos são menos susceptíveis à medicamentos do que os taquizoítos, e a reativação de bradizoítos em taquizoítos pode resultar nos casos mais graves de Toxoplasmose (DUBEY, 1998; WEISS; DUBEY, 2009).

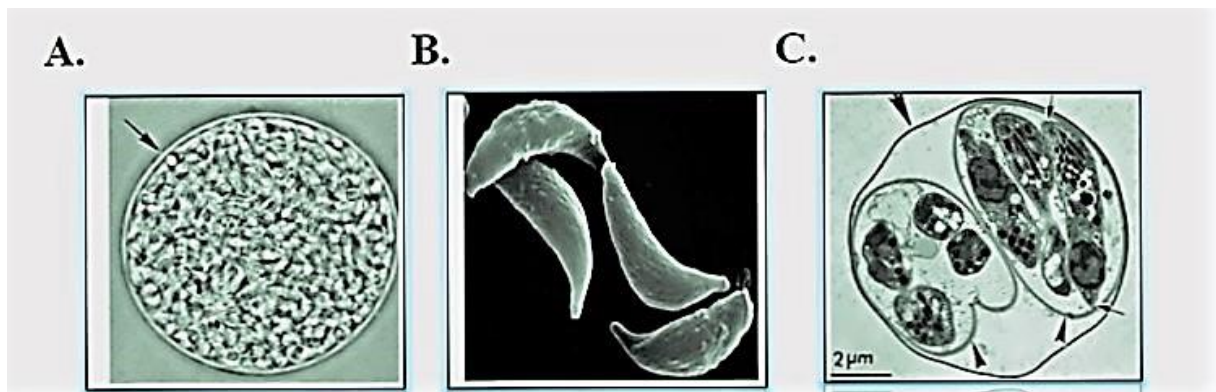


Figura 2: Formas estruturais do *Toxoplasma gondii*. (A). Cisto contendo centenas de bradizoítos. (B). Taquizoítos de *T. gondii* fotografados por microscopia eletrônica. (C). Micrografia eletrônica de transmissão de um oocisto esporulado. Observe a parede fina do oocisto (flecha grande), dois esporocistos (cabeças de seta) e esporozoítos, um dos quais é cortado longitudinalmente (pequenas setas). Fonte: Adaptado de (DEL CARMEN; CALVO; MONDRAGÓN, 2016; DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998)

Os casos mais graves da doença geralmente são observados em pacientes imunossuprimidos (como transplantados e pacientes com AIDS), nos quais a Toxoplasmose representa uma séria causa de morbidade e mortalidade. As complicações clínicas relatadas nesses casos, vão desde encefalites, miocardites, pneumonia, podendo inclusive evoluir ao óbito (DEROUIN; PELLOUX, 2008; EZA; LUCAS, 2006). Sintomatologias severas também são bem frequentes em indivíduos infectados congenitamente, quando ocorre a transmissão vertical do parasito oriunda da gestante para o feto, pela placenta. A Toxoplasmose congênita pode gerar graves consequências como danos oculares (levando à cegueira), coriorretinite, anomalias cardíacas, calcificações intracranianas, hidrocefalia e aborto (DUNN et al., 1999; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SAKI et al., 2015). Outra forma de transmissão de *T. gondii* em humanos é através do transplante de órgãos. A transmissão ocorre quando o paciente receptor, soronegativo para Toxoplasmose, é transplantado recebendo algum órgão contendo cistos do parasito, proveniente de um doador que seja soropositivo (DEROUIN; PELLOUX, 2008; EZA; LUCAS, 2006).

Embora o risco de transmissão de *T. gondii* via transfusão sanguínea em humanos seja baixo, recomenda-se que indivíduos considerados grupo de risco da doença, recebam sangue de indivíduos soronegativos para Toxoplasmose (SINGH; SEHGAL, 2010)

Outro âmbito, também comprometido pela doença, é a pecuária, onde a Toxoplasmose gera um impacto econômico, principalmente em ovinos e caprinos, gerando danos como abortos, má-formação fetal e animais fracos. Além disso, há o grande risco de contaminação de humanos através da ingestão de carnes e derivados contaminadas com cistos contendo bradizoítos do parasito e outros derivados (DUBEY, 1996).

Os dados epidemiológicos da doença variam muito entre países e regiões do Brasil, pois fatores climáticos, sociais e higiênicos desempenham um papel importante na disseminação da doença (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). De acordo com o Centro de Controle de Doenças Infecciosas (CDC), a Toxoplasmose é considerada uma das doenças infecciosas parasitárias negligenciadas, em um grupo das cinco doenças parasitárias (Toxoplasmose, Doença de Chagas, Cisticercose, Toxocaríase e Tricomoniase) as quais receberam pouca atenção, medidas de prevenção e tratamento, tornado-se assim alvo do CDC para ações de saúde pública. Nos Estados Unidos estima-se que 11% da população acima de 6 anos de idade foram infectadas pelo *T. gondii* (CDC, 2007). No Brasil, a Toxoplasmose é amplamente distribuída em humanos e animais, possuindo alta prevalência principalmente em humanos. Dados extraídos do Ministério da Saúde apontam que os índices de prevalência de anticorpos contra o parasito variam de 54% na Região Centro-Oeste a 75% na Região Norte. Essa prevalência aumenta de acordo com a idade, sendo igualmente distribuída entre os dois sexos (SAÚDE, 2007).

O estudo conduzido por Dubbey e colaboradores em 2012, no Brasil, mostrou que cerca de 50% das crianças do ensino fundamental e 80% das mulheres em idade fértil possuem anticorpos contra *T. gondii*. Os riscos para as mulheres não infectadas adquirirem Toxoplasmose durante a gravidez e a transmissão fetal são considerados altos, devido ao meio ambiente estar possivelmente contaminado com oocistos. O percentual da Toxoplasmose congênita em crianças infectadas também é alto. Estima-se, através de dados limitados, que possivelmente cerca de 2649 crianças nascerão com Toxoplasmose congênita anualmente no Brasil (DUBEY et al., 2012).

Urbanização e infraestrutura sanitária precárias representam outro aspecto importante para a disseminação da infecção por *T.gondii*, a frequência da doença aumenta ainda mais em comunidades mais carentes, onde há níveis reduzidos de condições sanitárias, educação e cultura, o que implica diretamente nos hábitos higiênicos da população. A falta de recursos financeiros e atenção pelos governantes, faz com que essas pessoas estejam em constante risco de contaminação através da aquisição de alimentos e água de fontes não seguras para o consumo. Como exemplo disso, um estudo de soroprevalência realizado no norte do estado do Rio de Janeiro, mostrou uma soroprevalência de 84% das pessoas que possuía menor nível sócio-econômico, quando comparadas a 62% e 23%, com aquelas que possuíam nível sócio-econômico considerados médio e alto, respectivamente (GARCIA BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003).

Esses dados são preocupantes tendo em vista o atual cenário político-social do país, no qual além das restrições de recursos financeiros para assistência às comunidades, há também escassez de verbas para os setores da saúde e pesquisa científica, o que tem limitado também a contribuição dos pesquisadores com a problemática que possa vir a ser gerada diante desses dados epidemiológicos. Tal cenário pode ser agravado em situações que levem o indivíduo a um quadro de imunossupressão, como HIV e diversos tipos de câncer, permitindo dessa forma a reativação do *T. gondii*, o qual agirá de forma oportunista, desencadeando uma infecção latente, podendo ser fatal para o hospedeiro (WANG et al., 2017). Não bastando, estudos têm mostrado uma grande diversidade genotípica de cepas do patógeno isoladas em animais e humanos no Brasil, o que se torna mais um agravante no contexto da doença, pois além da genética do hospedeiro ser um fator importante para a patogenia da Toxoplasmose, a genética da cepa também implica no desencadeamento de quadros severos da doença. Na América do Norte e na Europa, os tipos de cepas de *T. gondii* são conhecidos e bem caracterizados de acordo com o grau de virulência, distintos em três linhagens clonais. A cepa RH, isolada em 1941 por Sabin, de um paciente com quadro de encefalite gerado pela Toxoplasmose, representa o tipo I, sendo caracterizada por possuir alta virulência, associada com os casos mais severos em humanos. Em camundongos, essa cepa não é cistogênica sendo altamente letal em linhagem susceptível Balb/c. As cepas ME-49 e VEG, são classificadas como tipo II e III respectivamente, consideradas avirulentas e cistogênicas em camundongos, estando relacionadas mais com os quadros crônicos da doença. Esses três tipos de cepas já foram

isolados em pacientes imunossuprimidos com Toxoplasmose cerebral no Brasil, assim como em animais, o que implica que os diversos isolados atípicos de *T. gondii* encontrados no Brasil são formas variantes dos tipos I, II e III de cepas encontradas no hemisfério norte do globo terrestre (DE MELO FERREIRA et al., 2006; KHADEM VATAN et al., 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012; SABIN, 1941; SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005; SILVA et al., 2017).

Na maioria dos casos, um adulto saudável, ou apresenta infecção assintomática, ou desenvolve uma forma branda ou auto-limitada doença, caracterizada por febre e sintomas semelhantes a mononucleoses. No entanto, é claro que cepas virulentas (por exemplo, cepas contendo tipo I ou alelos atípicos) estão associadas ao aumento da frequência e severidade da Toxoplasmose humana. Cepas altamente virulentas podem causar doenças graves em pacientes imunocompetentes, como distúrbios cerebrais, esquizofrenia, levando a uma reconsideração sobre os quadros clínicos que podem ser gerados pela Toxoplasmose (ŠTAJNER et al., 2013; XIAO; YOLKEN, 2015). Muito embora ainda divergente na literatura, mas levando em consideração as complicações que a doença pode gerar, mais precisamente aos distúrbios neurológicos, pesquisadores têm buscado compreender uma possível associação entre pacientes com toxoplasmose cerebral e a doença de Alzheimer. Um artigo publicado recentemente, revelou que proteínas oriundas do *T. gondii* podem modular genes envolvidos nos processos de doenças neurodegenerativas, como *Alzheimer* e *Parkinson* (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2017), além de aumentar o risco de epilepsia devido a interferências geradas na comunicação com alguns neurônios. Outros estudos têm alertado que o *T.gondii* pode estar associado a expressão de mais de 1200 genes, os quais podem desencadear alguns tipos de câncer, enfatizando mais ainda a importância da doença (NGÔ et al., 2017).

Corroborando com essa hipótese, desde 2006, foram registrados surtos de Toxoplasmose em várias regiões do Brasil, nos quais foram observadas manifestações agressivas da doença em indivíduos imunocompetentes. Tais sintomatologias estão associadas diretamente à cepas atípicas do parasito, as quais evidentemente estão associados às complicações severas e patologias variáveis da Toxoplasmose em humanos saudáveis (DE MOURA et al., 2006; EKMAN et al., 2012; HEUKELBACH et al., 2007; SANTOS, 2010; SOBANSKI et al., 2013; VAUDAUX et al., 2010).

Os primeiros 100 anos de pesquisa sobre a Toxoplasmose revelaram algumas idéias fascinantes sobre a biologia desse parasito, a facilidade com que o parasita pode ser cultivado em laboratório e a gama de modelos animais disponíveis, em laboratório, fizeram de *T. gondii* um organismo muito acessível para os cientistas estudarem. No entanto, passados mais 118 anos desde a descoberta do *T. gondii* ainda há muitos desafios importantes a serem desvendados na elucidação da doença, para que possam ser estabelecidas estratégias que contribuam para o controle da doença, tanto em animais como em humanos (INNES, 2010).

1.2 Processo de invasão à célula hospedeira e resposta imunológica

O processo de invasão do parasito à célula hospedeira é cuidadosamente orquestrado por organelas e diferentes classes de proteínas secretadas pelo parasito. O *T. gondii* infecta todos os tipos de células nucleadas. A primeira etapa do processo de invasão (figura 3) consiste na adesão do taquizoíto à superfície da célula hospedeira. Nesse processo participam as proteínas de superfícies, SAGs (Antígenos de superfície), as quais são distribuídas de forma abundante na superfície dos taquizoítos, permitindo assim o posicionamento do parasito de forma otimizada por interações laterais de baixa afinidade com a superfície da célula hospedeira (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Ainda no processo de adesão, atuam as proteínas de micronema (MICs), as quais estabelecem uma ligação direta com o sistema actina-miosina do parasito, possibilitando sua motilidade. Essa interação precede a ligação apical, a qual envolve um mecanismo dependente de cálcio para acúmulo das MICs na porção apical do parasito (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; HUNTER; SIBLEY, 2012). Em associação com uma terceira classe de proteínas, proteínas do pescoço de roptrias (RONs), as MICs formam o complexo de junção móvel (MJ), o qual é uma aposição em anel entre as membranas plasmáticas do parasita e do hospedeiro, permitindo a migração durante a sua entrada na célula hospedeira. O MJ é um complexo segregado formado a partir da secreção da proteína TgAMA1 (derivada de micronema e de proteínas transmembranar na superfície do parasita) e um complexo de proteínas do pescoço de roptria (TgRON 2/4/5/8) (PAPOIN et al., 2011).

Simultaneamente ou a partir daí, as proteínas de roptrias (ROPs) são injetadas no citoplasma pelo local de invasão, onde são posteriormente direcionadas para o núcleo celular da célula hospedeira. As proteases romboidais do parasito (ROM) aparecem nesse momento, sendo responsáveis pela distribuição de MICs na parte posterior do parasito. Dessa forma, o

parasita penetra ativamente, puxando MICs e ou o anel AMA1-RON, invaginando assim a membrana plasmática do hospedeiro para criar o vacúolo parasitóforo (PV) (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

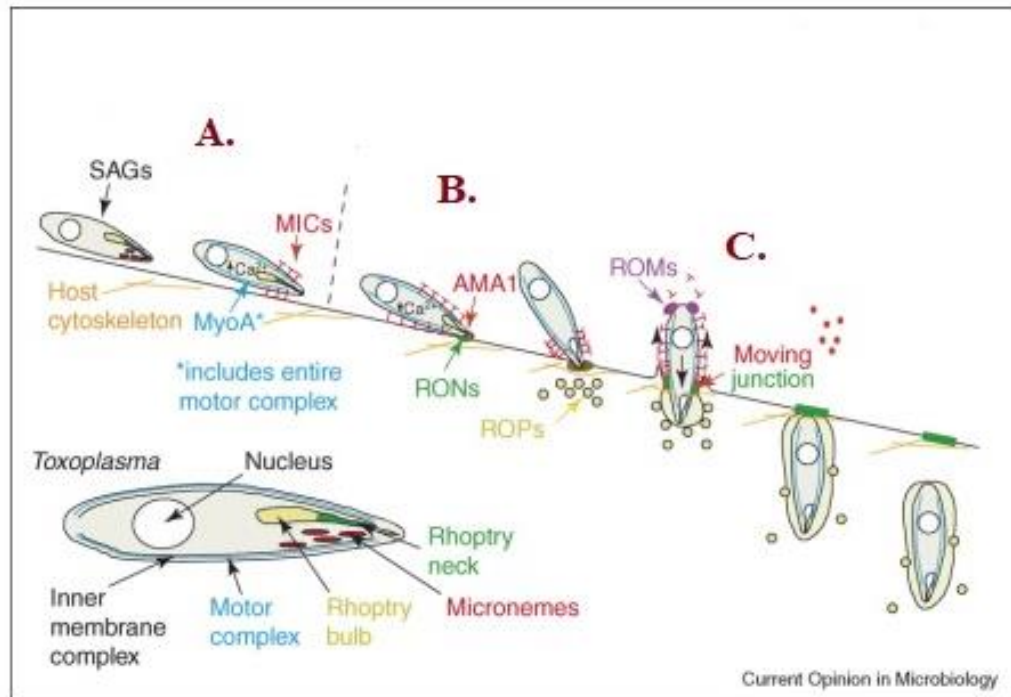


Figura 3: Processo de invasão do *T.gondii* à células hospedeiras ilustrando as organelas e proteínas do parasito envolvidas nesse processo. (A). Processo inicial de adesão e motilidade. (B). Processo de adesão e formação do complexo de junção móvel. (C). Processo de penetração do parasito e formação do vacúolo parasitóforo. Fonte: Adaptado de (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007).

O Vacúolo Parasitóforo (PV) resiste à acidificação e à fusão com endossomas e lisosomas e também recruta as mitocôndrias e retículo endoplasmático do hospedeiro, o que pode ajudar na aquisição de nutrientes para o parasito. A extensa modificação do PV durante a invasão sugere que o parasito module funções da célula hospedeira, favorecendo sua sobrevivência no meio intracelular. Após vários ciclos de divisão mitótica, os parasitas oriundos das células filhas saem ativamente da célula hospedeira e invadem as células vizinhas. A membrana do vacúolo é formada principalmente por lipídios da membrana plasmática da célula hospedeira: somente 20% dos lipídios são secretados pela próprio parasito, além disso, os constituintes antigênicos do parasito ficam voltados para o interior do vacúolo, não sendo

reconhecidos pelo sistema imunológico, sendo essa uma forma de evasão da resposta imune competente do hospedeiro (HUNTER; SIBLEY, 2012; NOLAN; ROMANO; COPPENS, 2017; PACHECO-SOARES; DE SOUZA, 1998).

Em paralelo ao processo de invasão, uma resposta imune complexa é montada pelo organismo hospedeiro. Proteínas e outros componentes oriundos do parasito desencadeiam os mecanismos imunes mediados por respostas celulares e humorais, os quais são importantes para a proteção do hospedeiro, sendo que a resposta imune inata proporciona mecanismos cruciais no estabelecimento da relação parasito-hospedeiro, através da produção de citocinas e ativação celular, que podem desencadear uma resposta imune capaz de eliminar o parasito (KAPER; BRIEN; NATARO, 2014).

A maior parte dos estudos sobre a resposta imune do hospedeiro foram realizados em camundongos, utilizando cepas de *T. gondii* do tipo II, as quais possuem virulência intermediária, permitindo assim, a elucidação dos mecanismos imunes durante as fases agudas e crônicas da infecção (HUNTER; SIBLEY, 2012). Células do sistema imune inato, também conhecidas como células fagocitárias e células apresentadoras de antígenos (APC), tais como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DC) migram para o local da infecção, internalizam taquizoítos e/ou reconhecem os antígenos do parasito, os quais são apresentados à linfócitos T via MHC (moléculas do complexo principal de histocompatibilidade), dando origem a produção de citocinas e quimiocinas, tais como interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). A IL-12, por sua vez, estimula macrófagos a produzir mais IL-12, assim como, em sinergismo com TNF- α , ativam células *natural killer* (NK) para a produção de interferon- γ (IFN- γ). O IFN- γ juntamente com o TNF- α estimulam macrófagos a produzirem radicais livres e óxido nítrico (NO), capacitando-os a promover a morte intracelular do parasito (DENKERS; GAZZINELLI, 1998a; SCHARTON-KERSTEN et al., 1995). Sendo a IL-12 uma citocina importante tanto para a resposta imune inata quanto resposta imune adaptativa (WATFORD et al., 2003), a alta concentração de IL-12 e TNF- α liberados pelas APCs assim como, segmentos dos antígenos previamente capturados e processados, são expostos via MHC-I e MHC-II, ativando respectivamente, linfócitos do tipo T CD8+ e T CD4+, os quais possuem papel importante na resposta imune de proteção contra o patógeno (WANG et al., 2016).

Células T CD8⁺ efetoras citotóxicas atuam na lise das células infectadas, expondo os parasitos extracelularmente, antes protegidos no interior do PV, contribuindo na proteção contra a formação de cistos teciduais. Para a geração destas células T CD8⁺ efetoras é requerida a participação da sub-população de células T CD4⁺ (auxiliares ou “*helper*”) (DENKERS; SHER; GAZZINELLI, 1993).

De acordo com o ambiente propiciado por citocinas produzidas logo após o contato com o antígeno, os linfócitos T CD4⁺ ainda não estimulados são influenciados pelas citocinas, diferenciando-se em células Th1, Th2, Treg, Th17 entre outros tipos, com cada subconjunto passando a produzir um perfil diferente de citocinas. Portanto, nesse momento destacam-se a importância da IL-12 e IFN- γ na diferenciação da resposta do tipo Th1 (DENKERS; GAZZINELLI, 1998a; GAZZINELLI et al., 1991). A IL-12 irá direcionar linfócitos T CD4⁺ para um perfil Th1, sendo auxiliada pelo IFN- γ , o qual inibe a diferenciação de T CD4⁺ para um perfil Th2. No entanto, Gazzinelli e colaboradores (1996) mostraram que IL-10, produzida pelas células T polarizadas, atua através de um mecanismo imunorregulatório, possui um papel vital na regulação sistêmica na resposta de IFN- γ em camundongos C57BL/6 seguida de infecção intraperitoneal de *Toxoplasma gondii*. A linhagem C57BL/6 apresentou elevados níveis de IL-12 e conseqüentemente o aumento de IFN- γ e TNF- α com intensa inflamação hepática e necrose tecidual. A depleção transitória de células T CD4⁺ ou paralização da produção de IL-12 pelas células dendríticas é o suficiente para reverter o quadro patológico nesses camundongos com deficiência de IL-10, sugerindo que esta citocina atue através de um mecanismo de controle do quadro imunopatogênico gerado pela produção de IL-12 (GAZZINELLI et al., 1996). Há portanto, um equilíbrio entre as respostas celulares dos tipos Th1 e Th2, para que se tenha uma resposta imune protetora e eficaz contra o *T.gondii*.

Estudos mais recentes sugerem a importância do balanço da resposta do tipo Th17, gerada por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, na produção de IL-17, estimulados por citocinas como TGF- β , IL-6, IL-23, no equilíbrio de uma resposta inflamatória assim como resposta de proteção (Figura 4). Guiton e colaboradores (2010), mostraram que a infecção oral por *T.gondii*, induzida em camundongos da linhagem C57BL/6, aumenta a expressão de IL-17 contribuindo para a resposta inflamatória, sendo que a neutralização de IL-17 tem efeito protetor parcial contra a Toxoplasmose fatal associada com inflamação (GUITON et al., 2010). A produção de IL-27 durante a infecção por *T. gondii* pode complementar os efeitos imunorreguladores da IL-10 e do TGF- β na contenção das respostas das células T em geral e das respostas Th17 (GADDI; YAP, 2007).

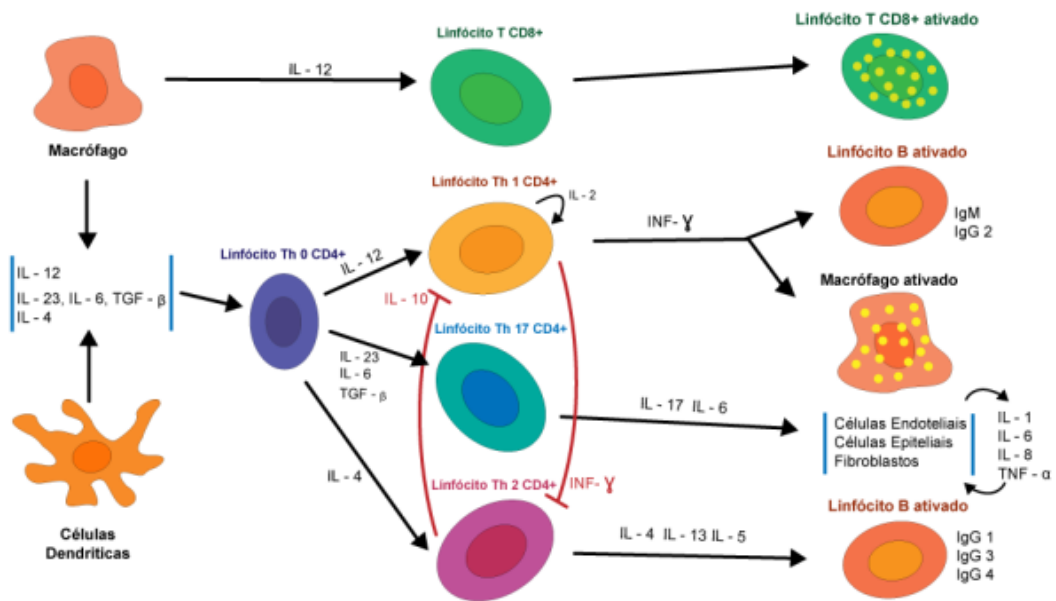


Figura 4. Caracterização dos possíveis tipos resposta imunológica gerados em camundongos infectados com *T.gondii*, tendo implicância de como essa resposta pode ser gerada em humanos. Fonte: Revisado por (SANTOS, 2016).

E por fim, assim como a resposta imune celular, a resposta imune humoral também apresenta importância no controle da parasitemia através de anticorpos gerados por células B (plasmócitos) e também por células T CD4⁺ auxiliares, ativadas por citocinas como a IL-4, IL-13 e IL-15, para a mudança de classes das imunoglobulinas de linfócitos B (GADDI; YAP, 2007). Os anticorpos (IgM e IgG) contra *T.gondii* são produzidos de maneira rápida e intensa, sendo capazes de lisar as formas extracelulares do parasita na presença de complemento e de mediar a fagocitose dos mesmos (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). O papel dos anticorpos para proteção do hospedeiro contra a infecção causada por *T. gondii* foi demonstrado em estudos utilizando camundongos do fenótipo de μ MT, os quais são deficientes em células B. Esses camundongos desenvolveram respostas celulares e produção de IFN- γ aparentemente normais, mas sucumbiram à infecção dentro de 3 a 4 semanas após o desafio com cepas do parasito, associadas a alta carga parasitária encontrada no sistema nervoso central desses animais. Esse aumento de susceptibilidade está associado diretamente a falta dos anticorpos, uma vez que a transferência passiva de anticorpos, conferiu proteção à camundongos deficientes de células B (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012; FILISSETTI; CANDOLFI, 2004; JOHNSON; SAYLES, 2002).

Dessa forma, não havendo eliminação total do parasito por ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, utilizando a membrana do vacúolo parasitóforo como a base para a parede de cistos teciduais, os quais não são reconhecidos pelo sistema imunológico do hospedeiro, podendo ser encontrados no cérebro, olhos e outros órgãos do hospedeiro. Nesse estágio da infecção, conhecida como infecção latente ou crônica, as pessoas infectadas não desenvolvem sintomatologias da doença (CHEW et al., 2012; SINAI, 2008).

Em humanos, os grupos de citocinas das respostas Th1 (IFN- γ , IL-12, IL-2) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) constituem duas respostas polares do sistema imunológico. A hipótese encaminhada aqui liga estes subgrupos de citocinas induzidas às várias formas clínicas de Toxoplasmose humana. A Toxoplasmose ocular em pacientes imunocompetentes pode ser atribuída a uma hiper-resposta Th1, enquanto que a Toxoplasmose congênita, a encefalite toxoplasmática (em pacientes imunodeficientes) e a Toxoplasmose crônica ativa (com linfadenopatia persistente) caracterizariam-se por uma resposta predominantemente Th2 (GÓMEZ MARÍN et al., 1997). Em adição, a resposta Th17 também apresenta um papel importante de proteção e está relacionada ao aborto causado durante a Toxoplasmose congênita. Em estudo realizado por Silva e colaboradores, 2014, foi observado através de ensaios *in vitro* utilizando sangue de mulheres (gestantes e não-parturientes) com sorologia positiva e negativa para Toxoplasmose, os quais foram posteriormente estimulados em cultura celulares através da adição de taquizoítos de *T. gondii*, que o parasito induziu a síntese de IL-5, IL-10 e TNF- α em células de mulheres parturientes soronegativas, e produção de IL-5 e IL-10 por células de mulheres soropositivas e não grávidas. Foram observados baixos níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam IL-17 em culturas de células de mulheres parturientes e não-grávidas soronegativas e soropositivas que foram estimuladas com taquizoítos, enquanto que a análise do CD4⁺ e CD8⁺ em populações de células T apresentaram um maior nível de células T CD4⁺ em comparação com células T CD8⁺. Esses resultados sugerem que o padrão de citocinas e os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ que expressam IL-17 podem ter papéis importantes na resposta inflamatória perante a infecção por *T. gondii*, contribuindo assim para a manutenção da gravidez e controle da invasão parasitária e replicação (SILVA et al., 2014).

Embora a maioria dos estudos sobre o mecanismos de resposta imune de proteção sejam realizados em camundongos, e esses mecanismos podem ser diferentes de acordo com outras espécies animais e o tipo de cepa que infecta o hospedeiro, os estudos previamente citados servem como bases para a elaboração de estratégias para o controle da doença, tais como, a

geração de vacinas e/ou imunoterapêuticos, capazes de gerar respostas celulares (Th1, Th2 e Th17) balanceadas e de memória, assim como, a produção de anticorpos específicos que garantam a proteção do hospedeiro e possam ser detectados com maior especificidade, contribuindo dessa forma também, com a melhoria do diagnóstico da doença.

1.3 Tratamento, diagnóstico sorológico e vacinas contra a Toxoplasmose.

Atualmente o controle dessa parasitose depende basicamente de medidas profiláticas que impeçam a disseminação dos oocistos no ambiente, assim como maiores cuidados na aquisição de água e consumo de carne e derivados que possam estar contaminados, uma vez que não aja uma vacina segura e eficaz contra a Toxoplasmose.

O tratamento da Toxoplasmose é feito por fármacos antiparasitários e antibióticos geralmente nos quadros em que há maiores manifestações da doença. As drogas utilizadas no tratamento da Toxoplasmose são sulfadiazina (500mg de 6/6 horas por 45 dias em quadros de Toxoplasmose ocular, sendo a dose aumentada até 1,5g em pacientes imunossuprimidos e gestantes), sulfametoxazol, pirimetamina, espiramicina 1g de 8/8 horas em gestantes e clindamicina. O ácido folínico (15 mg) é adicionado aos esquemas que contenham a pirimetamina (50mg de 24/24 horas) devido à mielotoxicidade. A prednisona é indicada quando há comprometimento macular, papilar, no feixe papilomacular ou vitreíte. Em gestantes com suspeita de Toxoplasmose aguda, inicia-se o tratamento com espiramicina, e tenta-se confirmar o diagnóstico de infecção fetal pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no líquido amniótico (LANI, 2016). Estudos sugerem a associação da azitromicina juntamente com a sulfadiazina como fármacos eficientes para o controle de dois isolados atípicos de *T. gondii* encontrados no Brasil (RIBEIRO et al., 2017). No entanto, esses medicamentos possuem alta toxicidade, podendo gerar diversos efeitos colaterais, assim como resistência de bactérias e do próprio parasito, tendo em vista a grande diversidade de genótipos de *T. gondii* circulantes no hemisfério sul do globo terrestre, o que justifica a necessidade de novas medidas profiláticas para o controle da Toxoplasmose, como o desenvolvimento de vacinas. Outro ponto importante, é que a doença deve ser tratada o mais rápido para evitar possíveis sequelas de longo prazo que possam ser geradas pelo parasito. Para tal, podem ser estabelecidas estratégias que contribuam para um diagnóstico sorológico da doença mais específico e eficaz.

O padrão ouro de diagnóstico da Toxoplasmose tanto em animais como humanos baseia-se na sorologia, a qual continua sendo a principal abordagem para estabelecer um diagnóstico mais preciso da doença, devido ao baixo custo, boa sensibilidade, especificidade e fácil reprodutibilidade. São diversas as técnicas utilizadas na captura de anticorpos específicos contra *T. gondii*, dentre elas o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Imunofluorescência Indireta (IFA), Teste rápido por imunocromatografia (ICT), Western blotting, entre outros (COSTA et al., 2008; LIU et al., 2015). Posteriormente a confirmação do diagnóstico sorológico do indivíduo, através da detecção e mensuração de anticorpos do tipo IgM, IgA e IgG, específicos contra o parasito, dependendo do quadro clínico do paciente, são requeridos outros tipos de exames de diagnóstico, tais como de imagem, através das técnicas de tomografia, ressonância magnética, ultrassonografia, afim de detectar a presença de cistos do parasito em quadros agudos de Toxoplasmose cerebral e ocular (LIU et al., 2015).

Além disso, em gestantes, devido às limitações das técnicas sorológicas para identificar se houve a transmissão para o feto, são requeridas técnicas moleculares, como PCR para tentar detectar a presença do parasito, em fluidos como o liquido amniótico, através da amplificação de genes específicos do parasito, como o gene B1, os genes que codificam as proteínas SAGs do parasito, entre outros. Esse método é vantajoso e auxilia o diagnóstico sorológico pois possibilita a detecção do DNA de *T.gondii* em baixas concentrações (DONAHOE et al., 2015; LIU et al., 2015). No entanto, apenas o diagnóstico molecular não é aplicável a rotina sem a prévia confirmação de infecção por sorologia, pois para tal, é preciso que o parasito esteja circulante no sangue do paciente em quantidades significativas. Uma vez encistado, ou até mesmo eliminado por ação do sistema imunológico, não é possível que haja a detecção do parasito por técnicas moleculares. Atualmente, a maioria dos laboratórios utilizam o teste de Eletroquimioluminescência (ECLIA) e ELISA, através de kits comerciais, para o diagnóstico de infecção humana. São vários os tipos de ELISA utilizados, os quais permitem a detecção de antígenos e ou anticorpos contra *T. gondii*, tais como o ELISA direto, sanduíche, por competição e indireto, neste último, o antígeno é adsorvido a uma fase sólida e a amostra contendo anticorpos é adicionada, a reação antígeno-anticorpo é visualizada pela adição de um anticorpo secundário ligado a uma enzima, gerando uma reação de cor, a qual pode ser quantificada (Figura 5)(LIU et al., 2015).

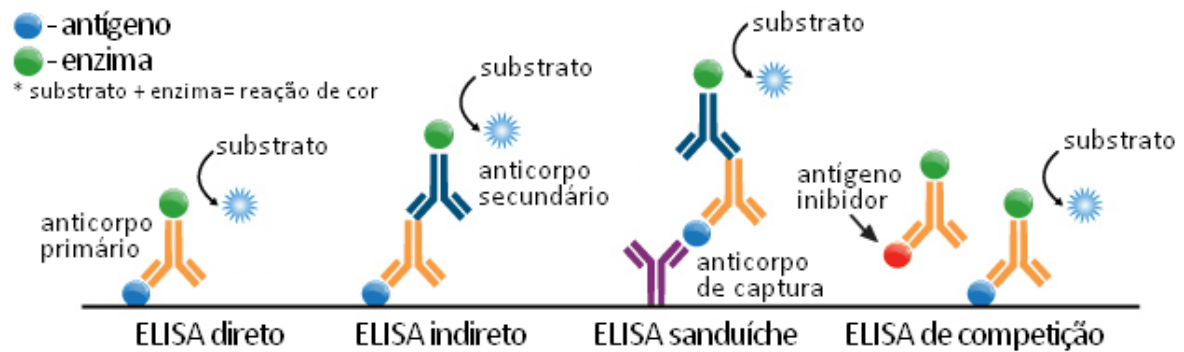


Figura 5. Tipos de ELISA utilizados para o diagnóstico sorológico na captura de antígenos e ou anticorpos. Fonte: (CAMARA, 2013).

O teste de avidéz de IgG, realizado pela técnica de ELISA, é o mais indicado atualmente para diagnóstico laboratorial da Toxoplasmose. Esse método é baseado na diferença na avidéz (estabilidade entre o complexo antígeno e anticorpo) de anticorpos produzidos durante a fase aguda da doença (fraca interação antígeno/anticorpo) e os anticorpos produzidos durante a fase crônica (forte interação antígeno/anticorpo). Sendo possível a distinção das fases aguda e crônica da doença (MEIRA et al., 2008). Contudo, a grande maioria dos kits de diagnóstico sorológicos disponíveis para a rotina, usam antígenos de lisado de taquizoíta (STAg) para revestir a fase sólida, o qual apresenta grande sensibilidade na detecção de anticorpos. O lisado de *T. gondii* é obtido através da lavagem da cavidade intraperitoneal de camundongos infectados com taquizoítos da cepa RH. Por isso seus resultados podem variar bastante devido à dificuldade de padronização e baixo grau de pureza, que leva à interpretação duvidosa dos resultados, pois pode haver reações cruzadas com outros microorganismos. Uma alternativa para garantir uma melhor especificidade ao método, seria o uso de proteínas recombinantes do parasito, tendo como vantagens o uso de um antígeno preciso e de fácil padronização (HOLEC-GASIOR, 2013; LIU et al., 2015).

Em paralelo, no que tange à vacinas, não existem vacinas comerciais disponíveis para animais e seres humanos, as quais não apresentem risco de reativação da doença e que garanta uma resposta imune a qual confira proteção total do indivíduo contra qualquer tipo de isolado de *T. gondii* (VERMA; KHANNA, 2013). Semelhante ao que foi relatado sobre o diagnóstico sorológico da Toxoplasmose, as primeiras tentativas de obtenção de vacina contra a doença foram baseadas em cepas atenuadas do parasito. O desenvolvimento de uma vacina contra o *T. gondii* é uma possibilidade viável já que indivíduos naturalmente infectados desenvolvem imunidade intensa e duradoura contra o agente, sendo capaz de protegê-los contra subsequentes

reinfeções, já tendo sido demonstrado que o mesmo grau de resposta pode ser obtido com a administração de formas atenuadas do parasito. O uso de vacinas atenuadas em humanos é improvável, uma vez que é composta por taquizoítos vivos, podendo estabelecer infecções crônicas ou reverter a um estado patogênico e causar doença aguda. Desta forma, para desenvolver uma vacina contra a Toxoplasmose torna-se essencial a identificação de imunógenos e o delineamento de protocolos de imunização que utilizem somente componentes específicos deste protozoário (MENDES, 2006).

A única vacina comercial que existe disponível contra a Toxoplasmose, é a TOXOVAX, a qual compreende taquizoítos vivos da cepa S48 irradiados, sem a habilidade de se diferenciar em bradizoítos, resultando em cistos de tecido em animais (GARCIA, 2009). A vacina é licenciada apenas para uso em ovinos e caprinos e deve ser administrada antes do acasalamento. Em paralelo, nos EUA, a cepa T-263 de *T. gondii* é um mutante vivo projetado para reduzir ou prevenir a eliminação de oocistos fecais de felínos. Os ensaios de campo com esta vacina foram realizados em fazendas de suínos dos EUA. Os gatos foram presos, vacinados e liberados. Após a vacinação de gatos residenciais, a seroprevalência de *T. gondii* diminuiu nos porcos cultivados, sugerindo menos contaminação ambiental com oocistos e, portanto, menor risco de infecção para os porcos. No entanto, existem algumas preocupações quanto à sua segurança por se tratar de uma vacina viva, com taquizoítos atenuados, há o risco desses reativarem e infectarem humanos. Há relatos de vacinação de gatos usando cepas de *T. gondii* modificadas por irradiação, tratamento químico, antígenos recombinantes selecionados e novos sistemas de entrega, incluindo um veículo de vírus do herpes vírus felino. Em busca de aprimoramento de tais medidas preventivas e com o estudo do genoma, o avanço de ferramentas moleculares e bioinformática, tem se tornado viável e necessário para o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz, baseada em antígenos recombinante do parasito, a qual possa servir de modelo para uma vacina contra todos os tipos de cepas do parasito pois esta contemplará todas as formas de manifestações clínica da doença (GARCIA, 2009; VERMA; KHANNA, 2013).

Diversos estudos com proteínas recombinantes, excretadas/secretadas pelo parasito tanto na fase de invasão como durante o processo crônico da doença, vêm apresentando resultados satisfatórios como possíveis alvos para aumentar a especificidade do diagnóstico sorológico, assim como, possíveis candidatos à vacinas. Um exemplo disso, é a proteína recombinante rSAG1 de *T.gondii*, que além de ser empregada no diagnóstico sorológico

aumentando a especificidade do método, por se tratar de um antígeno abundante na superfície do parasito e conservado em todas as cepas de *T.gondii*, demonstrou ser uma proteína que induziu uma resposta imune e que conferiu proteção em animais imunizados (ABDULLAH, 2010). Outros estudos com vacinas de DNA contendo o gene de antígenos, como das proteínas de Roptrias, também apresentaram proteção parcial em camundongos contra a cepa RH, a qual é letal em murinos (WANG et al., 2012).

Devido à complexidade dos parasitos intracelulares, como *T. gondii*, o qual apresenta uma pluralidade a nível antigênico, a capacidade de apresentação de antígenos é amplamente variável entre diferentes indivíduos. Desse modo, uma vacina que possua múltiplos antígenos é provável que seja mais eficaz do que uma que contenha apenas uma classe de antígeno (CONG et al., 2013). Vacinas compostas por proteínas de vários estágios capazes de proteger seres humanos contra infecção e reativação da doença, seria uma estratégia útil nesta abordagem.

Em adição, o desenvolvimento de um marcador de diagnóstico composto por fragmentos conhecidos de diversos antígenos do parasito pode aumentar a acurácia dos kits de diagnóstico sorológico e também permitir o desenvolvimento de novos testes capazes de discriminar a infecção aguda da crônica. Para isso, o produto recombinante deve conter várias regiões imunodominantes de marcadores moleculares específicos reconhecidos por anticorpos anti-Toxoplasma na fase aguda ou crônica (HOLEC-GASIOR, 2013).

Os antígenos protéicos não apenas contêm a estrutura dos epítomos de células B e T, utilizados pelos linfócitos B, T e células apresentadoras de antígenos para mediar as respostas imunológicas, mas também podem conter estruturas desfavoráveis para o desenvolvimento de vacinas que gerem respostas imunes específicas, assim como, uma maior precisão no diagnóstico sorológico (WANG et al., 2016). Utilizando abordagens inovadoras, ferramentas biotecnológicas, assim como antígenos candidatos, previamente estudados quanto ao grau de conservação em diferentes cepas do parasito, potencial imunogênico, se torna possível elaborar estratégias de controle e contribuir no contexto da doença.

1.4 Bioinformática aplicada ao desenvolvimento de vacinas e marcador de diagnóstico para Toxoplasmose

A bioinformática voltada a análise de antígenos, ou imunoinformática, representa uma ferramenta poderosa e um progresso significativo para o projeto e o desenvolvimento de vacinas eficientes, bem como sobre a busca por marcadores de diagnóstico específicos, através da predição de regiões imunogênicas em proteínas alvo, engenharia protéica e análise de interações imunológicas (BRITO et al., 2017; HASHEMINASAB; MAGHSOOD; KHALILI, 2016; HOLEC-GASIOR, 2013).

Vários algoritmos computacionais têm sido usados na identificação de regiões imunogênicas, na busca por sequências de aminoácidos em uma dada proteína, por características, que acredita-se, que são comuns em peptídeos imunogênicos na localização de uma região provável pela indução de uma resposta imune. Esses algoritmos podem identificar regiões que contenham epítomos, assim como analisar os alelos de MHC e ou HLA mais frequentes em uma dada população (LUCCHESE et al., 2003).

Os epítomos são pequenas porções imunogênicas, subdomínios de macromoléculas, como proteínas, que determinam a sua especificidade e são responsáveis por disparar a ativação das células do sistema imunológico (KANDUC; LUCCHESE; MITTELMAN, 2001).

Dessa forma, as células do sistema inato do hospedeiro reconhecem os antígenos do patógeno, internalizam esses antígenos, digerindo proteínas em peptídeos os quais são posteriormente apresentados na superfície celular via MHC. Essa etapa, conhecida como processamento antigênico, envolve diversos processos complexos, tais como clivagem por ação de diversas proteases citoplasmáticas, do proteossoma, e também do RE (retículo endoplasmático). Em suma, ligações com as TAPs (enzimas transportadoras associadas ao processamento de antígenos), promovem o direcionamento dos peptídeos para retículo endoplasmático (figura 6). Após a entrada do peptídeo no RE via TAP ele se liga na fenda da molécula complexo MHC é, então, transportado para superfície celular, onde os epítomos são reconhecidos (FLOWER, 2013).

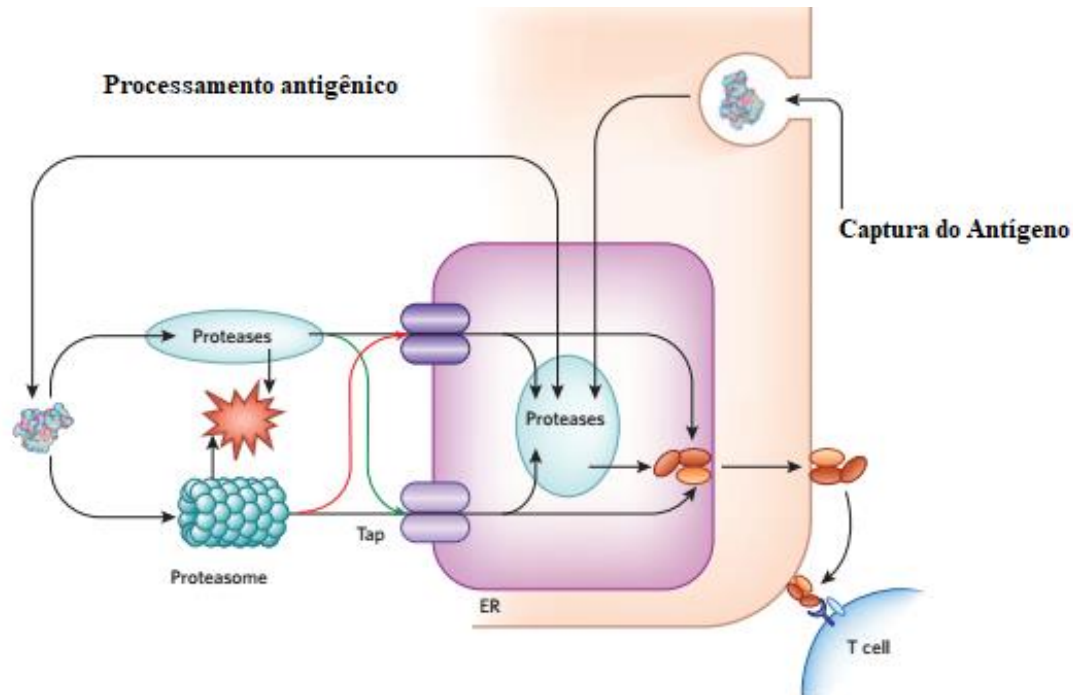


Figura 6. Captura e complexidade no processamento antigênico através de um esquema generalizado incorporando muitos dos caminhos adicionais que levam para a apresentação do epítipo na superfície celular. Fonte: Adaptado de (FLOWER, 2013)

Os linfócitos T e B, mediadores das respostas imunes adaptativas, expressam receptores específicos do antígeno que lhes permitem discriminar entre si e um número praticamente ilimitado de moléculas não-propensas a ligações. Seus receptores reconhecem e ligam especificamente aos epítopos. Os epítopos das células T e os epítopos das células B se diferem fundamentalmente pela forma como são reconhecidos pelo sistema imunológico. Epítopos de células B são reconhecidos como estruturas tridimensionais na superfície de antígenos nativos. Geralmente são identificados através de métodos computacionais baseados em propriedades relacionadas à exposição superficial, como flexibilidade, exibibilidade ou hidrofobicidade, como pensa-se que os epítopos devem estar na superfície da proteína para que ocorra a ligação com anticorpos (FLOWER, 2013; KIRPACH; MULLER, 2001).

Por outro lado, os epítopos de células T são partes de antígenos internalizados e processados que são apresentados aos linfócitos T em associação com moléculas do complexo de histocompatibilidade principal. Moléculas de MHC-I estão presentes em quase todas as células e reconhecem peptídeos contendo de 8 a 15 resíduos de aminoácidos, enquanto as moléculas de MHC-II, são frequentes apenas em células apresentadoras de antígenos,

reconhecem peptídeos contendo de 8 a 20 resíduos de aminoácidos, com ligação central de 9 resíduos de aminoácidos. Como em um sistema biológico, os receptores de células T e B ou moléculas de anticorpos reconhecem um número virtualmente infinito de estruturas, sendo que a imunodominância direciona a resposta imune em relação a epítomos selecionados (FLOWER, 2013). A identificação de epítomos são baseada nessas ideias.

Além da imunodominância no direcionamento da resposta imunológica, acredita-se que a diversidade do MHC pode influenciar fortemente a susceptibilidade do hospedeiro à doenças infecciosas, como observado em estudos onde a distribuição geográfica possui grande influencia alélica em MHC humanos de uma dada população (FLOWER, 2013).

Dessa forma, a imunoinformática envolve a aplicação de métodos computacionais a problemas imunológicos. A predição dos epítomos das células B e T na busca de marcadores imunogenicos tem sido o foco da imunoinformática (SORIA-GUERRA et al., 2015).

Diversos programas (*softwares*) estão disponíveis para o mapeamento de epítomos imunodominantes contidos em sequências de antígenos alvos para o desenho de vacinas e marcadores de diagnóstico formados por vários epítomos (peptídeos quiméricos), assim como identificação de alelos de MHC em uma dada população, afim de direcionar o estudo predizendo através de análises *in silico*, as possíveis interações entre o antígeno desenvolvido com complexo principal de histocompatibilidade do indivíduo, através de interações realizadas por *docking* da estrutura 3D do antígeno, desenvolvido juntamente com a estrutura 3D do MHC, a qual já foi caracterizada e definida, estando disponíveis em bancos de dados (figura 7) (COMEAU et al., 2004; KELLEY; STERNBERG, 2009; SAHA; RAGHAVA, 2006)

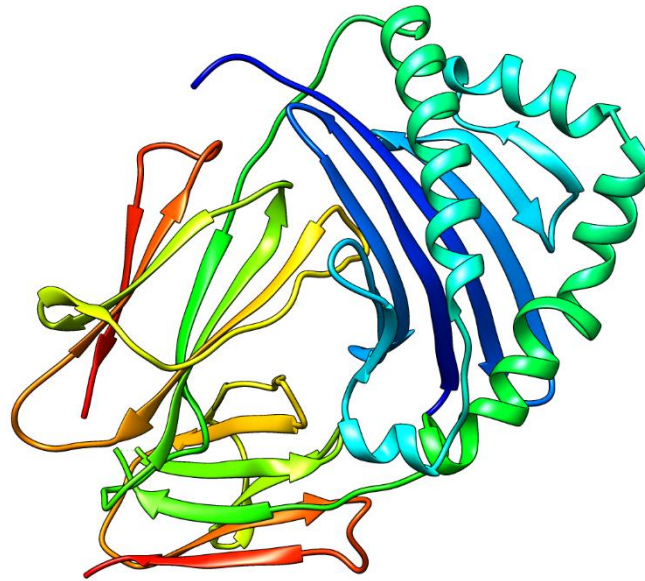


Figura 7. Estrutura 3D da molécula de MHC-II humano, alelo HLA- DRB1*1413. Tal alelo apresenta maior frequência na população brasileira. Modelo gerado através de dados contidos Banco- PDB (Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb>).

Outra ferramenta utilizada afim de direcionar os sítios específicos de clivagem de um peptídeo desenhado, contendo epítomos de células B e T, é por meio da adição de espaçadores (*linkers* ou *spacers*), que são pequenas sequências de aminoácidos que podem ser adicionados entre um epítomo e outro, evitando que os epítomos sejam digeridos por proteases, diminuindo assim, sua eficácia em ativar respostas imunológicas. Há várias combinações de espaçadores que podem ser utilizados entre epítomos afim de direcionar interações entre proteínas-proteínas, como por exemplo, antígeno e MHC. Foi possível provar que a utilização de espaçadores e região de ubiquitinação favorece o processamento de epítomos, resultando em uma maior apresentação para moléculas do sistema imunológico. Infere-se o possível uso dessas metodologias para o desenvolvimento de imunobiológicos para várias doenças (REDDY CHICHILI; KUMAR; SIVARAMAN, 2013). Um exemplo disso foi comprovado por Velders e colaboradores, 2001, que erradicaram tumores contra HPV utilizando uma vacina baseada na predição de epítomos de células B e T separados por espaçadores (trinca de aminoácidos-AAAY) contendo também uma região de ubiquitinação (VELDERS et al., 2001).

A bioinformática ou imunoinformática representa um papel fundamental para o avanço biotecnológico através de análises *in silico*, o qual contribuiu também na evolução de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de marcadores de diagnóstico e vacinas contra a Toxoplasmose (Figura 8).

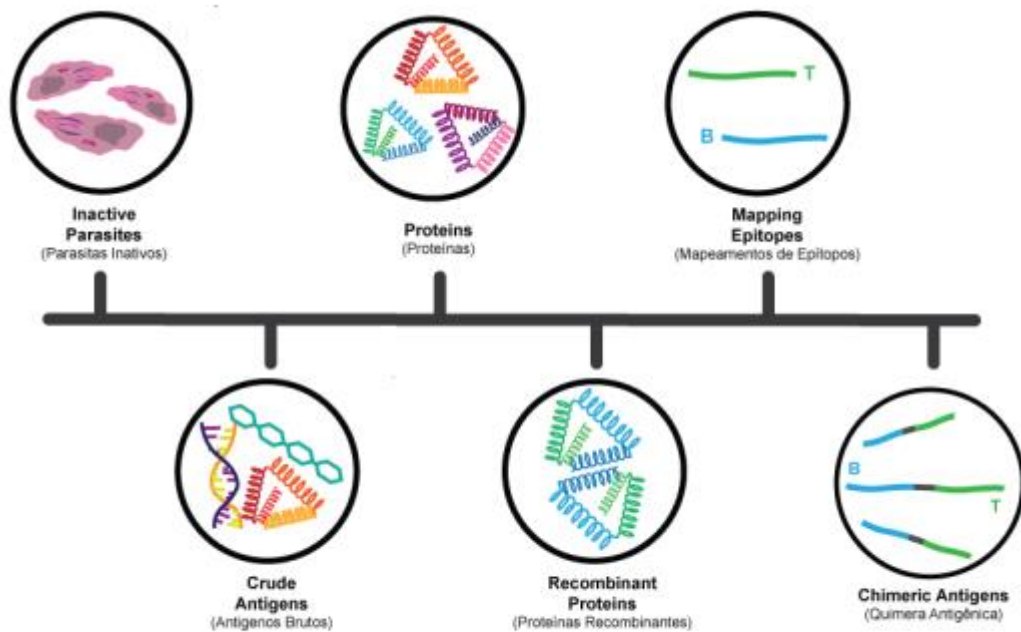


Figura 8. Processo evolutivo no desenvolvimento de vacinas e marcador de diagnóstico contra a Toxoplasmose. As primeiras tentativas utilizam parasitos inativados e ou antígenos totais para ambas abordagens. Posteriormente, pesquisadores focaram na utilização de proteínas oriundas do parasito, assim como a obtenção das mesmas por sistema recombinante. E por fim, a bioinformática vem apresentando ferramentas para a identificação de epítomos e construção de peptídeos (antígenos) quiméricos compostos por epítomos B e T para uma resposta imune mais específica assim como um diagnóstico com maior acurácia.

Diversos estudos utilizando essas abordagens mostram resultados promissores. Estudos conduzidos pelo grupo de pesquisa da Dra. Rima McLoad, utilizando peptídeos quiméricos contendo epítomos de diferentes proteínas de *T. gondii*, adicionando também sequências de adjuvantes à esses peptídeos, assim como também tendo como base o haplótipo de MHC da população estudada, apontam resultados promissores tanto em modelos murinos, como através de estímulo de células humanas *in vitro*, sendo detectadas respostas de proteção com ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como, geração de citocinas cruciais para o estabelecimento de uma resposta adaptativa que confira proteção e memória imunológica (CONG et al., 2011; EL BISSATI et al., 2016; TAN et al., 2010).

Em paralelo, resultados com marcadores de diagnóstico para a Toxoplasmose, utilizando abordagens de imunoinformática, também são apresentados como grande possibilidade de novos kits sorológicos que permitam maior especificidade no diagnóstico da doença (BEGHETTO et al., 2006; DRAPAŁA; HOLEC-GĄSIOR; KUR, 2015; HOLEC-GĄSIOR; FERRA; DRAPAŁA, 2012; WANG et al., 2016).

1.5 Antígenos alvos

Com base na imunoinformática, assim como resultados promissores obtidos em estudos realizados em animais e humanos, traçam-se estratégias para utilização dessas metodologias para o desenvolvimento de imunobiológicos como vacinas e/ou imunoterapêuticos, assim como marcador de diagnóstico, compostos por epítomos imunodominantes oriundos de antígenos do parasito, previamente caracterizados por desencadear algum mecanismo de resposta imune. Nesse trabalho, buscamos estudar três classes de diferentes antígenos do *Toxoplasma gondii*, presentes em diferentes formas do parasito, os quais estão envolvidos nos processos agudos e crônicos da doença.

1.5.1 Antígeno de Membrana Apical-1 (AMA-1)

O antígeno de membrana apical (AMA-1) é um imunógeno importante contido no filo *Apicomplexa* e bem caracterizado quanto ao potencial imunológico como vacina, tendo sido sugerido a utilização desse antígeno como alvo para desenvolvimento de medicamentos e/ou imunoterapêuticos que bloqueariam o processo de invasão das células hospedeiras pelos parasitos do gênero *Plasmodium*, os quais causam a Malária (MACRAILD et al., 2011).

A AMA-1 de *Toxoplasma gondii* (TgAMA-1) é uma proteína de micronema diretamente relacionada ao processo de invasão celular pelo parasito, sendo encontrada predominantemente na extremidade apical da superfície do parasita. Um produto de clivagem de aproximadamente 54 kDa do ectodomínio é continuamente lançado no meio celular. A estrutura da proteína TgAMA-1 é a mais complexa de qualquer estrutura de AMA-1 até à data, com mais de 97,5% do ectodomínio modelado de forma inequívoca (CRAWFORD et al., 2010; TYLER; TREECK; BOOTHROYD, 2011) Não tem como afirmar se essa proteína se mantém conservada em todas as cepas e/ ou isolados de *T. gondii*, no entanto o potencial como vacina já foi reportado por vários pesquisadores.

Lagal e colaboradores, 2015, através de experimentos com taquizoitos da cepa RH (alta-virulência) com o gene AMA1 deletado, AMA1 knockout (AMA1^{KO}), mostraram que esses taquizoitos AMA1^{KO} são capazes de invadir e se multiplicar na célula hospedeira,

entretanto, a expansão da população era baixa e rapidamente controlada em camundongos imunocompetentes. Logo, concluíram que AMA1 aumenta a virulência da cepa promovendo maior capacidade invasiva, o que resulta numa rápida expansão da população parasita (LAGAL et al., 2015). Em 2007, Dautu e colaboradores, em experimentos conduzidos em laboratório, imunizaram camundongos com o gene de TgAMA-1 e observaram a produção de altos níveis de anticorpos, assim como uma resposta imune celular associada com a síntese de IFN- γ sugerindo a modulação de uma resposta do tipo Th1, além disso, a imunização com o gene TgAMA-1 resultou em uma proteção parcial, mas significativa na fase aguda da Toxoplasmose, quando comparada aos genes MIC2, M2AP e BAG1 (DAUTU et al., 2007). Já os estudos conduzidos por Zhang e colaboradores, 2015, mapearam epítomos de células B e T contidos nas sequências das proteínas AMA-1, RON-2 e RON-4, envolvidas no processo de invasão pelo parasito. Após a síntese desses epítomos, camundongos foram imunizados via intranasal com um mix desses peptídeos e com cada um isoladamente. Os resultados apontaram para respostas Th1 e Th2 através da produção de citocinas específicas, altos títulos de anticorpos e proteção parcial dos animais imunizados perante um desafio com a cepa RH de *Toxoplasma gondii*, a qual é letal em murinos, sendo a menor taxa de mortalidade observada no grupo que foi imunizado com o peptídeo quimérico AMA-1 (ZHANG et al., 2015).

Em relação a possibilidade de uso como marcador de diagnóstico, não há estudos utilizando TgAMA-1 no diagnóstico sorológico da Toxoplasmose. Há um estudo relacionando a proteína AMA-1 de *T. gondii* com a proteína AMA-1 de *Neospora caninum* (Nc) para diagnóstico. Foi observado um grau de similaridade de 76% entre as sequências de aminoácidos de TgAMA-1 e NcAMA-1, além disso, identificou-se um gene que codifica o antígeno NcAMA-1, por imunossupressão de uma biblioteca de expressão de cDNA de taquizítos de *N. caninum* com soro de camundongos imunizados com TgAMA-1, sendo verificada a possibilidade de reação cruzada entre essas duas doenças quando se usa qualquer uma das proteínas sem identificação prévia de epítomos. Uma vantagem relatada pelos autores, é que apenas um antígeno pode ser utilizado para impedir a replicação dos parasitos. Isso foi demonstrado através da pré-incubação de taquizoítos livres com anticorpos anti-rNcAMA1 IgG, a qual resultou na inibição de invasão em células hospedeiras por *N. caninum* e *T. gondii* (ZHANG et al., 2007).

Contudo, além de potencial para vacina previamente comprovado, a proteína TgAMA-1 deve ser explorada também como possível marcador de diagnóstico contra a Toxoplasmose.

1.5.2 Antígeno de Grânulos Denso-7 (GRA-7)

Os grânulos densos são organelas vesiculares que expressam proteínas do taquizoíto, bradizoíto e fases esporozoítas do parasito. A proteína GRA-7 é uma proteína de 29 KDa (p29) secretada pelo parasito logo após o processo de invasão, assim como também é excretada em hospedeiros infectados. Essa proteína se mostra altamente conservada em diferentes isolados de *T. gondii* (FISCHER et al., 1998; ZHENG et al., 2005). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o nível de expressão da proteína GRA-7 diminui juntamente com a perda de virulência da cepa de *T. gondii*. Essa família de proteínas (GRA) tem sido relatada como alvo promissor para o desenvolvimento de uma vacina multi-antigênica contra Toxoplasmose (NAM, 2009; NEUDECK et al., 2002). Vercammen e colaboradores, vacinaram camundongos com plasmídeos expressando antígenos de GRA1, GRA-7, e ROP2 e verificaram um estímulo específico de células T e secreção de IFN- γ , em cultura de baços de animais vacinados. A taxa de sobrevivência dos animais foi maior no grupo vacinado (variando de 10% a 90%) quando comparado ao grupo controle, sendo observado redução significativa na formação de cistos cerebrais no grupo vacinado. Em outro estudo, foi verificado em murinos imunizados com GRA-7 um aumento no nível de IgG, IgG2a e IFN- γ nos grupos vacinais, além de aumento significativo na taxa de sobrevivência dos animais desafiados com diferentes cepas de *T. gondii* (MIN et al., 2012; VERCAMMEN et al., 2000)

Em um estudo mais recente, uma vacina de DNA foi elaborada com vários epítomos de diferentes antígenos, com adição de adjuvantes e epitomos da proteína GRA-7. Os resultados apresentaram grande produção de IFN- γ e aumento de células T CD8⁺ de memória, o que conferiu proteção em camundongos transgênicos HLA*11:01 previamente imunizados, perante um desafio secundário com cepas de *T.gondii* (EL BISSATI et al., 2016). O potencial da proteína GRA-7 como marcador de diagnóstico já é relatado na literatura. Jacobs e colaboradores, 1999, obtiveram a proteína GRA-7 através de sistema recombinante, e verificaram reatividade, em soro humano, no reconhecimento de IgG, em pacientes previamente triados com IgG positivo usando o antígeno total do parasito. Foi observado com uma média de 81% de sensibilidade, sendo que pacientes crônicos, com baixos níveis de

anticorpos, tiveram a reatividade diminuída para 65%, sendo também sugerida que possivelmente a região entre os resíduos 97 a 146 possuem os domínios mais importantes para detecção de anticorpos (JACOBS; VERCAMMEN; SAMAN, 1999). Além de humanos, a proteína GRA-7 também demonstrou potencial para marcador de diagnóstico em gatos, hospedeiros definitivos da doença (CAI et al., 2015).

1.5.3 Antígeno de Superfície 1 (SAG-1)

Dentre os antígenos de *Toxoplasma gondii*, os antígenos de superfície (SAGs) são, sem dúvida, os mais explorados quando ao potencial imunogênico. A proteína SAG-1 ou p30, é uma proteína altamente imunogênica que gerou grande interesse em pesquisadores, para o desenvolvimento de reagentes de diagnóstico, como uma potencial vacina de subunidade, devido ao seu papel na invasão do parasito às células hospedeiras e sua abundância na superfície dos taquizoítos (HASHEMINASAB; MAGHSOOD; KHALILI, 2016). A SAG-1 está entre as primeiras proteínas que interagem com células hospedeiras e está envolvida principalmente na adesão, transdução de sinal, invasão, transporte de material e respostas imunes do hospedeiro. Com isso, esta proteína pode ser crucial para o diagnóstico de infecção por *T. gondii*, assim como, possuir capacidade de imunizar contra este parasita (WANG; YIN, 2014). Os genes que codificam os antígenos SAG1 e SAG2, têm sido clonados e expressos em sistemas recombinantes de organismos procariotos e eucariotos (*Escherichia coli* e *Pichia Pastoris*), e tanto proteínas recombinantes, como, moléculas de DNA plasmidial, têm sido usadas para imunizar camundongos e outras espécies de roedores, confirmando o potencial imunogênico das SAGs em gerar respostas imunes de proteção em camundongos, e também como possíveis marcadores sorológicos (HARNING et al., 1996; LEKUTIS et al., 2001; ZHOU et al., 2007). Letscher-Bru e colaboradores avaliaram a resposta imune induzida em modelo de Toxoplasmose congênita, através da imunização de camundongos da linhagem BALB/c com o antígeno recombinante SAG1 e observaram altos títulos de IgG nesses animais, além da redução de 50% da taxa de transmissão para os fetos (LETSCHER-BRU et al., 2003).

Além disso, vírus geneticamente modificados, deficientes de replicação, contendo no seu cassete de expressão o gene que expressa a proteína SAG1, montaram uma resposta imune protetora em camundongos, em um estudo com adenovírus recombinante como vetor vacinal (CAETANO et al., 2006). Em outro estudo, também utilizando pseudorabies vírus como vetor

vacinal, pesquisadores observaram proteção total dos camundongos imunizados com o vírus contendo o gene da proteína SAG-1, frente a desafio com a cepa RH de *Toxoplasma gondii* (LIU et al., 2008).

No que diz respeito a marcador de diagnóstico, Selseleh e colaboradores, 2012, analisaram a proteína recombinante SAG-1 como possível marcador de diagnóstico das fases agudas e crônica da doença em seres humanos. Após a obtenção da proteína SAG-1, pacientes previamente triados com IgM e IgG positivos utilizando o kit ELISA, considerado padrão ouro para diagnóstico da doença, foi possível comparar a acurácia de ambos os métodos. A sensibilidade e a especificidade do teste de ELISA utilizando antígeno recombinante para mensurar IgG em comparação com os níveis de IgG do kit comercial foram de 93% e 95% respectivamente, e a sensibilidade e especificidade para IgM através do antígeno recombinante foram de 87% e 95%, respectivamente, sugerindo assim a substituição do lisado de *T. gondii* por SAG-1 recombinante em kits sorológicos comerciais (SELSELEH et al., 2012). Em um estudo mais recente, a proteína SAG-1 relacionado com a sequência SRS3 foi obtida também por expressão heteróloga. Foram utilizadas amostras de soro de indivíduos com infecção crônica (n = 76), infecção aguda provável (n = 14) e controles saudáveis (n = 81) para determinar a utilidade do rtSRS3 para o diagnóstico de *Toxoplasma*. Os resultados do ELISA IgG desenvolvido mostraram uma especificidade diagnóstica de 91% e uma sensibilidade de 82,89% e 100% para amostras de soros crônicos e agudos, respectivamente. Em conclusão, rtSRS3 obtida na sua estrutura nativa, corretamente enovelada, durante a expressão em sistema recombinante, tem o potencial de ser usado como um antígeno solúvel para a detecção de *Toxoplasma* humana (MIRZADEH et al., 2017).

Em adição, a proteína SAG-1 já tem sido empregada na fase sólida de alguns kits comerciais, como por exemplo o kit ECLIA da Roche, o qual apresenta sensibilidade e especificidade para detecção de IgG de 99.45 a 100% e 87.50 a 99.80%, respectivamente, e sensibilidade de 91.11 a 95.74, especificidade de 98.45 a 99.79% para detecção de IgM (MEYLAN; PARIS; LIESENFELD, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Embora hajam progressos significativos em estudos de vacinas contra a Toxoplasmose, até o momento, não existe uma vacina disponível capaz de proteger animais e humanos contra todos os tipos de isolados de *T.gondii*, prevenindo dessa forma os agravos causados por essa parasitose, que ainda é considerada bastante negligenciada, e causa sérios problemas de saúde pública. Tradicionalmente, os casos mais graves da doença eram relatados apenas em indivíduos imunossuprimidos e em gestantes, no entanto, recentemente foi comprovado que a Toxoplasmose está diretamente associada ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas e pode estar também associada a alguns tipos de câncer. O tratamento dessa doença depende de fármacos que possuem certa toxicidade e podem gerar efeitos colaterais sérios, o que justifica a necessidade de vacinas e ou imunotrapêuticos como medida profilática. Uma vacina contra a Toxoplasmose humana seria o ideal, embora esteja longe da realidade, porém, uma vacina que possa proteger animais e bloquear a rota de infecção seria uma opção viável como medida de controle da doença. Além disso, a grande maioria dos kits comerciais utilizados no diagnóstico sorológico da toxoplasmose, utilizam o antígeno total do parasito, o qual é necessitado da utilização de animais para sua obtenção, e embora apresente grande sensibilidade, pode gerar resultados ambíguos, além de não identificar precisamente se houve eliminação do parasito pelo sistema imune, ou se o mesmo permanece encistado cronicamente. Nesse tocante, há a necessidade na busca de marcadores sorológicos mais específicos que contribuam no aumento da acurácia dos reagentes de diagnóstico sorológico da doença. Diante da diversidade de antígenos apresentada pelo *Toxoplasma gondii*, uma vacina contendo múltiplos antígenos, assim como, marcadores de diagnóstico baseado nessa ideia, se tornam alvos mais promissores. Além disso, estudos recentes para a prospecção de potentes imunobiológicos, sugerem que o mapeamento e a predição de epítomos de células B e T por bioinformática, se apresentam como ferramentas cruciais relacionadas ao potencial imunogênico. Tendo como base os antígenos AMA-1, GRA-7 e SAG-1 previamente estudados e considerados importantes candidatos a vacina contra Toxoplasmose, por gerarem respostas imunológicas satisfatória e proteção parcial em camundongos imunizados, a predição de epítomos de células T e B em suas sequências, assim como, a construção de uma quimera protéica, se tornaram objetivos a serem desenvolvidos nesse trabalho, com a perspectiva de um possível marcador antigênico e protótipo vacinal contra Toxoplasmose.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Construir antígenos quiméricos formados pela junção de epítomos de células B e T imunodominantes contidos na sequência das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1 de *Toxoplasma gondii*, como alvo para o desenvolvimento de vacinas, imunoterapêutico e marcador sorológico.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Identificar e selecionar os epítomos para células B e T nas sequências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1, caracterizar as suas estruturas e prever suas possíveis interações com moléculas do sistema imunológico *in silico*;
- b. Construir e caracterizar *in silico* uma proteína quimérica multi-antigênica contendo os epítomos de células B e T previamente selecionados, assim como, obter essa proteína por meio de sistema recombinante;
- c. Avaliar a capacidade de reconhecimento dos peptídeos quiméricos por anticorpos e células do sistema imune de pacientes de Toxoplasmose humana e de indivíduos controle;.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações Éticas

Esse estudo envolve a utilização de amostras de sangue humanos. Antes da realização de qualquer experimento, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas Humanas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CAAE 56191416.0.0000.5537). Cada participante ou seu tutor legal forneceu o consentimento informado por escrito, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética.

4.2 Predição de epítomos, construção das quimeras e análises *in silico*

4.2.1 Sequências referências de nucleotídeos e aminoácidos

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M.**

4.2.2 Predição de epítomos de células B contidos nas sequências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:**

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

4.2.3 Predição de epítomos T contidos nas sequências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

4.2.4 Construção dos peptídeos quiméricos contendo epítomos de células B e T

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

4.2.5 Estimativa de tamanho, ponto isoelétrico e detecção de possíveis regiões alergênicas

**Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:
INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)**

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

4.2.6 Modelagem molecular

**Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:
INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)**

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO

**MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS
RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS
ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1,
GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

**• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.;
Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

4.2.7 Docking protéico

A fim de comprovar a eficiência na ligação dos peptídeos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT, TgSAG1/BsT propostos à cada tipo de molécula do Complexo Principal de Histocompatibilidade ou MHC (*major histocompatibility complex*), durante a resposta imune do organismo à apresentação do antígeno, foi realizado um *docking* de cada modelo a diferentes tipos de estruturas de MHC de classe I e II depositados no Banco PDB, com auxílio do servidor online ClusPro v2.0 (<http://cluspro.bu.edu> - Universidade de Boston) (Comeau *et al.*, 2004) utilizando suas opções avançadas de remoção de resíduos terminais não-estruturados e modo especial para o uso com anticorpos. Os resultados dessa análise mais uma vez foram apresentados e salvos em formato .pdb para posterior visualização e edição no programa UCSF Chimera. A fim de identificar as possíveis interações entre aminoácidos oriundos dos peptídeos quiméricos com aminoácidos contidos no Complexo de Histocompatibilidade Humano, HLA*DRB1-1413, foram gerados modelos ampliados os quais possibilitaram a visualização das possíveis interações existentes.

4.2.8 Alinhamento final da quimera TgAGS/BsT , predição de região de ubiquitinação e tradução reversa

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

**• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:
870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO

**MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS
RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS
ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1,
GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

**• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.;
Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

4.3 Síntese dos peptídeos quiméricos e da sequência de nucleotídeos que codifica a químera TgAGS/BsT

As sequências de aminoácidos que codificam os peptídeos quiméricos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT foram sintetizadas pela empresa PEPTIDE 2.0 inc. (Chantilly, VA, EUA), em quantidades entre 5,1 mg e 5,5 mg, purificados por HPLC tendo grau de pureza superior a 87,7%. Os peptídeos foram diluídos em DMSO 100% (sulfóxido de dimetilo) ou água ultra-pura, em um volume apropriado para obter uma solução estoque com concentração final de 10 mg/mL. Os peptídeos foram manuseados em ambiente estéril e após a diluição, armazenados a -20°C, até o momento de uso. Para evitar degradação por ação do descongelamento contínuo, alíquotas com concentração final de 1mg/mL de cada peptídeo, foram feitas à partir da solução estoque, diluindo em solução salina. Tal como a solução estoque, as alíquotas também foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

A sequência de nucleotídeos que codificam a proteína TgAGS/BsT foi sintetizada pela empresa IDT (Integrated DNA Technologies -EUA). O gene que codifica a proteína TgAGS/BsT foi sintetizado inserido no plasmídeo pBlue (IDT), o qual serviu de molde para amplificação pela técnica de PCR. O gene foi diluído em água ultra-pura isenta de nucleases, e armazenado a -20°C. Foram desenhados iniciadores (*primers*) contendo sítios de enzimas de restrição para amplificação desse produto quimérico, de forma a favorecer sua inserção em plasmídeos de clonagem e expressão (Tabela 1). A síntese dos *primers* foi feita pela EXXTEND (Brasil), os quais foram diluídos também em água ultra-pura em concentração final de 10mM.

4.4 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

O gene que codifica a proteína TgAGS/BsT foi amplificado por meio da técnica de PCR, tendo como molde para reação, o gene inserido no plasmídeo pBLUE previamente sintetizado. A reação padrão foi ajustada para um volume final de 50 μL , sendo 30 μL de água ultra-pura isenta de nucleases, 10 μL do Tampão Phusion Taq Polimerase 5X , NEB (New England Biolabs), 2 μL do DNA molde o que equivaleu a aproximadamente 7,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 1 μL do mix de dNTPs (10 μM de cada), 2,5 μL de cada iniciador, 1,5 μL de DMSO (concentração final de 3% na reação), e 0,5 μL da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (NEB).

Tabela 1. *Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene que codifica a proteína TgAGS/BsT.* (a): Sítio de reconhecimento para clivagem pela enzima de restrição *Bam*HI. (b): Sítio de reconhecimento para clivagem pela enzima *Hind*III.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

As reações de PCR foram processadas no termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf), com desnaturação inicial a 98°C por 30 segundos, seguida por 35 ciclos de 98°C por 10 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR (5µL) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1X (Tris-Acetato 0,04M, EDTA 0,001M) acrescido de brometo de etídeo (1% v/v). Um volume de 5 µl de cada produto de PCR foi acrescido de 1 µl do tampão de amostra, 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher). Como padrão de peso molecular, foram utilizados o Gene Ruller 1Kb Plus (Thermo Fisher) ou qual possui bandas de tamanho de 75 pares de bases a 20000 pares de bases e/ou o 100bp DNA ladder (Invitrogen). As corridas foram realizadas sob voltagem de 100V, sendo o gel posteriormente visualizado em luz UV de 320nm e fotografado.

Após a constatação da amplificação do gene TgAGS/BST através da visualização de banda correspondente ao fragmento esperado, o produto de PCR foi purificado utilizando o kit GeneJET PCR Purification (Thermo Fisher) seguindo as orientações do fabricante. Posteriormente ao processo de purificação, os DNAs foram dosados por espectrofotometria, utilizando o NanoDrop OneC Microvolume UV-Vis (Thermo Scientific) através da mensuração por absorbância a 260nm, a qual detecta ácidos nucléicos. A razão entre as absorbâncias 260/280nm indica o grau de pureza das amostras. Amostras com grau de pureza inferior a 1.8 foram descartadas do estudo, sendo os procedimentos repetidos quando necessários.

4.5 Clonagem do gene TgAGS/BST ao Plasmídeo pJET 1.2/blunt -Reação de ligação

Por ação da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polimerase (NEB) utilizada nas reações de PCR, o produto amplificado resultante obteve extremidades cegas (*blunt ends*) o que possibilitou a ligação ao plasmídeo pJET 1.2/blunt contido no kit CloneJet PCR Cloning (Thermo Fisher) o qual foi utilizado para clonagem. O kit CloneJet PCR é um kit que possibilita a clonagem de produtos de PCR de forma rápida e eficiente. O plasmídeo contido no kit é um vetor de clonagem linearizado, que aceita inserções de 6 pares de bases a 10 kb. As extremidades 5' do vetor contêm grupos fosforilo, portanto, a fosforilação dos iniciadores de

PCR não é necessária. Produtos de PCR com extremidades cegas, gerados por polimerases com alta fidelidade e revisão podem ser ligados diretamente com o vetor em apenas 5 minutos. Além disso o pJET1.2 (Figura 9), contém um gene letal que é interrompido pela ligação de um DNA inserido no sítio de clonagem. Como resultado, apenas células com plasmídeos recombinante são capazes de se propagar, eliminando a necessidade de rastreamento de colônias azuis e branca, sendo apenas necessário o uso do antibiótico acrescido ao meio de cultura (no caso a Ampicilina, o qual o plasmídeo possui resistência) para seleção dos possíveis clones positivos.

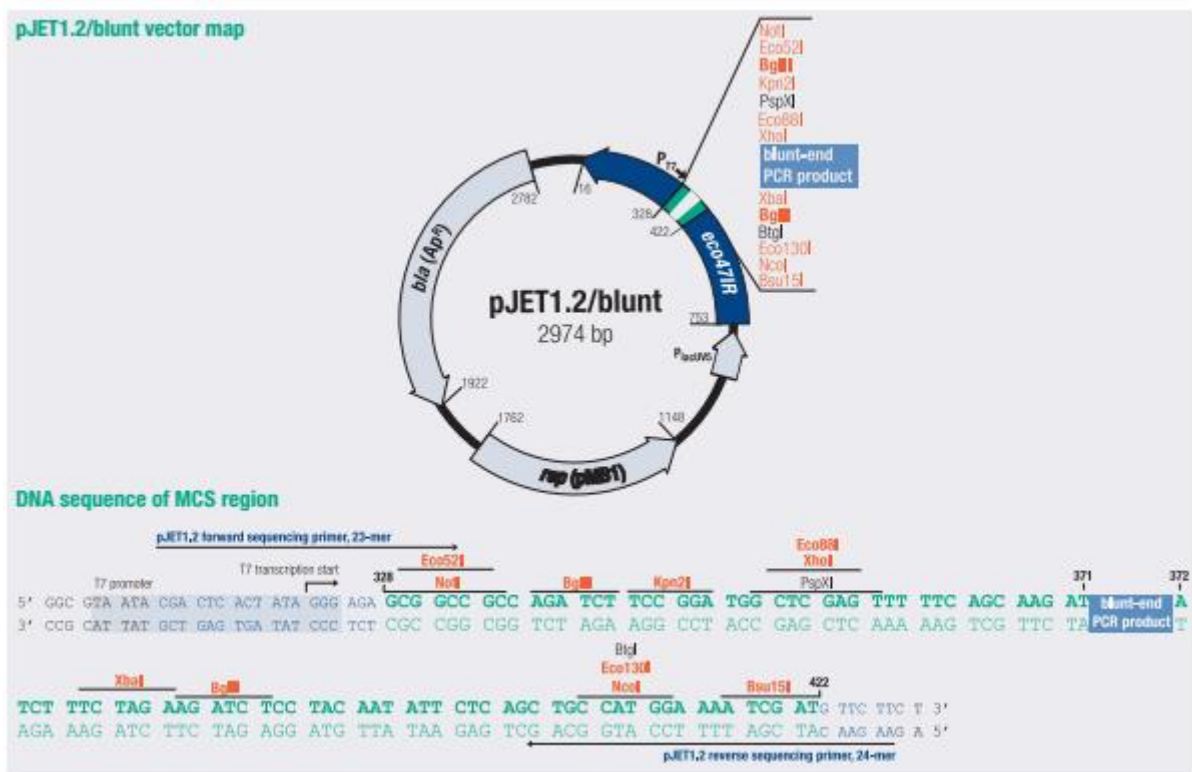


Figura 9. Mapa do vetor de clonagem pJET1.2/blunt mostrando o tamanho do plasmídeo, a região do sítio de clonagem onde o produto de PCR é inserido, assim como alguns sítios de restrição próximo desse produto. Nota-se que não há sítios para as enzimas *HindIII* e *BamHI* no sítio de inserção do produto de PCR, o que justifica também o acréscimo desses sítios nos primers usados para a amplificação do gene de interesse.

A reação de ligação foi realizada em uma proporção 1:3 (plasmídeo: inserto) seguindo as instruções do fabricante para clonagem de insertos com extremidades cegas. Aproximadamente 25ng (aprox. 0.15pmol ends) do produto de PCR previamente purificados foram adicionados a uma reação com volume final de 20µl, a qual constituía de 10 µl do tampão de reação 2X, 1 µl do vetor (0.05pmol ends), 1µl do produto de PCR, água ultra pura isenta de nucleases em quantidade suficiente para (qsp) 17µl, e 1 µl da enzima T4 ligase. Toda a reação

de ligação foi realizada no gelo e posteriormente misturada no vórtex por 5 segundos, e incubada por 5 minutos em temperatura ambiente.

4.6 Transformação de bactérias *Escherichia coli* XL-1 Blue com o plasmídeo recombinante pJET1.2/blunt contendo o gene TgAGS/BsT

Após a ligação do inserto ao plasmídeo, aproximadamente 7 μ L do produto de ligação foi utilizado para a transformação de bactérias quimiocompetentes. Bactérias *E. coli* da cepa *XL-1 Blue* (Agilent) são utilizadas para clonagem de plasmídeos recombinantes em rotinas laboratoriais. Essas cepas possuem resistência a tetraciclina. Antes do processo de transformação, as células *XL-1 Blue* foram tratadas com CaCl₂ para se tornarem competentes e permitirem a inserção de um DNA plasmidial exógeno(POPE; KENT, 1996).

As bactérias *E.coli* XL-1 Blue foram cultivadas em 500 mL de meio Luria Bertani (LB) 1x (Bactotripton 1% p/v; extrato de levedura 0,5% p/v, NaCl 171 mM) e incubadas sob agitação (180 r.p.m., Shaker Superohom G25, Brasil) a 37°C por 16 horas. O crescimento foi acompanhado até a cultura atingir uma A600nm igual a 0,6. As bactérias foram centrifugadas a 2800 x g durante 10 minutos a 4°C e o sedimento homogeneizado em 150 mL de 75mM de CaCl₂, 10mM de Tris-HCl pH8,0. As bactérias foram centrifugadas novamente e o sedimento celular foi ressuscitado em 30 mL da mesma solução, acrescida de 15% de glicerol, sendo então distribuído em alíquotas de 100 μ L e congelado rapidamente a -80°C até o momento do uso.

Para a transformação, um tubo contendo 100 μ l de células competentes foi retirado do freezer -80°C e incubado no gelo por 10 minutos. Foram então adicionados 5 μ L do produto da ligação do plasmídeo pJET1.2/blunt com o gene TgAGS/BsT, gentilmente homogeneizados e incubados no gelo por 30 minutos. Passado esse tempo, foi efetuado o choque térmico de 42°C por 30 segundos, e posteriormente a amostra foi colocada no gelo por mais 5 minutos. Após esse procedimento, foram adicionados 950 μ L do meio SOC, mantido em temperatura ambiente, ao tubo contendo os plasmídeos e as células bacterianas. A amostra foi então incubada a 37°C sob agitação de 200 rpm por 60 minutos. Em paralelo, placas de Petri contendo aproximadamente 25mL do meio LB-Ágar suplementado com 100 μ g/mL foram aquecidas na

estufa a 37°C. Passados os 60 minutos de incubação sob agitação, a amostra foi centrifugada por 2 minutos a 6000rpm para obtenção do pellet. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado com 100 µl do meio sólido. As bactérias foram então semeadas em placas de Petri e incubadas overnight a 37°C.

4.7 Extração de DNA plasmidial, digestão enzimática e análises dos plasmídeos recombinantes pJET1.2+TgAGS/BsT

Após o período de incubação, foram observadas colônias nas placas de Petri, como ilustra a figura 11. Algumas colônias transformantes foram selecionadas e inoculadas em 5mL do meio LB-caldo contendo 100 µg/mL de ampicilina e também incubadas *overnight* a 37°C sob agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, foram retirados 700 ml de cada cultura bacteriana, colocados em criotubos de 2 mL contendo 300 ml de glicerol, para serem armazenadas como alíquotas no freezer -80°C.

Para a extração do DNA plasmidial, mini-preps foram feitas utilizando o kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. A utilização do kit possibilitou a obtenção de um material isento de nucleases, contaminantes, proteínas que pudessem interferir nos procedimentos de clonagem. Após a extração do DNA plasmidial, foi realizada a digestão enzimática para confirmação se o inserto havia sido inserido no plasmídeo de forma adequada. Para isso, os plasmídeos puros foram clivados utilizando as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Promega), com a finalidade de liberar os produtos de PCR inseridos no vetor de clonagem. Para tal a reação de clivagem foi ajustada para 50 ml, sendo utilizados, 5 ml do Tampão E (Promega), 0.5 ml da enzima *Bam*HI, 0,5 ml da enzima *Hind*III e aproximadamente 1 µg do DNA plasmidial, sendo o volume ajustado conforme as concentrações dos clones, descontando ou adicionando água ultra pura isenta de nucleasse qsp 50 µl. As reações foram incubadas durante 3 horas a 37°C, e por mais 15 minutos a 65°C para inativação das enzimas. Posteriormente, 5 µl de cada amostra também submetida a eletroforese em gel de agarose.

Dos clones positivos, três clones contendo a ORF (fase de leitura aberta) de interesse, foram selecionados. A partir das alíquotas previamente armazenadas no -80°, esses clones

foram inoculados novamente em meio LB-caldo com antibiótico, e tiveram seu DNA plasmidial extraído. O DNA plasmidial foi quantificado e analisado quanto ao grau de pureza. Posteriormente foi realizada uma nova reação de digestão enzimática, dessa vez utilizando aproximadamente 1,2 µg do DNA plasmidial e adequando o protocolo de acordo com a quantidade de DNA utilizada, a fim de obter o inserto de interesse. O produto da digestão enzimática foi aplicado em um volume final de 50 µL em canaletas maiores do gel de agarose, para que ao término da corrida fosse feita a excisão apenas da banda correspondente ao gene clonado, do gel e purifica-la. Cautelosamente, foi feita a excisão, retirando uma fatia de aproximadamente 300mg do gel de agarose. O DNA foi purificado utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction System (Invitrogen), novamente dosado, e armazenado a -20°C conforme instruções do fabricante.

4.8 Subclonagem do gene TgAGS/BsT no plasmídeo de Expressão pET-TEV e transformação de bactérias NEB5-alpha

O plasmídeo pET-TEV é um plasmídeo análogo ao pET-28a (Novagen), tendo apenas como diferença a substituição do local de reconhecimento de trombina de pET-28a (figura 10) foi substituído por um TEV (sitio de reconhecimento de protease). O plasmídeo pET-TEV foi cedido pelo Dr. Oscar Bruña Romero e Dra. Ana Paula Morais Martins Almeida (UFMG), estando circularizado inserido em bactérias DH5-alpha, o que possibilitou a sua propagação e obtenção em quantidades suficientes para os fins a esses destinados.

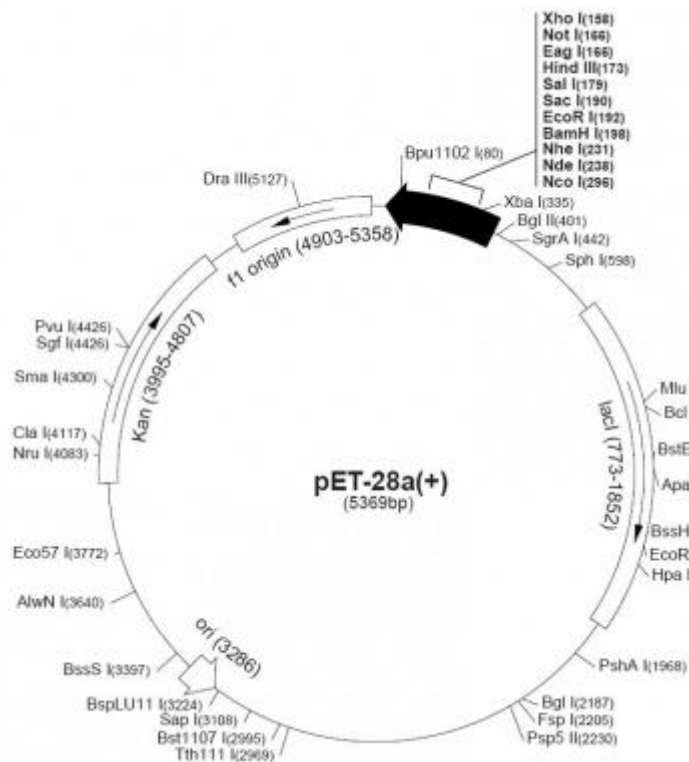


Figura 10. Mapa do plasmídeo pET-28a ilustrando as regiões de origem, o sítio múltiplo de clonagem, onde observa-se a presença de sítos para as enzimas *HindIII* e *BamHI*.

Plasmídeos do sistema pET, possuem o promotor T7, assim como genes que conferem resistência a Canamicina. Apresentam regiões nucleotídica nas regiões C- ou N-terminal do sítio múltiplo de clonagem, conhecidas com *His-Tag*, as quais codificam seis histidinas que são adicionadas ao produto a ser expresso. Assim, o gene que codifica a proteína TgAGS/BsT foi subclonado em fusão com essa sequência, facilitando a purificação da proteína através de cromatografia de afinidade em metal imobilizado.

Para que houvesse a reação de ligação entre o plasmídeo pET-TEV e o inserto previamente clivado do pJET 1.2/blunt, o DNA do pET-TEV foi extraído por mini-prep conforme descrito na seção 4.7, e o plasmídeo foi clivado com as enzimas BamHI e HindIII, afim de promover sua linearização e formar extremidades coesivas, as quais possibilitam a ligação com o inserto.

A reação de ligação foi entre o gene TgAGS/BsT e o vetor pET-TEV foi realizada utilizando uma proporção 1:3 (inserto:plasmídeo) baseada em fmol, unidade que determina a

quantidade de moléculas baseadas no tamanho dos produtos a serem ligados. Como a proporção determinada pelo protocolo da enzima T4 DNA ligase 1U/ μ L (Invitrogen), é de 1:3 (inserto:plasmídeo) e os DNAs do inserto e plasmídeo obtidos estavam em baixas concentrações, 1,4 ng/ μ L e 3,4 ng/ μ L respectivamente, no entanto com grau de pureza acima de 1.9, os cálculos foram determinados da seguinte forma: Para o vetor, o valor usado foi de 7,8 fmol, sendo necessário estimar a quantidade de DNA em nanogramas, sendo utilizada a equação (ng necessário = tamanho do plasmídeo em pares de bases x 0,033), no caso do inserto, 23,4fmol (ng necessário= tamanho do inserto em pares de bases x 0,099). Tendo calculado essa forma, a reação de ligação foi realizada utilizando 25 ng do plasmídeo (equivalente a 4.376.867.895 moléculas) e 7ng do inserto (equivalente a 1.408.952.701 moléculas). Foram utilizados 7,4 μ L do vetor, 5 μ L do inserto, 4 μ L do Tampão da enzima 5X, 1 μ L da enzima T4 ligase, e água ultra pura isenta de nucleasse qsp 20 μ L. A reação foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora e inativada por 15 minutos a 65°C.

Posteriormente a ligação, foram transformadas bactérias NEB5-alpha Competent *E.coli*. (NEB), as quais já vieram aliquotas em tubos e quimiocompetentes, prontas para a transformação. O procedimento foi realizado seguindo instruções do fabricante. Essa linhagem de bactéria é derivada da popular DH5-alpha, é um fago resistente T1, deficiente de *endA*, o que possibilita a preparação de plasmídeos de alta qualidade. Essa cepa não possui resistência à antibióticos, impossibilitando assim o crescimento de colônias em meios contendo antibióticos para seleção de bactérias transformadas. Um tubo contendo a bactéria Neb5-alpha foi retirado do -80°C, sendo essa bactéria transformada com o produto da ligação pET+TgAGS, conforme descrito na seção 4.6. Após a transformação, as bactérias foram semeadas em Placas de Petri com meio LB-Agar contendo 30 μ g/mL de canamicina, para seleção dos clones positivos.

4.9 Extração de DNA plasmidial e análises por enzima de restrição dos plasmídeos recombinantes pET-TEV+TgAGS/BsT

Inúmeras colônias foram observadas nas placas de Petri conforme ilustra a figura 11, e alguns clones foram selecionados (alíquotados em glicerol 30% e armazenados no freezer -80°C) para extração de DNA plasmidial através de mini-prep e também para confirmação da presença do inserto através de digestão enzimática, utilizando as enzimas *Bam*HII e *Hind*III e

analisado por eletroforese em gel de agarose, quanto a presença do inserto, conforme descrito nas seção 4.7.



Figura 11. Presença de colônias (pontos brancos) da bactéria *E.coli* NEB5-alpha transformadas com o plasmídeo pET-TEV contendo o gene que codifica a proteína TgAGS/BsT. O meio de cultura foi suplementado com canamicina, antibiótico que o vetor possui resistência, sendo assim, os clones apresentados, haviam de fato sido transfectados.

4.10 Transformação da bactéria *E. coli Arctic Express* com os plasmídeos recombinantes pET-TEV+TgAGS/BsT , expressão e purificação da proteína rTgAGS/BST

As bactérias da cepa *Arctic Express* (Agilent) são bactérias que possibilitam a expressão de proteínas por meio de plasmídeos que contenham o promotor T7. Essa cepa mantém um cromossomo cassete integrado em que a RNA polimerase de T7 é expressa a partir da promotor *lacUV5*. A indução da expressão pela RNA polimerase de T7 com IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo) resulta na expressão da proteína recombinante orientada pelo promotor T7. Além disso, duas classes de chaperoninas são expressas por essas bactérias, as Cpn10 e Cpn60, as quais auxiliam na solubilidade da proteína no momento da expressão. A *Arctic Express* possui o plasmídeo p-ACYC, o qual confere resistência a gentamicina. Em virtude da presença desse plasmídeo, bandas inespecíficas em gel de agarose são observadas após mini-prep e digestão enzimática.

Assim como as bactérias XL-1Blue foram tratadas com CaCl_2 para se tornarem permissivas à transformação por choque térmico, o protocolo descrito na seção 4.6 também foi utilizado para a cepa *Arctic Express*. Uma alíquota de 100mL de células competentes foi retirada do freezer -80°C e incubada no gelo com 50ng do DNA plasmidial pET+TgAGS por 10 minutos. Os demais procedimentos de transformação seguiram de acordo com o protocolo da *Arctic Express*, Agilent. Mini-preps e digestão enzimáticas também foram realizadas para confirmar a presença do plasmídeo recombinante, sendo dois clones selecionados para os procedimentos de expressão.

O subinóculo foi preparado a partir de 250 μL do clone positivo, inoculado em 10 mL do meio LB caldo, contendo 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de canamicina, incubado a 37°C overnight sob agitação de 200 rpm. Após esse período, 4mL do subinóculo foi adicionado a 200mL do meio LB sem antibiótico e incubado a 30°C por 3 horas sob agitação de 200 rpm. Posteriormente, a cultura rica em bactérias foi colocada para resfriar a 13°C . Antes da adição do IPTG, foi retirada uma alíquota de 1mL de cultura (controle de não induzido) a qual foi centrifugada por 10 min a 7000rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet armazenado a -20°C para posterior análise em eletroforese SDS-PAGE.

Na cultura de 200 mL foi induzida à expressão pela adição de IPTG (1mM como concentração final na cultura) e incubada de 13°C sob agitação por 24 horas. Após essas 24 horas, foi retirado uma alíquota de 1mL como controle induzido, a qual seguiu os mesmos procedimentos do controle não induzido. A cultura então foi centrifugada a 7000rpm por 20 minutos a 4°C , sendo descartados os sobrenadantes e os pellets armazenados a -20°C até o momento da purificação.

Para a purificação foi utilizado o kit *His-Pur Ni-NTA-3mL(Thermo Fisher)*, seguindo orientações do fabricante para os procedimentos de purificação sob condições desnaturantes, utilizando 8M de Ureia em todos reagentes nos processos de purificação da proteína recombinante.

Os pellets oriundos das culturas induzidas foram dissolvidos em 10mL do tampão de equilíbrio (PB1X, 10mM de Imidazol, 8M de Ureia). Foram adicionados 25mL de Lisozima (Sigma) oriundos de uma solução estoque de 10mg/mL e mantido no gelo por 30 minutos. Após

esse período, a amostra foi sonicada no gelo com 4 pulsos de alta intensidade por 10 segundos cada pulso. Posteriormente, os extratos protéicos brutos foram clarificados por centrifugação a 10000rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi utilizado no processo de purificação, descritos na bula do Kit *His-Pur Ni-NTA-3mL* (Thermo Fisher).

Em paralelo, foram realizadas purificações utilizando tampões com diferentes pH. Os resíduos da cauda de histidina (6xHis) possuem um pKa de aproximadamente 6,0 e se ficarão protonados se o pH foi reduzido (pH 4,5-5,3). Nestas condições, as caudas de histidinas da proteína não pode mais se ligar aos íons de níquel e se dissociará da resina Ni-NTA. Em substituição ao Imidazol, foram preparados tampões contendo 100mM de Na₂PO₄ + 10 mM de Tris-HCl acrescidos de 8M de Ureia, sendo os pH ajustados com NaOH e HCl. Os tampões tiveram pH= 8 , 6.3, 5.9 e 4.5, sendo observadas eluições entre os pH=5.9 e 4.5. Posteriormente a proteína foi dialisada contra H₂O para retirada da Ureia.

4.11 Caracterização das proteínas em SDS-PAGE

As proteínas purificadas foram analisadas por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida bifásico em condições desnaturantes, SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate - PolyAcrylamide gel eletrophoresis*). Alíquotas das proteína foram aquecidas a 95°C por 5 minutos em tampão de amostra (20% glicerol, 20% SDS, 0,375M Tris pH 8,8, 0,75M mercaptoetanol e 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol) para desnaturá-las. As amostras e marcador de tamanho molecular foram aplicadas no gel de poliacrilamida bifásico 12% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 29:1) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%) para fracionamento eletroforético a 100 V, por 2 horas. Para analisar as proteínas o gel foi corado em solução coomassie blue (0,25% p/v do corante coomassie blue R 250 (Sigma) durante 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Em seguida, o gel foi descorado em solução fixadora (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% água) até a visualização das bandas ao fundo do gel.

4.12 Obtenção do antígeno total de *Toxoplasma gondii* (AgTx)

O antígeno total de *T. gondii* foi cedido gentilmente pelo Dr. Adriano Gomes Silva, do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa Médicas, da Fundação Oswaldo Cruz, do Rio de Janeiro, por intermédio da Dra. Carolina de Oliveira Mendes Aguiar. A partir de taquizoítos da cepa RH do parasito obtidos por lavagem intraperitoneal de camundongos previamente infectados, foi preparado o extrato antigênico. O material foi sedimentado por centrifugação para a separação de células murinas. Resumidamente, os taquizoítos foram repetidamente congelados e descongelados para romper a parede do parasita, sonicados e centrifugados a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C. Posteriormente a lise, o extrato bruto de taquizoítos ou antígeno total, foi quantificado pelo método de Bradford, (HAMMOND; KRUGER, 1988) alíquotados e estocados a -20°C.

4.13 Triagem sorológica por ECLIA dos participantes da pesquisa

Trinta voluntários imunocompetentes, homens e mulheres com faixa etária entre 23 a 55 anos de idade, alguns relataram sorologia positiva a para Toxoplasmose, enquanto outros não sabiam se tiveram a doença, foram recrutados para esse estudo. A priori, foram coletados sangue dos voluntários, sendo as amostras processadas para obtenção do soro, o qual foi separado e enviado para um laboratório de referência do estado, onde foi feita a triagem para a determinação da sorologia desses indivíduos, através da técnica de Imunoensaio por Eletroquimioluminescência (ECLIA), para determinação dos níveis de IgG e IgM anti-*Toxoplasma gondii.*, sendo o kit de fabricação da *Roche Diagnostics GmbH*. Foram então, apenas coletadas amostras de sangue em tubos heparinizados dos indivíduos que apresentaram sorologias negativas para Toxoplasmose através da mensuração de IgM e IgG, os quais foram colocados no nosso grupo de pacientes negativos. Indivíduos com IgG positivo para Toxoplasmose, foram classificados como nossos pacientes positivos, os quais foram analisados qualitativamente através do ELISA para detecção de anticorpos contra os peptídeos quiméricos.

4.14 Análise dos peptídeos quiméricos no reconhecimento de anticorpos anti-*T.gondii* no soro de humanos por ELISA

As placas de micro-ensaio de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) foram sensibilizadas com diferentes quantidades de cada peptídeo quimérico (500ng/poço) e com o AgTx

(40ng/poço) dissolvidos em tampão de revestimento, a 4°C *overnight*. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas e posteriormente bloqueadas com PBS1X (Tampão fosfato salino) acrescido com Tween20 a uma concentração final de 0,01%. O soro de 10 indivíduos com sorologia positiva triados previamente para Toxoplasmose (testes confirmados por laboratório referenciado em Natal / Brasil) foram incubadas em poços com uma diluição de 1:100 durante 1 hora à temperatura ambiente. Como controle negativos, foram utilizados soros de paciente triados previamente com IgG e IgM negativas para Toxoplasmose. A ligação específica do anticorpo foi detectada com 1: 2.000 anti-IgG humano-peroxidase de rábano (Promega, Madison, WI), seguido de substrato ABTS (Sigma, St. Louis, MO), detectado com base na absorvância em 405 nm. O ponto de corte para uma reação positiva foi ajustado na média de três controles negativos + 3x o desvio padrão dos valores de absorvância controles negativos (n = 3). Cada amostra de soro foi analisada em duplicata.

4.15 Estímulo celular com os peptídeos quiméricos.

As amostras de sangue heparinizadas foram coletadas de todos os indivíduos recrutados. As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram separadas por centrifugação sobre um gradiente de *Ficoll-Hypaque* (GE, New Jersey, EUA). As células mononucleares foram ressuspensas em RPMI suplementado com 10% de AB Rh-soro humano (Corning), 10 mM de HEPES (Sigma), 1,5 uM de L-glutamina (Sigma), 200 UI de penicilina por ml e 200 000 de estreptomicina por ml (Sigma) e foram ajustados para 2×10^6 células/ml. As PBMC (10^6 células por poço) foram cultivadas *in vitro* em tubos de 15mL a 37°C numa atmosfera humidificada de 5% de CO₂ no ar e na presença do AgTX (concentração final de 10 µg/mL), PHA (2,5 µg/mL), peptídeos quiméricos: TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT (concentração final 20µg /mL), e meio RPMI (células não estimuladas). Após 3 dias em cultura, as células estimuladas com os antígenos foram colhidas e processadas para análises fenotípicas de moléculas de superfície. O sobrenadante de cada cultura foi recolhido e armazenado a -80 C. Para realizar a análise fenotípica, as células de cultura *in vitro* foram marcadas com anticorpos anti-CD25 conjugado ao flurocromo PE-Cy7(Phycoerythrin-. Cyanin 7) e com anti-CD3 conjugado ao fluocromo alofococianina-15 (Becton Dickinson Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, EUA). Vinte mil eventos

foram adquiridos de cada amostra de linfócitos usando o citômetro de fluxo FACS Canto II (BD, citômetro de fluxo Canto II, Becton Dickinson Bioscience, EUA). A molécula de superfície foi analisada usando o software FlowJo vX. A porcentagem de CD25 em células CD3 positivas foi analisada em um *gate* para seleção de linfócitos.

4.16 Determinação da produção de citocinas em sobrenadantes de cultura (CBA)

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-17A nos sobrenadantes de culturas de PBMCs foi realizada por meio da técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) (BD, Pharmingen, EUA) que se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com diferentes graus de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos, que são detectados nos canais FL3 ou FL4. Esse sistema permite uma análise quantitativa das citocinas marcadas com ficoeritrina em função do deslocamento dos grupamentos em FL2 obtidos por citometria de fluxo. Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 50 μ L de sobrenadante de cultura diluído 1:5 com diluente (reagente presente no kit CBA), alíquotas de 50 μ L dos padrões de citocinas submetidas à diluição seriada com diluente G (Top Standart – 5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 50 μ L de diluente G apenas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 15 mL. Em seguida, em cada tubo foram adicionados 50 μ L da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-2, anti-IL-4, anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-17A, anti-TNF e anti-IFN- γ (Human Th1/Th2/Th17 Cytokine CBA Kit), com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem, seguido de centrifugação à 200 g por 5 minutos. Em seguida o tubo foi vertido e adicionado 150 μ L de tampão de lavagem ressuspendendo o precipitado.

Os dados foram adquiridos em citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A.) e analisados com auxílio do software específico para CBA (FCAP Array TM Software, BD, Pharmingen, EUA), por meio de curvas de calibração obtidas dos padrões de citocinas do kit. Após a construção das curvas, a concentração dos analitos na amostra foi determinada em pg/mL, a partir dos valores de Intensidade Média de Fluorescência (MFI) obtidos na leitura da Fluorescência 2, sendo os resultados expressos em pg/mL.

4.17 Análises Estatísticas

O teste de Mann-Whitney foi usado para comparar diferenças entre pacientes negativos e positivos no teste de ativação celular, e comparar diferenças entre a produção de citocinas geradas nas culturas estimuladas com antígenos e não-estimuladas, usando o software Prisma Gráfico. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e exclusão de domínios estruturais das sequências referências das proteínas AMA-1, GRA-7 e SAG-1

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

5.2 Identificação de epítomos de células B

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

Figura 12. Regiões antigênicas (epítomos preditos) e as características físico-químicas foram identificadas na sequência das proteínas de *T.gondii*. (A) AMA-1seqI, (B) GRA-7, (C) AMA-1seq-II e (D) SAG-1. Nota: O eixo x

e o eixo y representam a identificação do epítipo da sequência e a propensão antigênica, respectivamente. O valor de limiar é 1.0. As regiões acima do limiar são antigênicas, mostradas em amarelo. As barras inferiores indicam as regiões preditas por possuir características físico-químicas que favoreçam epítipos de células B.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Tabela 2. Resultado final da predição de epítipos de células B. (1)Região contendo aminoácidos preditos como antigênicas para células B;(2) Região contendo aminoácidos com características físico-químicas (3) Sequência final determinada como epítipo B, gerada a partir da sobreposição de resultados .

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

5.3 Identificação de epítomos de células T

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Tabela 3. Predição de epítomos de células T. (1). Regiões de aminoácidos preditas como epítomos de células T para ligação à complexo de MHC-I. (D) haplótipo murino correspondente. Baixo score=maior ligação.(2). Regiões de aminoácidos preditas como epítomos de células T para ligação à complexo de MHC-II. I= haplótipo murino correspondente. Alto Score = Pouca ligação= X.(3).Predição de epítomos de células T de humanos

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

5.4 Construção dos peptídeos quiméricos *in silico*, modelagem molecular e características físico-químicas

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Figura 13. Construção dos peptídeos quiméricos TgGRA7/BsT (A), TgSAG1/BsT (B), TgAMA1seqI/BsT (C) e TgAMA1seqII/BsT(D), e através da junção de epítopos de células B e T.

A fim de identificar as possíveis estruturas contidas em cada peptídeo quimérico, foram gerados modelos 3D de cada peptídeo por modelagem molecular. Foram observadas estruturas secundárias regulares, como alfa-hélice e beta-pregueada, nos peptídeos TgAMA1seqI/BsT (figura 14) e TgGRA7/BsT (figura 16). Os peptídeos TgAMA1seqII/BsT (figura 15) e TgSAG1/BsT (figura 17) apresentaram ausência dessas estruturas, tendo suas estruturas primárias caracterizadas por uma cadeia linear.

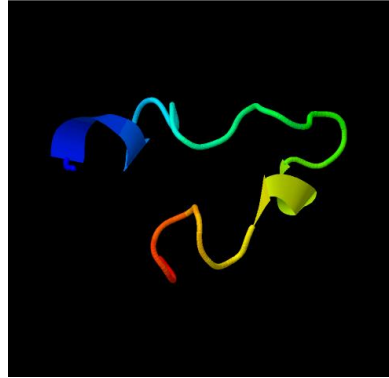


Figura 14. Visualização da estrutura do peptídeo TgAMA1seqI/BsT, resultante da modelagem por homologia. São observadas regiões secundárias estruturais nos trechos que compreendem os epítomos de células T.

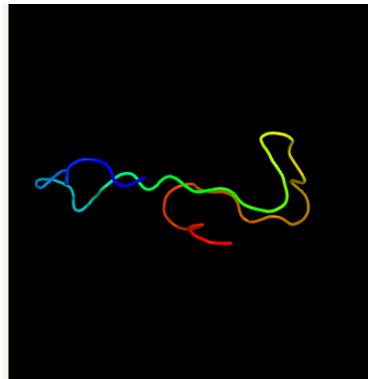


Figura 15: Visualização da estrutura do peptídeo TgAMA1seqII/BsT, resultante da modelagem por homologia.

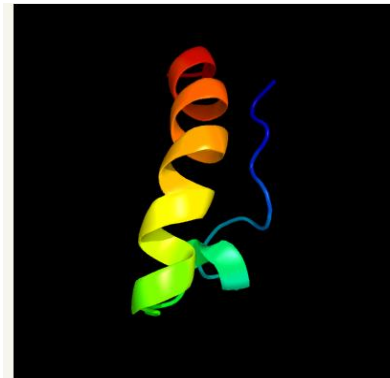


Figura 16. Visualização da estrutura do peptídeo TgGRA7/BsT, resultante da modelagem por homologia. São observadas regiões secundárias estruturais nos trechos que compreendem os epítomos de células T.

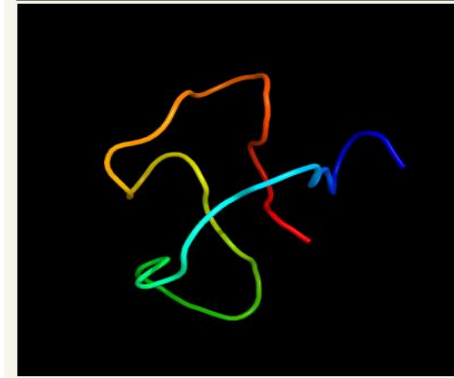


Figura 17. Visualização da estrutura do peptídeo TgSAG1/BsT, resultante da modelagem por homologia.

Tendo elaborada a sequência final dos aminoácidos que compõem cada peptídeo quimérico assim como as suas estruturas 3D, foram estimados a massa molecular, o ponto isoelétrico e detectadas possíveis regiões alergênicas, as quais caso presentes, impossibilitariam a execução dos testes *in vitro*. Essas características estão sumarizadas na tabela 4.

Tabela 4. Características físico-químicas dos peptídeos quiméricos contendo epítopos de células B e T. MW=massa molecular. PI= Ponto isoelétrico.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

A determinação dos pontos isoelétricos de cada peptídeo é importante para determinar a solubilidade em determinadas soluções, assim como possíveis interações entre os peptídeos entre si, e com outras proteínas. Nesse tocante, o peptídeo TgAMA1seqI/BsT apresentou pI= 4.65, enquanto os demais apresentaram pI superior a 8. Sendo o pI, o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma

proteína, o peptídeo TgAMA1seqI/BsT possivelmente é solúvel em tampões de caráter ácido ou até mesmo em água, enquanto os demais necessitam de um tampão de caráter básico, ou soluções orgânicas para solubilização.

5.5 Docking protéico entre os peptídeos quiméricos e moléculas de MHC

Todos os peptídeos quiméricos mostraram uma possível interação com moléculas de MHC, como mostrado na figuras 18 (A), (B), (C) e (D).

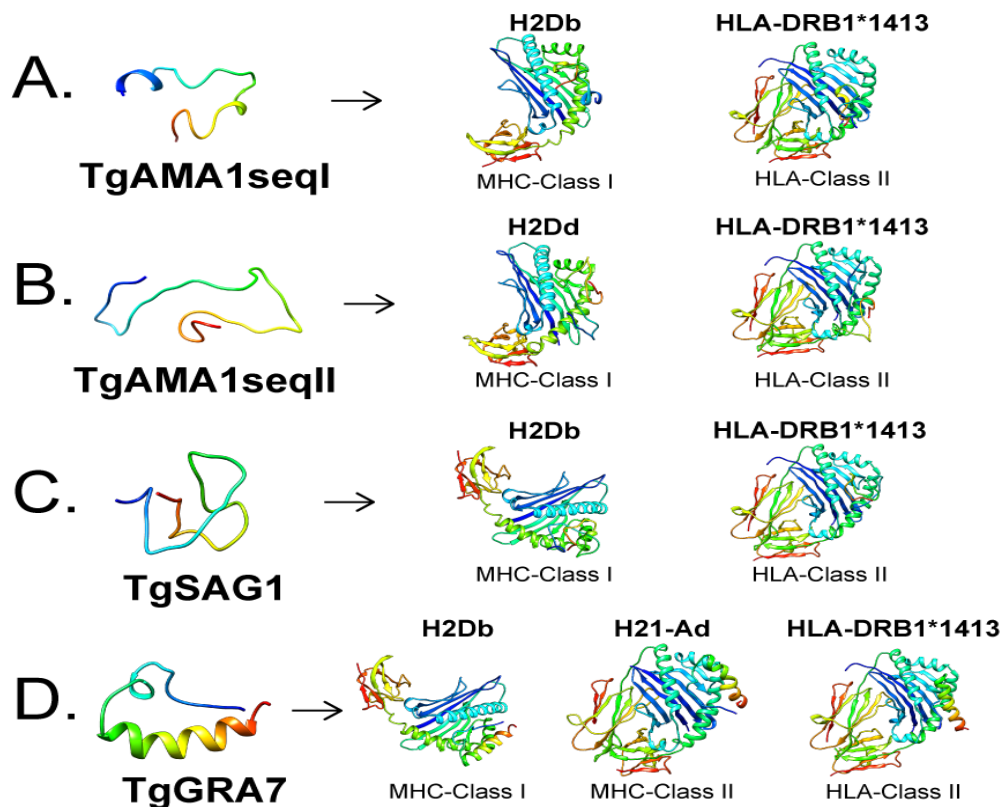


Figura 18. Docking molecular dos modelos propostos (peptídeos) com cada tipo de moléculas do MHC: (A) acoplamento molecular de TgAMA1seqI/BsT ao MHC-I de alelo 2Db murino e com MHC-II humano, HLA-DRB1 * 1413, (B) acoplamento molecular de TgAMA1seqII/BsT ao MHC-I do alelo 2Dd murino e com MHC-II humano ,HLA-DRB1 * 1413, (C) acoplamento molecular de TgSAG1/BsT ao MHC-I do alelo 2Db murino e MHC-II, humano HLA-DRB1 * 1413. (D) acoplamento molecular de TgGRA7/BsT aos MHC-I do alelo 2Db e MHC-II do alelo H2I-Ad murino, assim como com MHC-II humano, HLA-DRB1 * 1413.

Tendo confirmada as interações entre os nossos peptídeos alvos com moléculas do Complexo de Histocompatibilidade, foram criadas imagens ampliadas, as quais possibilitam a

visualização da interação mais específica entre alguns resíduos de aminoácidos contidos nos nossos peptídeos quiméricos, com aminoácidos das moléculas de MHC-II humano, alvo desse trabalho. As interações moleculares são apresentadas nas figuras, 19, 20, 21 e 22.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT:

870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.

• Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M

Figura 19. *Docking* ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgAMA1seqI/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos.

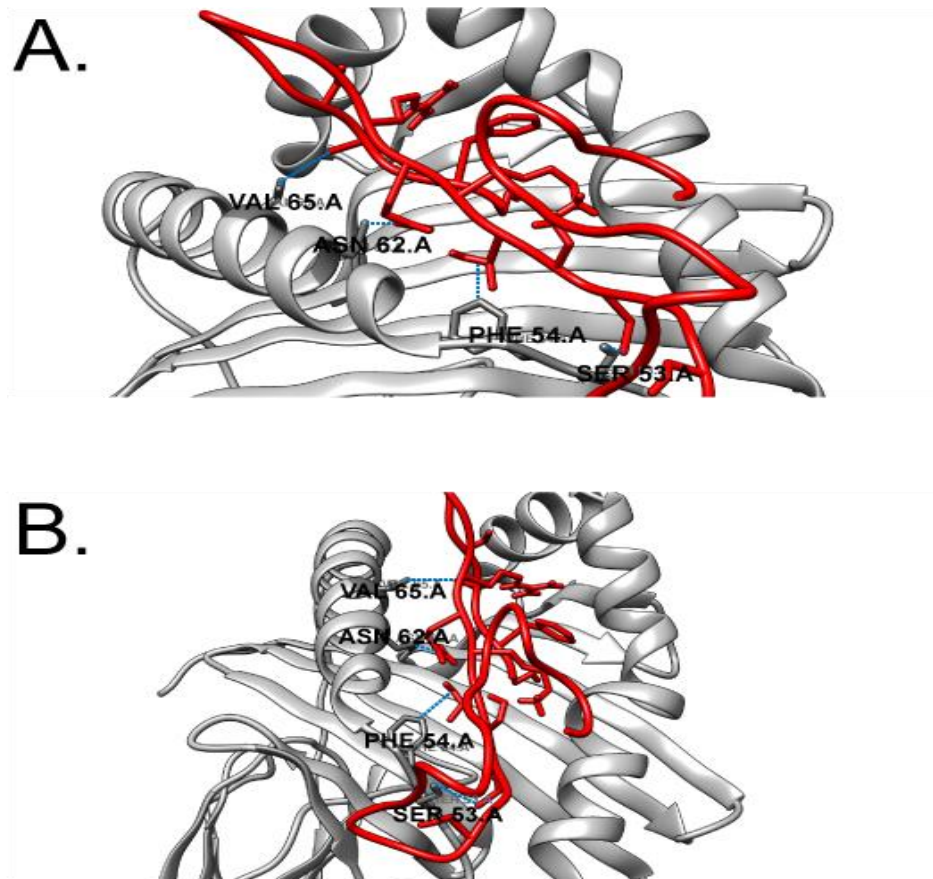


Figura 20. Docking ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgAMA1seqII/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos.

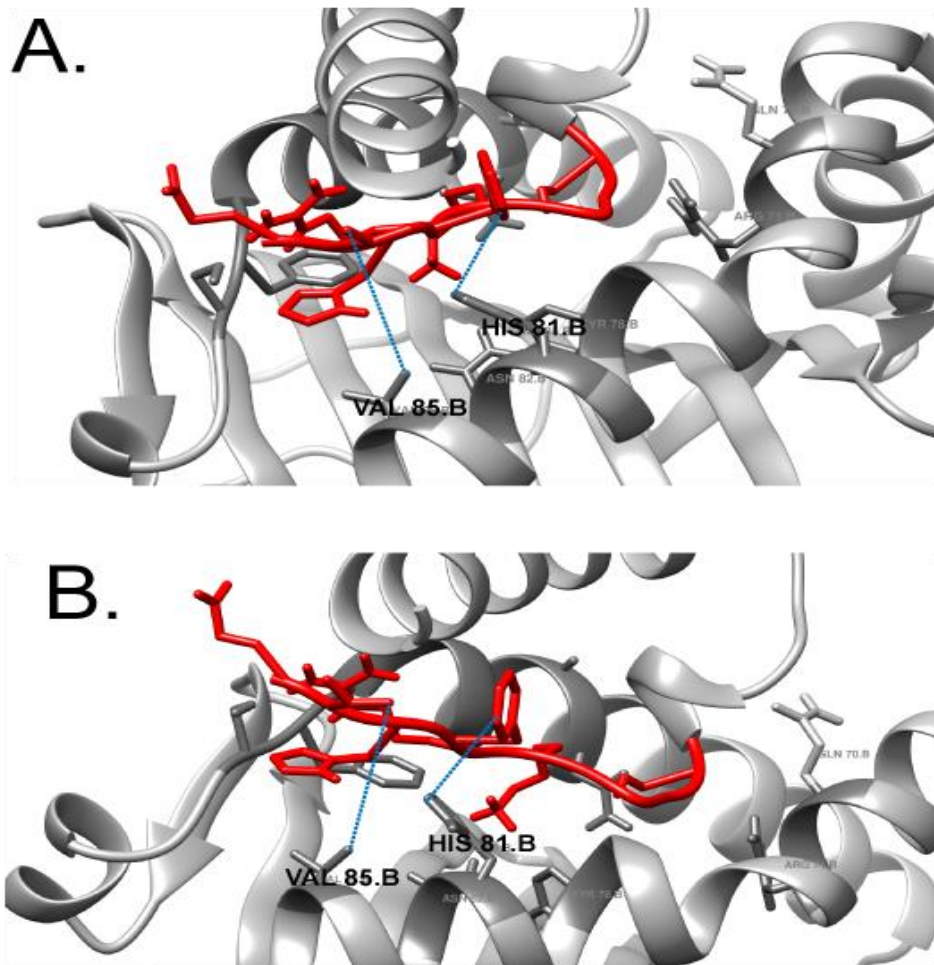


Figura 21. *Docking* ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgGRA7/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos.

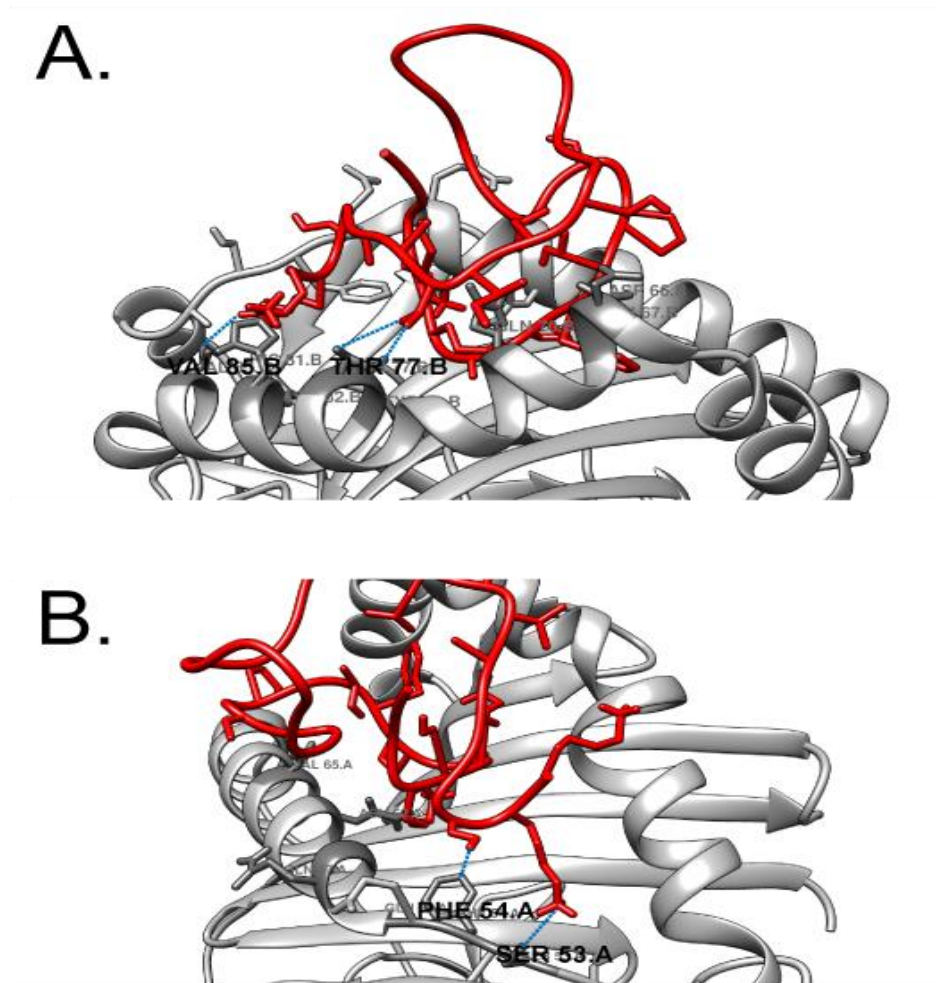


Figura 22. *Docking* ampliado mostrando as interações entre os resíduos de aminoácidos contidos no peptídeo quimérico TgSAG1/BsT interagindo com aminoácidos da molécula de MHC-II de humanos.

Dessa forma, através das análises *in silico*, foi mostrado possível potencial imunogênico dos peptídeos quiméricos através da ligação entre aminoácidos contidos nas regiões dos epítomos, com moléculas de MHC. Partindo desses resultados, foi elaborada uma estratégia para construir uma quimera multi-antigênica contendo os epítomos de células B e T de cada peptídeo.

5.6 Construção da proteína quimérica TgAGS/BsT e caracterizações *in silico*

Uma quimera completa, nomeada TgAGS/BsT, foi desenhada e projetada através da junção de cada epítipo dos peptídeos analisadas neste estudo

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Figura 23. Esquema de construção da quimera TgAGS/BsT formada através dos epítipos de células B e T contidos nas sequências dos peptídeos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

• **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

• **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

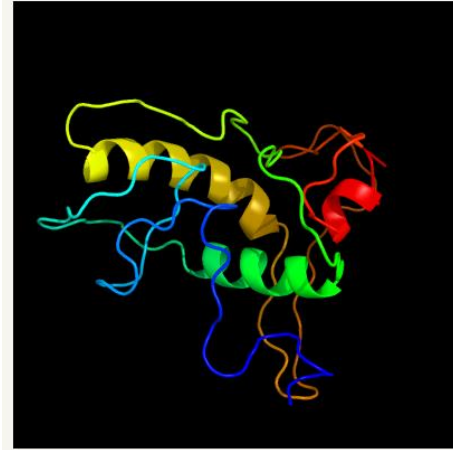


Figura 24. Estrutura 3D da proteína quimérica TgAGS/BsT. São apresentadas estruturas secundárias como alfa-hélice e beta-pregueadas

Por ser uma proteína maior que os peptídeos, não foi possível realizar o *docking* com moléculas do sistema imunológico através das ferramentas de bioinformática empregadas nesse trabalho, no entanto, as regiões imunogênicas, assim como possíveis sítios de clivagem, foram identificadas através de um alinhamento realizado pelo EMBOSS, conforme ilustra a figura 25.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

• **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Figura 25. Alinhamento final da proteína TgAGS/BsT ilustrando as possíveis regiões imunogênicas na sequência de aminoácidos que compõem essa proteínas, assim como, possíveis sítios de clivagem.

Como o objetivo do trabalho foi a obtenção dessa proteína por sistema recombinante, as sequências de aminoácidos foram submetidas a tradução reversa, selecionando a opção do códon preferencial para procariotos, mais especificamente, *E.coli*. Dessa forma foi possível obter a sequência de nucleotídeos que codificam a proteína TgAGS/BsT e são melhores expressos em vetores procariotos (Figura 26).

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Figura 26. Tradução reversa da sequência de aminoácidos da proteína TgAGS/BsT. A. Sequência de aminoácidos que compõem a proteína TgAGS/BsT. B. Sequência de nucleotídeos que codificam o gene da proteína TgAGS/BsT, obtida através da tradução reversa tendo como códon preferencial o de *E. coli*.

O gene que codifica a proteína TgAGS/BsT possui 441 pares de bases (bp), sendo que para clonar esse gene no plasmídeo de expressão, foram necessárias a adição de sítios de enzimas de restrição para os iniciadores senso e anti-senso, assim como a adição de códons de iniciação e parada. Com isso o produto de amplificação do gene aumentou seu tamanho para 461(bp). Tendo conhecimento também do mapa do plasmídeo utilizado para expressão da proteína em sistema recombinante, foi possível estimar o tamanho da proteína recombinante a ser obtida com acréscimo das seis histidinas conferida pelo plasmídeo. O peso molecular aproximado é de 18,6 KDa, conforme mostra a figura 27. Com essas análises foi possível partir para os métodos de amplificação, clonagem e expressão da proteína recombinante.

Dados ocultos devido ao depósito de patente com os resultados desse projeto:

INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

- **Número do registro: BR1020160101786. Número do depósito PCT: 870160017891. Data de depósito: 05/05/2016. Depositante/Titular:**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- **Título: PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII.**

- **Inventores: Moura, A. D.; SALHA, D. R. A. M.; JERONIMO, S. M. B.; Bruña-Romero, O.; F.A. NETO, V.; LIMA, J. P. M. S.; ALMEIDA, R. V. M**

Figura 27. Estimativa de peso molecular da proteína recombinante TgAGS/BST após expressão em bactérias *E.coli*, utilizando o plasmídeo pET-TEV, o qual irá conferir uma cauda de seis histidinas na porção N- terminal da proteína.

5.7 Amplificação, clonagem e expressão da proteína TgAGS/BsT em sistema recombinante

A sequência de nucleotídeos codificante para a proteína TgAGS/BsT foi amplificada pela técnica de PCR, tendo como DNA molde, o gene TgAGS/BsT sintetizado no plasmídeo pBlue. Para a confirmação da amplificação foi realizada eletroforese em gel de agarose 1% com o produto de PCR (figura 28), sendo visualizadas bandas com tamanho aproximado de 461 pares de bases, as quais correspondem ao tamanho do gene amplificado.

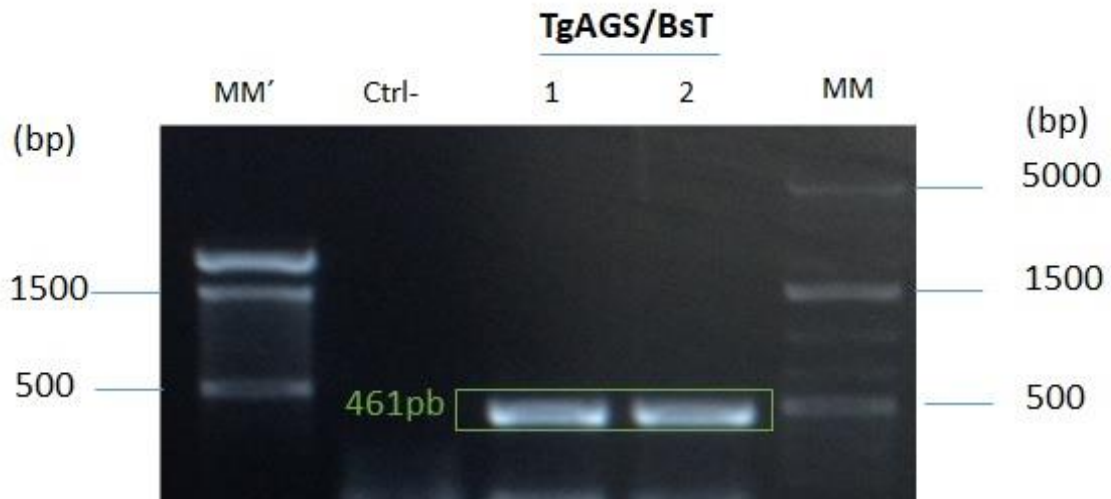


Figura 28. Eletroforese de gel em agarose do produto de PCR do gene TgAGS/BsT. MM': Marcador de peso molecular 100pb Invitrogen. Ctrl-: Controle negativo da reação, sem adição do DNA molde. 1 e 2. Fragmento correspondente ao gene TgAGS/BsT. MM: Marcador de peso molecular Gene Ruller 1Kb Plus(Thermo Fisher).

Os produtos de PCR foram purificados e inseridos no plasmídeo de clonagem pJET1.2/blunt . Posteriormente, os plasmídeos contendo o inserto de interesse foram inseridos em bactérias quimiocompetentes XL-1 Blue. Após os procedimentos de transformação e propagação dessas bactérias, foi realizada extração de DNA plasmidial e digestão enzimática para confirmação dos clones positivos. Para tal foram utilizadas as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. O fragmento correspondente a TgAGS/BsT de aproximadamente 461 pares foi clivado do pJET, confirmando a clonagem desse gene (figura 29).



Figura 29. Eletroforese de gel de agarose para a confirmação da clonagem do gene TgAGS/BsT através de digestão enzimática. Ctrl-: DNA circularizado do plasmídeo pJET1.2/blunt, o qual possui tamanho de 2974bp. 1, 2 e 3: Clones positivos contendo o inserto de 461bp referente ao gene da proteína TgAGS/BsT. MM: Marcador de Peso Molecular GeneRuller 1kbPlus (Thermo Scientific). NOTA: A presença de bandas abaixo do gene de interesse são resultantes do sítio de clivagem para *HindIII* que o plasmídeo, na posição 624-372 bp do MSC (Sítio de *HindIII* adicionado ao iniciador) = 252bp.

Após a confirmação por digestão enzimática, a banda de 461 pares de bases foi extraída do gel, purificada e quantificada. Após a análise do grau de pureza (superior a 1.9), foi feita a ligação do gene ao plasmídeo pET-TEV (figura 30.A), seguida de transformação bacteriana de *E.coli* da cepa NEB5-alpha (NEB), propagação dessas bactérias, extração de DNA plasmidial e novamente digestão enzimática utilizando as enzimas *BamHI* e *HindIII*, para confirmar se o inserto foi subclonado no plasmídeo de expressão. A análise foi novamente realizada por eletroforese de gel de agarose, onde foi possível confirmar a subclonagem do gene TgAGS/BsT no plasmídeo de expressão pET-TEV, através da visualização da banda específica ao gene resultante da clivagem por enzimas de restrição (figura 30.B).

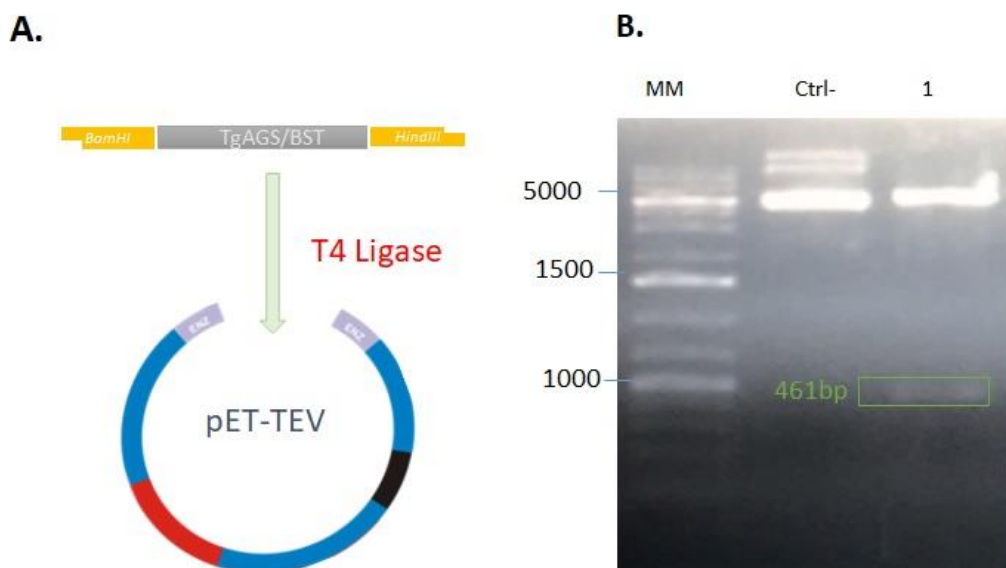


Figura 30. Subclonagem do gene TgAGS/BsT no plasmídeo de expressão pET-TEV. (A). O gene previamente clivado por ação das enzimas *HindIII* e *BamIII*, foi inserido ao pET-TEV, o qual também havia sido digerido por ação das mesmas enzimas de restrição, para sua linearização e formação de extremidades coesivas, as quais possibilitaram a inserção do gene por ação da T4 Ligase. (B). Eletroforese em gel de agarose, confirmando a subclonagem do gene TgAGS, através da banda de 461 pares de bases observada no gel, liberada do pET-TEV por ação das enzimas de restrição. MM. Padrão de peso molecular. Ctrl-: DNA circularizado do plasmídeo pET-TEV, o qual possui tamanho de 5357 pares de bases. 1. Clone positivo pET-TEV+TgAGS/BsT inseridos na bactéria *NEB5-alpha*.

Tendo confirmada a subclonagem no plasmídeo de expressão, foi realizada a transformação de bactérias quimiocompetentes da cepa *Arctic Express*, as quais são destinadas para expressão de proteínas. Os clones transformados foram selecionado através da adição de gentamicina e canamicina no meio de cultura onde essas bactérias foram semeadas, propiciando assim o crescimento apenas das cepas *Arctic Express* contendo o plasmídeo pET-TEV com o gene TgAGS/BsT inserido no seu cassete de expressão. Dois clones foram selecionados, propagados e induzidos com IPTG para a expressão da proteína recombinante TgAGS/BsT.

O procedimento de expressão foi realizado em temperatura de 13°C em shaker refrigerado por 24 horas, sob agitação contínua. Uma alíquota de 1mL de meio rico em bactérias foi retirada minutos antes da adição do IPTG à cultura bacteriana, denominado como controle não induzido. Essa alíquota foi centrifugada, o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspendido em 50 mL de água, sonicado três vezes durante 10 segundos para promover a lise bacteriana e obter as proteínas totais resultantes do processo de expressão. Após a lise, foram adicionados 10 mL do tampão da amostra contendo beta-mercaptoentanol, para análise em eletroforese de SDS-PAGE. O mesmo foi feito após 24 horas de expressão. As alíquotas foram então submetidas a eletroforese para confirmação da expressão. Foi observada uma banda de aproximadamente 18KDa na alíquota retirada após as 24horas de expressão, confirmando que a proteína TgAGS/BsT havia sido expressa em sistema recombinante (figura 31A). Dessa forma, todo volume de cultura de bactérias foi centrifugado, tendo os sobrenadantes descartados e os pellets submetidos a lise por sonicação e também por adição de lisozima. As etapas de purificação seguiram de aplicação da amostra na coluna previamente equilibrada com tampão de equilíbrio (PBS1X, 10mM imidazol, 8M Ureia), três etapas de lavagem com tampão de lavagem (PBS1X, 20mM imidazol, 8M Ureia) e três etapas de eluição, com tampão de eluição(PBS1X, 40mM de imidazol e 8M Ureia). Todas as etapas foram monitoradas por eletroforese SDS-PAGE, sendo evidenciada a presença da proteína TgAGS/BsT nas eluições, com o aumento da concentração de imidazol (figura 31B).

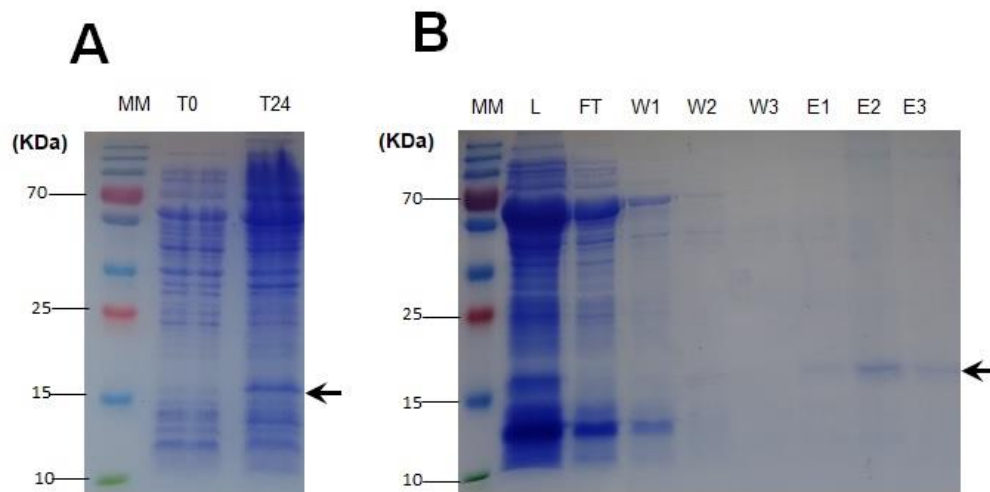


Figura 31: Expressão da proteína rTgAGS/BsT analisada através de SDS-PAGE. (A). rTgAGS/BsT contendo lisado bacteriano após indução de IPTG (T0 = não induzido, T24 = 24h após indução) (B). Etapas de purificação de rTgAGS/ BsT. (L = Lisado bacteriano. F = Fração não ligante. W1-W3 = Lavagens. E1-E3 = Eluições). Uma banda com massa molecular de cerca de 18,6 KDa correspondente ao peso de rTgAGS / BsT foi observada em todas as Eluições, indicada pela seta.

A proteína recombinante TgAGS/BsT (rTgAGS/BsT) foi expressa e obtida por sistema recombinante. No entanto, o grau de pureza da proteína não foi satisfatório, observado através dos rastros no gel de poliácridamida impossibilitando, nesse momento, avaliar o estímulo celular e de analisar a produção de citocinas geradas pela químera TgAGS/BsT.

5.8 Análise do potencial como marcador sorológico dos peptídeos quiméricos em reconhecer anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* por ELISA.

Os soros dos voluntários triados através do kit comercial e posteriormente classificados como pacientes positivos, n=10, foram testados qualitativamente pela técnica de ELISA afim de verificar, nesse primeiro momento, o reconhecimento de anticorpos específicos contra o AgTX, peptídeos quiméricos e a proteína quimérica rTgAGS/BsT. Todos os pacientes apresentaram o mesmo perfil imunológico ao comparar os resultados do kit comercial ao ELISA realizado no nosso laboratório tendo o AgTX como o antígeno que revestiu a fase sólida do teste (Tabela 5).

Técnica sorológica	Grupo positivo IgG (+) e IgM (-)	Grupo negativo IgG(-) e IgM (-)	Total
ECLIA (kit Roche)	10	20	30
ELISA (AgTX)	10	20	30

Tabela 5. Comparação das técnicas sorológicas utilizadas nesse estudo. Tanto no ECLIA como no ELISA, todos os 30 voluntários apresentaram o mesmo perfil imunológico para Toxoplasmose.

Posteriormente, os peptídeos quiméricos assim como a proteína quimérica foram utilizados como antígenos da fase sólida do ELISA para a detecção de anticorpos IgG no soro dos pacientes positivos, os quais reconheceriam os epítomos B contidos nesses peptídeos. Todos os pacientes apresentaram reatividade no ensaio de ELISA na detecção de IgG específicos contra TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT, TgSAG1/BsT e rTgAGS/BsT, sendo que o peptídeo TgSAG1/BsT foi reconhecido por anticorpos contidos no soro de 7 pacientes (n=10), e a quimera rTgAGS/BsT em 8 pacientes (n=8) conforme apresentado na tabela 7. TgAMA1seqI/BsT não foi testada nesse primeiro momento (NT).

Tabela 6. ELISA utilizando o soro dos pacientes positivos para análise de reatividade no reconhecimento de epítomos por anticorpos de pacientes crônicos assintomáticos para Toxoplasmose. Os dados foram apresentados através da mediana, valor mínimo e máximo de absorbância. O ponto de corte (cut-off) foi estabelecido através da média de absorbância de três pacientes negativos, multiplicado 3 vezes pelo desvio padrão. A reatividade foi atribuída aos pacientes que apresentaram valores de absorbância superior ao ponto de corte.

Antígeno	Mediana (OD 405nm)	Abs (mínima)	Abs (máxima)	Cut-off	Reatividade (Pacientes Positivos)
AgTX	0,2887	0,1955	0,382	0,103	10
TgAMA1seqII/BsT	0,3012	0,1875	0,415	0,124	10
TgGRA7/BsT	0,8265	1,433	0,22	0,213	10
TgSAG1/BsT	0,859	0,175	1,5435	0,370	7
TgAGS/BsT	0,501	0,054	0,9485	0,096	8

Esses resultados apontam potencial como marcadores de diagnóstico de todos os peptídeos quiméricos assim como a proteína quimérica para a detecção de IgG no soro de pacientes imunocompetentes assintomáticos. Dessa forma, torna-se essencial a realização de outras análises quanto à reatividade com subclasses de IgG assim como infecções agudas e co-

infecções para confirmar a especificidade de cada antígeno, através de métodos qualitativos e quantitativos.

5.9 Análise *in vitro* de ativação de células T por estímulos de cultura de PBMC com os peptídeos quiméricos

Na tentativa de confirmar os resultados derivados da abordagem de bioinformática, os peptídeos quiméricos foram sintetizados e testados em estímulos, *in vitro*, de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) derivadas de pacientes humanos previamente identificados como negativos e positivos para a infecção por *T. gondii*. Nós investigamos a capacidade de peptídeos quiméricos de induzir a expressão de CD25 em células T CD3⁺. Conforme mostrado na figura 32-B, células de pacientes infectados foi induziram a expressão CD25⁺ quando comparadas aos pacientes negativos, quando estimulada com AgTX (Tabela 5, $p = 0.0098$). Os peptídeos TgAMA-1seqI/BsT, TgAMA-1seqII/BsT, TgGRA-7/BsT e TgSAG-1/BsT foram capazes de induzir a expressão diferencial de CD25⁺ CD3⁺ em pacientes positivos quando comparados com negativos (figura 32 C, D, E e F e tabela 5).

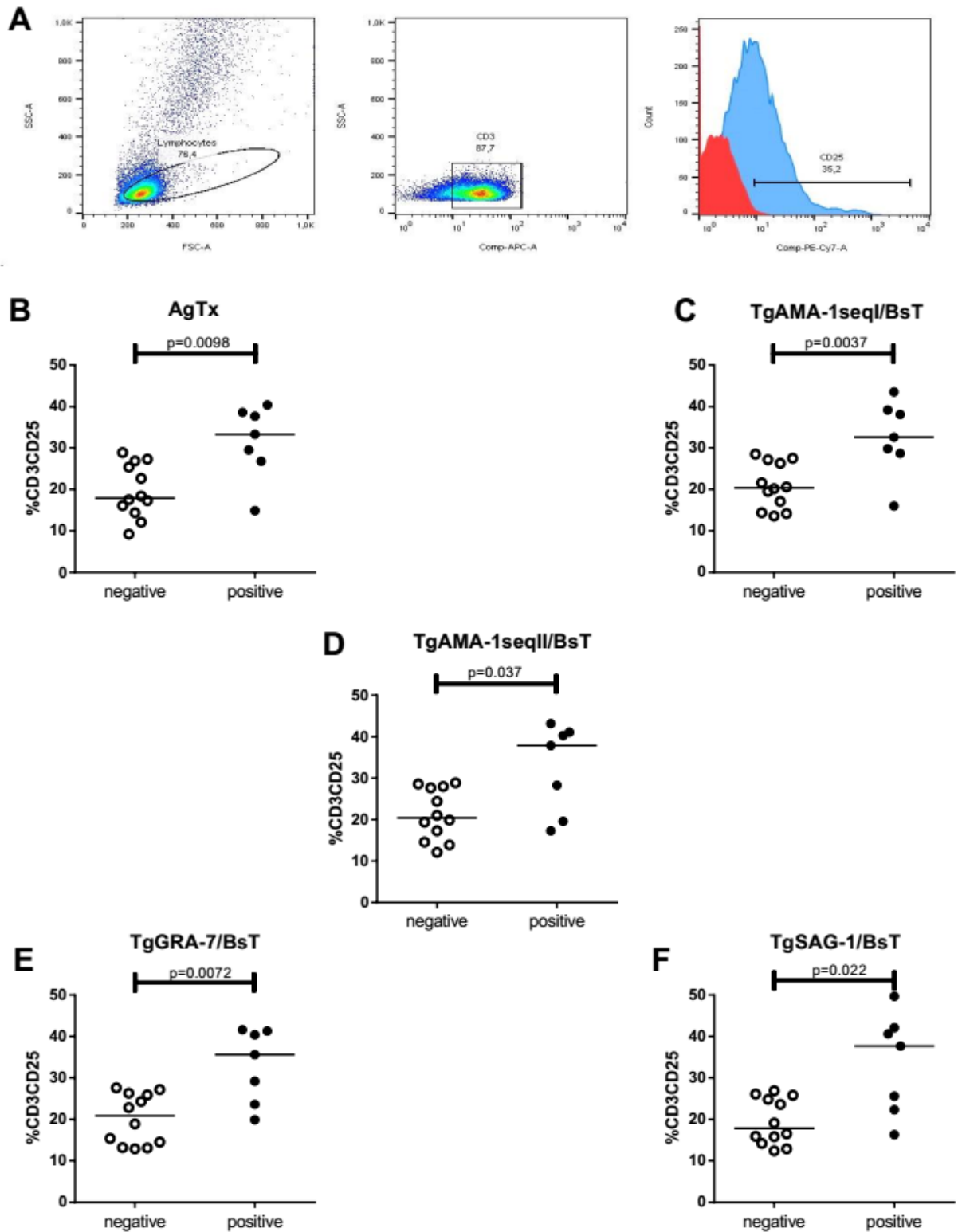


Figura 32. Análise da ativação de células T para validação dos peptídeos quiméricos in vitro. Gráficos representativos de análise de citometria de fluxo (A) Porcentagem de CD25⁺ em células T CD3⁺; (B) AgTx; (C) TgAMA-1seqI / BsT; (D) TgAMA-1seqII / BsT; (E) TgGRA-7 / BsT; e (F) TgSAG-1 / BsT.

Tabela 7. Dados de ativação celular mensurados a partir da expressão de CD25⁺ em células T CD3. n=Número de pacientes analisados. Os dados estão em valores de mediana e valores mínimos e máximos. A fitohemaglutinina (PHA) foi utilizada como controle positivo para o experimento, enquanto o Meio (RPMI) como controle negativo. P<0,05 representa valor significativo de acordo com *Mann-Whitney test*.

Antígeno	%CD3+CD25+		P value
	Negativo (n=12)	Positivo (n=7)	
Meio	20.9%(14.4-29.4)	31.9(13.2-44.9)	0.056
PHA	42.5%(16.6-67.7)	51.2(34.9-74.5)	0.068
AgTx	17.9%(9.2-28.9)	33.3%(14.9-40.4)	0.0098
TgAMA-1seqI/BsT	20.4%(13.6-28.5)	32.6%(16.0-43.5)	0.0037
TgAMA-1seqII/BsT	20.4%(12.1-28.9)	37.9%(17.3-43.2)	0.037
TgGRA-7/BsT	20.8%(12.9-27.6)	35.6%(19.9-41.6)	0.0072
TgSAG-1/BsT	17.8%(12.4-26.9)	37.7%(16.3-49.7)	0.022

As células não-estimuladas apresentaram baixa ativação sem diferenças significativas de pacientes negativos e positivos (dados não apresentados).

5.10 Análise da produção de citocinas em culturas celulares após estímulo com os peptídeos quiméricos pela técnica de CBA

Os peptídeos quiméricos foram capazes de estimular a produção de citocinas importantes para a proteção do hospedeiro em culturas de PBMC tais como INF- γ , TNF e IL-2. As citocinas IL-17A, IL-4, IL-6 e IL-10 não foram detectadas nos sobrenadantes das culturas celulares tanto em pacientes positivos assim como em pacientes negativos, utilizando o kit CBA Th1/Th2/Th17 (dados não apresentados).

Foi possível detectar a produção de INF- γ através da análise individual de cada paciente, a qual foi baseada no limite de detecção de 3,7 pg/mL (estabelecido pelo fabricante do kit), nas culturas estimuladas por AgTX, TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e

TgSAG1/BsT tanto em pacientes positivos como em pacientes negativos comparados com a cultura não-estimulada, meio (Figura 33). O peptídeo TgAMA1seqI/BsT induziu a produção dessa citocina em 4 pacientes negativos (n=6) e em 5 pacientes positivos (n=10), enquanto TgAMA1seqII/BsT induziu em 3 pacientes negativos (n=6) e em 2 pacientes positivos (n=10). TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT induziram respectivamente a produção de IFN- γ em 1 paciente negativo (n=6) e dois pacientes positivos n=(10).

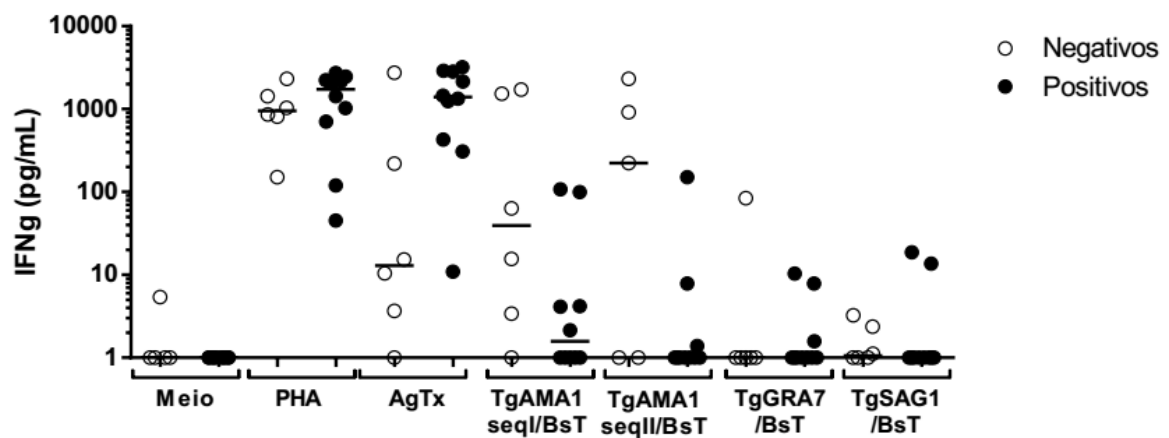


Figura 33. Detecção da produção de IFN- γ nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas com os peptídeos quiméricos, realizada pela técnica de citometria e fluxo.

O TNF foi detectado da mesma forma, sendo que o seu limite de detecção é de 3,8pg/mL. Comparando ao meio, foi possível identificar a produção de TNF em 1 paciente negativo (n=6) estimulado com TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT e TgSAG1/BsT e em 1 paciente positivo estimulado por TgAMA1seqII/BsT (figura 34).

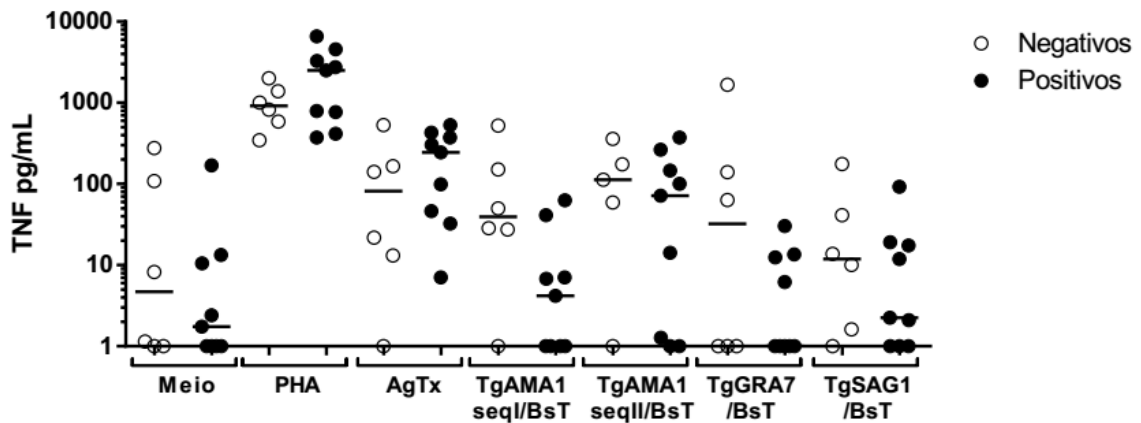


Figura 34. Detecção da produção de TNF nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas com os peptídeos quiméricos, realizada pela técnica de citometria e fluxo.

E por fim, a citocina IL-2 também foi detectada através do estímulo antigênico comparado ao meio, sendo seu limite de detecção de 2,6 pg/mL. As culturas estimuladas com os peptídeos TgAMA1seqI/BsT induziu a produção de IL-2 em cultura de 4 pacientes negativos (n=6) e 4 pacientes positivos (n=10), enquanto TgAMA1seqII/BsT induziu em 4 pacientes negativos (n=6) e 2 pacientes positivos (n=10). TgGRA7/BsT induziu a produção de IL-2 em 1 paciente negativo (n=6) e em 1 paciente positivo (n=10), enquanto TgSAG1/BsT induziu apenas em 1 paciente negativo (Figura 35).

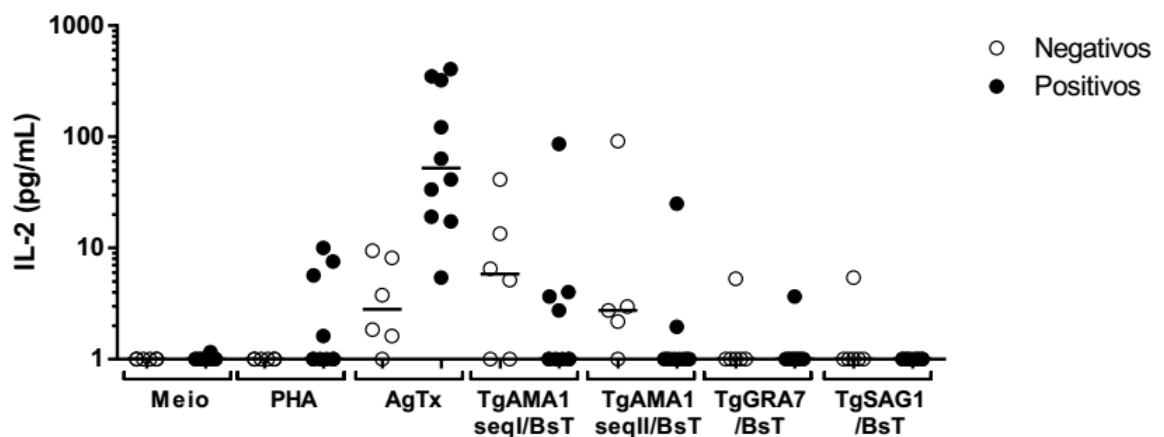


Figura 35. Detecção da produção de IL-2 nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas com os peptídeos quiméricos, realizada pela técnica de citometria e fluxo.

Em análises por grupos, negativos e positivos, foram observadas diferenças significativas nas culturas estimuladas com TgAMA1seqI/BsT e TgAMA1seqII/BsT na produção de IFN- γ e IL-2 no grupo dos pacientes negativos (n=6), comparadas com as culturas não estimuladas (Tabela 8). O AgTX e a PHA foram utilizados como controles positivos desse experimento.

Tabela 8. Dados estatísticos da produção de citocinas nas culturas celulares dos pacientes negativos. Resultados representados em mediana (min-max). Mann-Whitney test : (A). p=0,043; (B). p=0,034; (C). p=0,039; (D). p=0,071; (H). p=0,002; (M). p=0,015; (N). p=0,03; (O) p=0,028 .

Antígeno Citocinas	IFN-γ	TNF	IL-2
Meio	0,03 (0,0-5,38)	4,69 (0,0-275,8)	0,0 (0,0-0,6)
PHA	949,3 ^A (150,2-2309)	913,3 ^H (344,2-2000)	0,0 (0,0-0,0)
AgTx	12,93 ^B (0,03-27,42)	81,29 (0,0-529,3)	2,61 ^M (0,0-9,49)
TgAMA1seqI/BsT	39,41 ^C (0,0-1717)	39,29 (0,0-524,0)	5,83 ^N (0,0-41,39)
TgAMA1seqII/BsT	222,6 ^D (0,0-2309)	113,1 (0,0-358,2)	2,74 ^O (0,0-91,59)
TgGRA7/BsT	0,355 (0,0-84,25)	31,67 (0,0-1665)	0,12 (0,0-5,28)
TgSAG1/BsT	0,975 (0,0-3,25)	11,89 (0,0-176,5)	0,0 (0,0-5,42)

Em relação ao grupo de pacientes positivos (n=10), foram observadas diferenças significativas apenas na produção de IFN- γ nas culturas estimuladas com os peptídeos TgAMA1seqI/BsT e TgAMA1seqII/BsT, apresentadas na tabela 9. O AgTX e o PHA também foram utilizados como controles positivos do experimento.

Tabela 9. Dados estatísticos da produção de citocinas nas culturas celulares dos pacientes positivos. Resultados representados em mediana (min-max). Mann-Whitney test : (E). $p < 0,0001$; (F). $p = 0,0469$; (G) $p = 0,058$; (I). $p = 0,012$; (J). $p = 0,049$; (L). $p = 0,042$

Antígeno Citocinas	IFN-γ	TNF	IL-2
Meio	0,0 (0,0-0,87)	1,75 (0,0-169,4)	0,0 (0,0-1,16)
PHA	1728 ^E (45,3-2713)	2526 ^E (1,75-6592)	0,0 (0,0-7,55)
AgTx	1396 ^E (10,91-3194)	244,4 ^I (7,04-529,3)	52,42 ^E (5,42-405,2)
TgAMA1seqI/BsT	1,16 ^F (0,0-107,2)	4,18 ^J (0,0-62,63)	0,0 (0,0-86,28)
TgAMA1seqII/BsT	0,68 ^G (0,0-150,2)	71,43 (0,0-372,9)	0,0 (0,0-25,10)
TgGRA7/BsT	0,35 (0,0-10,3)	0,23 (0,0-30,27)	0,0 (0,0-3,66)
TgSAG1/BsT	0,0 (0,0-18,63)	2,25 (0,0-92,49)	0,0 (0,0-0,0)

6. DISCUSSÃO

Os avanços das ferramentas de bioinformática têm surtido grande importância nas pesquisas científicas, ampliando as possibilidades para criação de estratégias para o controle de doenças, através do desenvolvimento de vacinas e reagentes de diagnóstico baseados em antígenos contendo regiões específicas que se liguem à moléculas de células do sistema imunológico para desencadear uma resposta imunológica de proteção ao hospedeiro, assim como, se associem a anticorpos específicos aumentando dessa forma a precisão e acurácia dos diagnósticos sorológicos.

Nesse contexto, essas ferramentas podem ser utilizadas afim de aprimorar o diagnóstico sorológico da Toxoplasmose, assim como, desenvolver uma vacina capaz de proteger hospedeiros contra os diferentes isolados do parasito. No Brasil, essa doença ainda é negligenciada, e sintomatologias severas são recorrentes em humanos, tanto imunossuprimidos, os quais podem ir a óbito, assim como recentemente, isolados atípicos do parasito estão diretamente relacionados com os quadros mais severos também reportados em indivíduos imunocompetentes infectados por *T.gondii* (XIAO; YOLKEN, 2015).

Não há muitos estudos em humanos imunocompetentes com sorologias positivas para Toxoplasmose, tão pouco dados epidemiológicos, o que dificulta a elucidação dos fatores que causam tais sintomatologias severas nesses indivíduos. Além disso, um estudo recente sugere que a Toxoplasmose deve ser incluída na lista de doenças infecciosas que possivelmente possam estar associadas a doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer, devido à interações de proteínas do parasito na modulação de genes envolvidos nessas doenças (DUBEY et al., 2012; NGÔ et al., 2017).

Outro ponto importante levado em consideração é que não há evidências precisas se o parasito adquire a forma de cistos em algum tecido ou órgão, como cérebro, olhos ou se o patógeno foi realmente eliminado pela resposta imune do hospedeiro através da produção de citocinas e ação dos linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e anticorpos. Caso o parasito esteja encistado por exemplo no cérebro, um quadro de imunossupressão pode levar a reativação da doença, gerando graves consequências como encefalites, e dependendo do status imunológico do hospedeiro, o óbito (ŠTAJNER et al., 2013).

A utilização de antígenos múltiplos contendo epítomos imunodominantes, podem contribuir para a distinção da fase da doença pelo diagnóstico sorológico (WANG et al., 2016), sendo essa uma das perspectiva que tentamos alcançar nesse trabalho a partir da predição de epítomos em diferentes proteínas do parasito.

Selecionamos três classes diferentes de antígenos de *Toxoplasma gondii*, que participam no processo de invasão do parasito à célula hospedeira, assim como, na fase crônica da doença. A proteína AMA-1 (Proteína da classe de micronemas) foi escolhida por ser bem relatada em alvos como vacina e drogas anti-Malária, e também, com base em resultados vacinais dessa proteína em estudos de imunização de camundongos para Toxoplasmose. Muito embora não haja muitos estudos sobre o potencial dessa proteína como possível marcador sorológico de diagnóstico para a Toxoplasmose, e talvez nosso estudo seja pioneiro nessa abordagem, é bem descrito o seu papel no processo de invasão do parasito às células hospedeiras, o qual ativa uma resposta imunológica complexa que resulta também na produção de anticorpos (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007; MACRAILD et al., 2011; TYLER; TREECK; BOOTHROYD, 2011). Não se sabe se esse antígeno se mantém conservado em todas as cepas de *T. gondii*, todavia, foram selecionadas duas sequências da proteína AMA-1, uma oriunda da cepa RH (seqI) e outra da ME-49 (seqII), as quais apresentaram distinções na sequência de aminoácidos que as compõe.

As proteínas GRA-7 e SAG-1 de *T. gondii* são bem estudadas e matém suas sequências de aminoácidos conservadas em grande parte, na maioria das cepas do parasito. Em estudos de vacinação e testes de diagnósticos sorológicos para a Toxoplasmose, ambas as proteínas apresentaram potenciais no desencadeamento de uma resposta imune favorável à proteção dos animais imunizados, assim como, apresentam sensibilidade e especificidade ao serem reconhecidos por anticorposde humanos e outros animais positivos para Toxoplasmose (CHUANG et al., 2013; MIN et al., 2012; SUN et al., 2015; WANG; YIN, 2014; SELSELEH et al., 2012; ZHOU et al., 2007).

Com o propósito de mapear as regiões antigênicas contidas nessas proteínas, através da identificação de epítomos de células B e T assim como construir peptídeos quiméricos e uma

quimera multi-antigênica, que aumente a especificidade no reconhecimento de anticorpos por essas estruturas, adicionalmente, a indução de uma resposta imune também específica que desencadeie a proliferação de linfócitos T e gerem citocinas relatadas como cruciais para proteção dos hospedeiros, utilizamos métodos de bioinformática como ferramentas principal para esse objetivo.

Um dos desafios do sistema imunológico é a resposta mediada por anticorpos em que os linfócitos B têm a capacidade de reconhecer antígenos estranhos em locais conhecidos como receptores de epítomos de células B. Os epítomos de células B são encontrados na superfície do antígeno sendo assim reconhecidos (sequências entre 8 a 20 resíduos de aminoácidos) e ligado a um receptor de células B. Os epítomos das células B podem ser descritos como epítomos lineares. Epítomos lineares são aqueles formados por resíduos dispostos sequencialmente de maneira linear num antígeno protéico. Não são afetados por nenhum tratamento que altere a estrutura tridimensional da substância. Epítomos conformacionais são aqueles formados pelas estruturas secundária, terciária ou quaternária de uma proteína, ou pelo dobramento tridimensional normal de um polissacarídeo. Eles perdem suas funções de epítomos se desnaturados (ATASSI; SMITH, 1978; LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006).

Após as obtenções das tabelas resultantes das análises, foi feita uma sobreposição das regiões preditas pelos dois métodos (figura 12), e determinada a sequência final (tabela 2) de cada epítomo B que contenha todas as características necessárias para ser considerado imunodominante. Conforme mostrado na tabela 2, existe uma síntese de epítomos sobreposta que cobre as sequências dos antígenos de *T. gondii* escolhidas, regiões dadas pelos diferentes métodos.

Foi possível mapear epítomos de células B e T através das ferramentas de bioinformática, além de construir peptídeos quiméricos formados pela junção desses epítomos e simular as possíveis interações com moléculas do sistema imunológico (REDDY CHICHILI; KUMAR; SIVARAMAN, 2013).

Com isso, foram construídos os peptídeos quiméricos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT.

Além disso, buscamos através da metodologia do Docking por homologia, confirmar se os peptídeos quiméricos previamente construídos interagiriam com moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade. Todos os nossos peptídeos apresentaram interação com moléculas (MHC), elencando regiões específicas de interações entre os aminoácidos dos peptídeos e a molécula MHC do hospedeiro. Esse é o primeiro passo para poder construir uma vacina e ou imunoterapêutico contra Toxoplasmose, uma vez que epítomos de células T ligados a MHC-I são apresentados a linfócitos T CD8⁺ e os ligados a moléculas de MHC-II são apresentados a linfócitos T CD4⁺ e ambos os tipos de linfócitos são cruciais para resposta celular de proteção do hospedeiro (DENKERS; GAZZINELLI, 1998b; DENKERS; SHER; GAZZINELLI, 1993)

Produtos quiméricos contendo diferentes epítomos de células B imunorreativos de vários antígenos *T.gondii* que foram adequadamente selecionados são o novo tipo de ferramenta de diagnóstico para a detecção de anticorpos na amostra de soro humano (HOLEC-GASIOR, 2013). Similarmente, vacinas à base de proteínas quiméricas contendo epítomos de células T são capazes de prevenir a Toxoplasmose aumentando a imunidade do hospedeiro estimulando a resposta eficaz de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e produção de IFN- γ , representando um novo progresso no desenvolvimento de vacinas inovadoras (BEGHETTO et al., 2006).

Uma quimera contendo todos os fragmentos de epítomos de células B e T das proteínas alvo desse estudo, também foi construída. Denominada TgAGS/BsT, essa proteína foi projetada para obtenção em sistema recombinante. Através da sequência de aminoácidos que compõem a quimera traçamos estratégias para obtenção do gene codificante dessa proteína. A tradução reversa foi feita pela ferramenta a qual aceita uma sequência de proteína como entrada e usa uma tabela de uso de códons para gerar uma sequência de DNA que representa a sequência de codificação não degenerada mais provável. Uma sequência de consenso derivada de todos os possíveis códons para cada aminoácido também é retornada. Foram selecionados códons preferências para expressão em bactérias durante esse procedimento afim de obter uma sequência de nucleotídeo que favoreça a expressão heteróloga da proteína em procariotos, *E.coli*.

Foi possível amplificar o gene codificante da proteína TgAGS/BsT assim como express-lá em sistema recombinante, para que após a comprovação da eficácia dos peptídeos

em testes *in vitro*, essa quimera também seja testada abrindo perspectivas futuras com aplicações em vacinas e diagnóstico.

Para validar o potencial dos peptídeos quiméricos como marcadores de diagnóstico na detecção de anticorpos contidos nos soros de pacientes crônicos assintomáticos com sorologia positiva para Toxoplasmose, foi realizada a técnica de ELISA, utilizando o AgTX, os peptídeos quiméricos TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT, TgSAG1/BsT e a proteína rTgAGS/BsT como antígenos de fase sólida nesse teste. Nossos resultados apontaram o reconhecimento de anticorpos específicos aos epítomos de células B contidos nos peptídeos TgAMA1seqII/BsT e TgGRA7/BsT, com reatividade de 100% (tabela 6). A proteína rTgAGS/BsT foi reconhecida em 80% dos indivíduos (n=10) enquanto o peptídeo TgSAG1/BsT foi reativo em 70% dos indivíduos (n=10). Um outro estudo sorológico conduzido com indivíduos com toxoplasmose aguda, latente e toxoplasmose ocular inativa, confirmaram à proteína SAG ser um marcador sorológico importante para a detecção da infecção por *T. gondii*, mas não ser o mais sensível dentre aqueles descritos na literatura (CARDONA et al., 2009; MAKSIMOV et al., 2012a)

O kit comercial utilizado como padrão dessas análises foi o ECLIA da Roche, o qual utiliza a proteína SAG1 como antígeno de fase sólida (PRUSA et al., 2010), mas não teve a sequência de aminoácidos revelada e possivelmente contém mais do que um epítomo de célula B em sua sequência. Embora a técnica seja diferenciada do ELISA, o AgTX reconheceu todos os soros de pacientes por ELISA, assim como TgAMA1seqII/BsT e TgGRA7/BsT. Isso nos leva à inferência de que o epítomo de célula B contido no peptídeo TgSAG1/BsT pode não ser o mais sensível para a detecção de anticorpos em pacientes crônicos da Toxoplasmose, da mesma forma, que esse epítomo pode estar relacionado a perda de reatividade de dois pacientes testados contra a quimera TgAGS/BsT. Wang e colaboradores, 2013, construíram peptídeos quiméricos contendo mais de três epítomos de célula B identificados na proteína SAG1, e apresentaram resultados promissores para o diagnóstico sorológico para Toxoplasmose (WANG et al., 2013).

O potencial de epítomos de células B contidos em diferentes regiões das proteínas SAG1 e GRA7 em reconhecer anticorpos específicos e serem considerados excelentes candidatos como marcadores de diagnóstico, já tem sido relatado em vários trabalhos. Um primeiro exemplo disso, foi mostrado por Hajissa e colaboradores, 2015, no qual foram utilizados

métodos computacionais diferentes dos nossos, resultando na identificação de epítomos distintos dos nossos a nível de sequências de aminoácidos, construíram uma quimera multiantigênica composta por três sequências preditas de epítomos contidos nas proteínas SAG1, GRA2 e GRA7 e verificaram alta reatividade no reconhecimento de IgG através das técnicas ELISA e Western blotting de pacientes com Toxoplasmose (HAJISSA et al., 2015).

Nossos peptídeos quiméricos possuem apenas 1 epítomo B de cada antígeno alvo, e também apresentaram alta reatividade nesse primeiro momento. Embora o nosso n de pacientes seja pequeno, e analisamos apenas a possível reatividade apenas dos pacientes positivos crônicos, nossos resultados abrem perspectivas para a ampliação do teste afim de detectar possíveis reações cruzadas e /ou analisar a reatividade na detecção de outras imunoglobulinas. Beghetto e colaboradores, 2006, construíram uma quimera multi-antigênica contendo fragmentos das proteínas MIC1, MIC2, M2AP, GRA3, GRA7 e SAG1 de *T. gondii*, e verificaram potencial para imunodiagnóstico na detecção de IgG e IgM de pacientes positivos para Toxoplasmose. Os resultados apontaram ainda um potencial em distinguir pacientes infectados de não-infectados, além de sensibilidade semelhante ao uso do antígeno total de *T. gondii* (BEGHETTO et al., 2006).

Em outro estudo, Maksimov e colaboradores, 2015, selecionaram 20 peptídeos compostos por epítomos lineares identificados pelo software ABCpred, oriundos das proteínas GRA1, GRA2, GRA4 e MIC3 de *T. gondii*. Em adição, foi feita a busca por sequências de peptídeos contendo epítomos para células B e T em trabalhos previamente publicados, oriundos das proteínas GRA1, SAG1, NTPase1, e NTPase2. Foram realizadas análises de bioinformática e testes imunológicos os quais confirmaram também, potencial para imunodiagnóstico utilizando peptídeos quiméricos contendo epítomos previamente mapeados (MAKSIMOV et al., 2012b).

Interessantemente, ainda nessa abordagem, o peptídeo TgAMA1seqII/BsT e TgGRA7/BsT se apresentaram como melhores candidatos ao diagnóstico quando comparado aos demais.

Não há relatos da utilização da proteína AMA1 de *T. gondii* no diagnóstico sorológico contra a Toxoplasmose. Nosso peptídeo TgAMA1seqII/BsT foi reconhecido por IgG contido no soro dos pacientes estudados. Nesse contexto, cabe a avaliação da reatividade através do ELISA de avidez assim como estudar pacientes negativos e com sintomatologias diversas da doença.

Para confirmar a eficácia dos epítomos de células T quem compõe cada peptídeo quimérico, foram realizados estímulos antigênicos em culturas de células de PBMC isoladas de indivíduos com sorologia positiva (IgG positivo e IgM negativo) e negativos com os peptídeos quiméricos para verificar a ativação de células T, pela expressão de CD25 em CD3. O CD3 é um marcador de células T específico e necessário para diferenciar células T CD4⁺ e T CD8⁺ de outras populações, pois esse marcador está associado aos receptores de antígenos T (TCR), exigido para a expressão na superfície celular e para a transdução de sinal pelo TCR (KELLY; SHORTMAN; SCOLLAY, 1988). Em adição, o CD25 é expresso por linfócitos B e T ativados, e é utilizado como marcador de uma subpopulação de linfócitos T. Esse marcador está associado a cadeia do receptor de IL-2 e também tem sido utilizado como marcador imunohistoquímico para Toxoplasmose ocular adquirida, onde o CD25 mostrou uma maior expressão de IL-2 nos casos de Toxoplasmose ocular adquirida (MIYAMOTO et al., 2010). Em outro estudo, foi verificado um aumento significativo de células CD3⁺ expressando CD25⁺ em pacientes IgG positivos quando são estimulados com antígeno solúvel de *T. gondii* e expressão praticamente nula em pacientes negativos (KAHI et al., 1998)

Nossos resultados apresentaram uma maior ativação de células CD3⁺ através da expressão de CD25⁺ em pacientes positivos comparados com pacientes negativos, quando estimulados com os peptídeos quiméricos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT, TgSAG1/BsT e AgTx. Esse fato está possivelmente associado aos linfócitos T de memória dos pacientes com IgG positivo. Pacientes negativos, os quais não tiveram contato com o patógeno, possuem células naives, as quais necessitam de IL-2 para ativação de células T CD4⁺ e diferenciação em células efetoras e de memória. Pacientes positivos já possuem células de memória contra os antígenos do patógeno, as quais apresentam CD25 ativados e se proliferam ao reconhecer antígenos desse patógeno em um mecanismo que não necessariamente necessita de IL-2 (DOOMS; ABBAS, 2006; GARCÍA-MARTÍNEZ; LEÓN, 2012; GOLUBOVSKAYA; WU, 2016).

Corroborando com essa hipótese, foi verificado através da dosagem de citocinas, que apenas os grupos dos pacientes negativos apresentaram diferenças significativas na produção de IL-2 após o estímulo com os peptídeos quiméricos comparadas às culturas não estimuladas (tabelas 8 e 9). Embora tenha sido realizada a análise individual de cada paciente, conforme ilustra a figura 35, ainda assim, essa citocina foi produzida em maior número em pacientes

negativos, sendo também observado, que os peptídeos TgAMA1seqI/BsT e TgAMA1seqII/BsT se mostraram mais eficazes na indução da produção de IL-2 quando comparados aos demais. Esses dados são importantes, pois a IL-2 possui papel na modulação da resposta protetora do hospedeiro (SHIRAHATA et al., 1993). Para elaborar uma correlação direta entre a expressão de CD25⁺ e produção de citocinas, é necessário que o número de pacientes seja aumentado.

Outra citocina imunorregulatória importante para a resposta de proteção contra a Toxoplasmose é a IL-10. Nossos peptídeos não estimularam a produção dessa citocina. Um estudo sugere que a IL-10 é detectada em pacientes com quadro agudos de Toxoplasmose após estímulo antigênico em culturas de células humanas (TORRES-MORALES et al., 2014). Nenhum paciente com quadro agudo da doença foi analisado nesse estudo.

Além da produção de IL-2 foi verificada também a baixa produção de TNF em apenas 1 paciente negativo estimulado com os peptídeos quiméricos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT e TgSAG1/BsT e AgTX, e apenas 1 paciente positivo estimulado com TgAMA1/SeqII/BsT. A detecção de TNF indica a ativação de macrófagos e monócitos, e embora essa citocina também possua papel importante na proteção do hospedeiro, o excesso de TNF pode favorecer a formação de cistos do parasito assim como gerar uma resposta inflamatória ao hospedeiro (KHALIL; RASHWAN, 1996; LIESENFELD et al., 1999; RICARD et al., 1996).

E por fim, foi verificada produção de INF- γ nas culturas estimuladas por AgTX, TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT tanto em pacientes positivos como em pacientes negativos comparados com a cultura não-estimulada, quando analisados individualmente (figura 33). O INF- γ é a citocina crucial para imunidade protetora contra a infecção causada pelo *Toxoplasma gondii*, pois além de estimular células do sistema imune inato, ativam linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (GAZZINELLI et al., 1991; LIESENFELD et al., 1999). Além disso, essa citocina inibe a replicação do *T. gondii* em células do tecido epitelial e em sítios oculares em humanos (DENKERS; GAZZINELLI, 1998b; DIMIER; BOUT, 1997; NAGINENI et al., 1996).

Os trabalhos utilizando peptídeos quiméricos contendo epítopos de células B e T mapeados e selecionados por ferramentas de bioinformática, mostram que o IFN- γ é a principal

citocina que está relacionada diretamente com a proteção dos camundongos perante a um desafio secundário com cepas de *T. gondii*. Obviamente há a participação de anticorpos e outras citocinas geradas após a imunização. Como estratégia de potencializar e direcionar as respostas imunes, são acrescentadas moléculas imunomodulatórias aos peptídeos alvos, assim como utilização de diversos tipos de protocolos, adjuvantes e sistemas de entrega dos peptídeos como por exemplo, vírus modificados e nanopartículas, fazendo com que um antígeno potencial se torne de fato uma vacina (ASSOLINI et al., 2017; CAETANO et al., 2006; CONG et al., 2012; EL BISSATI et al., 2016; LIU et al., 2008)

Nossos resultados apontam potencial uso como marcadores de diagnóstico e vacina através das análises realizadas, *in silico* e *in vitro*, para os peptídeos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT, TgSAG1/BsT e também a proteína rTgAGS/BsT.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi possível mapear epítomos de células B e T contidos nas proteínas AMA1, GRA7 e SAG1 de *Toxoplasma gondii*, e adicionalmente construir os peptídeos quiméricos TgAMA1seqI/BsT, TgAMA1seqII/BsT, TgGRA7/BsT e TgSAG1/BsT formados pela junção desses epítomos. Através de análises *in silico*, todos os peptídeos mostraram possíveis interações específicas com moléculas de MHC-I e MHC-II, principalmente da população brasileira. Foi também construída uma proteína quimérica multi-antigênica (rTgAGS/BsT) contendo todos os epítomos previamente identificados, os quais apresentaram potencial como marcadores de diagnóstico ao serem reconhecidos por anticorpos contidos no soro de pacientes positivos para Toxoplasmose, assim como, potencial para futuros estudos em murinos como vacinas, por ativar linfócitos em uma população de células CD3⁺ através da expressão de CD25⁺, assim como, induzir a produção de citocinas (IFN- γ e IL-2) importantes para a proteção do hospedeiro.

8. ANEXOS

APÊNDICE A - PATENTE DEPOSITADA



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2016 010178 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24365710000183

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO S/N

Cidade: Natal

Estado: RN

CEP: 59072-970

País: Brasil


Telefone:

Fax:

Email: nit@reitoria.ufrn.br

Dados do Pedido**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (64):** PRODUTOS QUIMÉRICOS COM USO POTENCIAL COMO MARCADORES ANTIGÊNICOS DE DIAGNÓSTICO E/OU VACINAS RECOMBINANTES CONTRA TOXOPLASMOSE, FORMADOS ATRAVÉS DA JUNÇÃO DE EPÍTOPOS B E T DAS PROTEÍNAS AMA-1, GRA-7 E SAG-1 DE TOXOPLASMA GONDII**Resumo:** A presente invenção diz respeito a construção de produtos quiméricos formados através da junção de sequências geneticamente modificadas contendo epítopos de células B e T dos antígenos AMA-1, GRA-7 e SAG-1 de *Toxoplasma gondii*, assim como, uma proteína recombinante codificada pela junção das referidas sequências, podendo ser expressa em diversos veículos vacinais, como plasmídeos e vírus geneticamente modificados. Tal invenção possui campo em biotecnologia e na indústria farmacêutica, podendo ser útil em imunizações de mamíferos e como marcador antigênico de diagnóstico contra a Toxoplasmose.**Figura a publicar:** 1**Dados do Inventor (72)****Inventor 1 de 7****Nome:** ANDREW DOUGLAS MOURA**CPF:** 07199774605**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fiel:** Outras ocupações não especificadas anteriormente**Endereço:** Avenida Passeio dos Girassóis, nº 2570, Apartamento 32, Capim Macio**Cidade:** Natal**Estado:** RN**CEP:** 59078-190**País:** BRASIL**Telefone:** (84) 996 947346**Fax:****Email:** andrewdouglas.moura@gmail.com**Inventor 2 de 7****Nome:** DANIELLA REGINA ARANTES MARTINS SALHA**CPF:** 91622301404**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fiel:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Coronel Luciano Saldanha, nº 1817, Capim Macio**Cidade:** Natal**Estado:** RN**CEP:** 59078-390**País:** BRASIL**Telefone:** (84) 999 855263**Fax:****Email:** daniellamartins@cb.ufrn.br

APÊNDICE B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E TCLE

 <p style="margin: 0;">COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA</p>								
PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP								
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA								
Título da Pesquisa: CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA PROTEICA E VETORES VIRAIS EXPRESSANDO EPITOPOS T E B DAS PROTEÍNAS AMA1, BAG1 e GRAT DE TOXOPLASMA GONDII, E ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM FORMAS CLÍNICAS VARIADAS DE TOXOPLASMOSE.								
Pesquisador: Daniela Regina Azeites Martins Salha								
Área Temática: Projetos de pesquisa que envolvam organismos geneticamente modificados (OGM), células-tronco embrionárias e organismos que representem alto risco coletivo. Incluindo organismos relacionados a eles, nos âmbitos de: experimentação, construção, cultivo, manipulação, transporte, transferência, importação, exportação, armazenamento, liberação no meio ambiente e descarte;								
Versão: 3								
CAME: 56191416.0.0000.5537								
Instituição Proponente: Centro de Biotécnicas								
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio								
DADOS DO PARECER								
Número do Parecer: 1.717.547								
Apresentação do Projeto:								
INTRODUÇÃO								
A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição geográfica mundial com grande importância médica e veterinária causada pelo <i>Toxoplasma gondii</i> , um protozoário intracelular obrigatório, que infectam vários animais de sangue quente, desde aves até humano. A transmissão desse protozoário ocorre principalmente por via oral através da ingestão de cistos contendo bradizóitos, presentes em carne crua ou mal cozida, ou pela ingestão de oocistos contendo esporozóitos, liberados nas fezes de felídeos; hospedeiros definitivos do parasito. Os esporozóitos são a forma infectante oriunda do processo de reprodução sexuada de <i>T.gondii</i> . O ciclo de vida sexuado do parasito ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae. Nos herbívoros, os oocistos são a principal via de transmissão. A cada ano, estima-se que o <i>T. gondii</i> infecta mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, sendo sua infecção geralmente assintomática em adultos saudáveis, podendo causar graves complicações em recém-nascidos infectados congênitamente e								
<table border="0" style="width: 100%; font-size: small;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: SEP 510 NORTE, BLOCO A P ANDAR, Edifício Ex-1401 - Unidade 1 - Ministério de Saúde</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Asa Norte</td> <td>CEP: 70.750-021</td> </tr> <tr> <td>UF: DF</td> <td>Município: BRASÍLIA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (011)315.5479</td> <td>E-mail: conep@saude.gov.br</td> </tr> </table>	Endereço: SEP 510 NORTE, BLOCO A P ANDAR, Edifício Ex-1401 - Unidade 1 - Ministério de Saúde		Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-021	UF: DF	Município: BRASÍLIA	Telefone: (011)315.5479	E-mail: conep@saude.gov.br
Endereço: SEP 510 NORTE, BLOCO A P ANDAR, Edifício Ex-1401 - Unidade 1 - Ministério de Saúde								
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.750-021							
UF: DF	Município: BRASÍLIA							
Telefone: (011)315.5479	E-mail: conep@saude.gov.br							

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer nº 302/2017

Justificativa de Ausência	TCELEadutoDM.pdf	10/05/2016 13:25:18	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
TCELE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEofancasde12a15años.pdf	10/05/2016 13:25:30	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
TCELE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEofancasde9a11anos.pdf	10/05/2016 13:25:06	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
TCELE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEofancasde6a8anos.pdf	10/05/2016 13:24:13	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAndrewOugias_DM.pdf	10/05/2016 13:21:07	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Orçamento	ValorEstimadoprojeto09052016.pdf	10/05/2016 13:20:47	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Declaração de Pesquisadores	TermodeConfidencialidade.pdf	10/05/2016 13:20:34	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaraçãodenaoferenciadapesquisa.p df	10/05/2016 13:19:51	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	10/05/2016 13:04:51	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	10/05/2016 13:01:19	Daniela Regina Arantes Martins	Acerto

Situação do Parecer:
Aprovado

BRASÍLIA, 27 de Outubro de 2017

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPPI 010 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Es-PLAN - Unidade I - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-021
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-0676 E-mail: coneq@saude.gov.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÍCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E GENÉTICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Este é um convite para o (a) senhor (a) participar da pesquisa **CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA PROTEÍCA E VETORES VIRAIS EXPRESSANDO EPÍTOPOS AMAI, SAG1 e GRA7 DE TOXOPLASMA GONDII E ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM FORMAS CLÍNICAS VARIADAS DE TOXOPLASMOSE**, coordenada pelos professores Dra Daniella Regina Arantes Martins Salha, lotada no Departamento de Biologia Celular, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Sua participação é voluntária, o que significa que o (a) senhor (a) poderá desistir em qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. O presente projeto trabalha com a Toxoplasmose, uma doença transmitida por um micróbio chamado *Toxoplasma gondii*. Esse micróbio pode estar presente em carne crua ou mal cozida, ou também nas fezes de gatos contaminadas. Se você entrar em contato com esse bichinho, talvez você possa desenvolver a doença. O que determinará se você terá ou não a doença, será o seu organismo, a sua saúde. Por isso, essa pesquisa busca entender os mecanismos pelos quais algumas pessoas ficam doentes e outras não. Assim sendo, o objetivo desse trabalho é fazer uma fórmula com alguns pedaços do micróbio *Toxoplasma gondii*, colocar essa fórmula em uma placa plástica de 96 poços juntamente o seu sangue e observar como as células do seu corpo irão reconhecer partes desse micróbio. As suas células corpo produzirão substâncias (citocinas) que quando em contato com o micróbio, nos permitirão entender como o seu organismo reagirá em contato com esse bicho.

Caso o (a) senhor (a) decida aceitar o convite, eu, Prof Dra Daniella Regina Arantes Martins Salha ou algum outro membro do projeto, coletaremos do seu braço, cerca de vinte mL (20 mL) de sangue com uma agulha fina, e o risco que o senhor (a) poderá sofrer é o mesmo de um exame laboratorial de rotina e não lhe causará maiores desconfortos. No momento da coleta de sangue, o senhor sentirá uma picada no local da agulha, quando for retirado o sangue da sua veia, no braço. Caso haja algum desconforto como vermelhidão ou aparência arrossada no local da retirada de sangue, o local será comprimido com um algodão, seguido da aplicação de um adesivo absorvente no local da picada.

As amostras de sangue obtidas serão guardadas em freezers, à 20°C, de forma sigilosa e seu nome não será revelado em nenhum momento. Os dados provenientes dessa pesquisa serão confidenciais e somente divulgados em congressos ou publicações científicas, não havendo divulgação de nenhum dado que possa lhe identificar. Esses dados serão guardados pelo pesquisador responsável por essa pesquisa em local seguro, por um período de 5 anos.

Se você tiver algum gasto pela sua participação nesse projeto, ele será assumido pelo pesquisador e reembolsado para você. Ainda, caso você sofra algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você será indenizado.

Os benefícios esperados com a realização desse estudo podem não ser diretamente aplicados no (a) senhor (a), mas certamente poderão contribuir para ampliar os conhecimentos da ciência a respeito da doença aqui estudada, especialmente com relação ao mecanismo da doença e cura. A contribuição aumentará os conhecimentos sobre como as pessoas se comportam quando adquirem a toxoplasmose assim como a melhora no diagnóstico e elaboração de uma possível vacina contra a doença.

Se você tiver algum gasto relacionado com a sua participação na pesquisa, o (a) senhor (a) será ressarcido (a) pelo pesquisador responsável pelo projeto. Em qualquer momento, se o (a) senhor (a) sofrer algum dano decorrente desta pesquisa, o senhor terá direito a indenização. Este documento será impresso em duas vias. Uma ficará com você e a outra com o pesquisador responsável, Prof. Dra Daniella Regina Arantes Martins Salha. Qualquer dúvida a respeito desta pesquisa poderá ser esclarecida diretamente com a Prof. Dr. Daniella Regina Arantes Martins Salha, no Departamento Biologia Celular e Genética, no endereço Av. Sen. Salgado Filho, S/N, Lagoa Nova, Natal – RN, ou pelo telefone (84) 3215-3424. Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRN, localizado no Campus Universitário da UFRN, ou pelo telefone (84) 3215-3135.

Consentimento Livre e Esclarecido

Após ter sido esclarecido sobre os objetivos, importância e o modo como os dados serão coletados nessa pesquisa, além de conhecer os riscos, desconfortos e benefícios que ela trará para mim e ter ficado ciente de todos os meus direitos, concordo em participar da pesquisa **CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA PROTEÍCA E VETORES VIRAIS EXPRESSANDO EPÍTOPOS AMA1, SAG1 e GRA7 DE TOXOPLASMA GONDII E ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM FORMAS CLÍNICAS VARIADAS DE TOXOPLASMOSE** e autorizo a divulgação das informações por mim fornecidas em congressos e/ou publicações científicas desde que nenhum dado possa me identificar.

Natal, ____ de ____ de ____.

Assinatura do participante da pesquisa



Deposito
Autógrafo do
participante

Declaração do pesquisador responsável

Como pesquisador responsável pelo estudo **CONSTRUÇÃO DE UMA QUIMERA PROTEÍCA E VETORES VIRAIS EXPRESSANDO EPÍTOPOS AMA1, SAG1 e GRA7 DE TOXOPLASMA GONDII E ANÁLISE DO PERFIL DE CITOCINAS DE INDIVÍDUOS COM FORMAS CLÍNICAS VARIADAS DE TOXOPLASMOSE**, declaro que assumo a inteira responsabilidade de cumprir fielmente os procedimentos metodologicamente e direitos que foram esclarecidos e assegurados ao participante desse estudo, assim como manter sigilo e confidencialidade sobre a identidade do mesmo.

Declaro ainda estar ciente que na inobservância do compromisso ora assumido estarei infringindo as normas e diretrizes propostas pela Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que regulamenta as pesquisas envolvendo o ser humano.

Natal, ____ de ____ de ____.

Assinatura do pesquisador responsável

CEPI/UFRRN

3/3

9. REFERÊNCIAS

ABDULLAH, W. O. *Toxoplasma gondii* recombinant surface antigen (SAG 1; P 30) and its applications in serodiagnosis and vaccine development for toxoplasmosis. **Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1–18, 2010.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. *Toxoplasma gondii* exposure and Parkinson's disease: a case–control study. **BMJ Open**, v. 7, n. 2, p. e013019, 2017.

ASSOLINI, J. P. et al. Nanomedicine advances in toxoplasmosis : diagnostic , treatment , and vaccine applications. p. 1603–1615, 2017.

ATASSI, M. Z.; SMITH, J. A. A proposal for the nomenclature of antigenic sites in peptides and proteins. **Molecular Immunology**, v. 15, n. 8, p. 609–610, 1978.

BEGHETTO, E. et al. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133–2140, 2006.

BJELLQVIST, B. et al. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. **ELECTROPHORESIS**, v. 14, n. 1, p. 1023–1031, 1993.

BJELLQVIST, B. et al. Reference points for comparisons of two-dimensional maps of proteins from different human cell types defined in a pH scale where isoelectric points correlate with polypeptide compositions. **ELECTROPHORESIS**, v. 15, n. 1, p. 529–539, 1994.

BRITO, R. et al. Immunoinformatics Features Linked to Leishmania Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. **International Journal of Molecular Sciences** 2017, Vol. 18, Page 371, v. 18, n. 2, p. 371, 2017.

CAETANO, B. C. **DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE VACINAÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EMPREGANDO ADENOVÍRUS RECOMBINANTE Belo Horizonte – MG Maio / 2005.** [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

CAETANO, B. C. et al. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. **Human gene therapy**, v. 17, n. 4, p. 415–426, 2006.

CAI, Y. et al. Evaluation of an Indirect Elisa Using Recombinant Granule Antigen Gra7 for Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Cats. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 37–40, 2015.

CAMARA, B. **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).**

CARDONA, N. et al. *Toxoplasma gondii*: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 123, n. 2, p. 199–202, 2009.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of

Toxoplasma cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, 2007.

CDC. **No Title**.

CHEW, W. K. et al. Significant reduction of brain cysts caused by *Toxoplasma gondii* after treatment with spiramycin coadministered with metronidazole in a mouse model of chronic toxoplasmosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1762–1768, 2012.

CHUANG, S.-C. et al. Induction of long-lasting protective immunity against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 34, 2013.

COMEAU, S. R. et al. ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., 2004.

CONG, H. et al. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis : Protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A * 0201. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 754–762, 2011.

CONG, H. et al. *Toxoplasma gondii* HLA-B*0702-restricted GRA7 20-28 peptide with adjuvants and a universal helper T cell epitope elicits CD8 + T cells producing interferon- γ and reduces parasite burden in HLA-B*0702 mice. **Human Immunology**, v. 73, n. 1, p. 1–10, 2012.

CONG, H. et al. Compound DNA vaccine encoding SAG1/ SAG3 with A2/B subunit of cholera toxin as a genetic adjuvant protects BALB/c mice against *Toxoplasma gondii*. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 63, 2013.

COSTA, T. L. et al. *Toxoplasma gondii*: TOXOPLASMOSE, COM ÊNFASE NO DIAGNÓSTICO. **Revista De Patologia Tropical**, v. 37, n. 3, p. 191–207, 2008.

CRAWFORD, J. et al. Structural characterization of apical membrane antigen 1 (AMA1) from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15644–15652, 2010.

DAUTU, G. et al. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 273–282, 2007.

DE MELO FERREIRA, A. et al. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 1, p. 22–31, 2006.

DE MOURA, L. et al. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 326–329, 2006.

DEL CARMEN, M. G.; CALVO, L. C.; MONDRAGÓN, R. Induction of conoid extrusion is associated to MIC secretion in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. In: **European Microscopy Congress 2016: Proceedings**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2016. p. 242–243.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated

immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 569–88, 1998a.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. **Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection***Clinical Microbiology Reviews*, 1998b.

DENKERS, E. Y.; SHER, A.; GAZZINELLI, R. T. CD8+T-cell interactions with *Toxoplasma gondii*: implications for processing of antigen for class-I-restricted recognition. **Research in Immunology**, v. 144, n. 1, p. 51–57, 1993.

DEROUIN, F.; PELLOUX, H. **Prevention of toxoplasmosis in transplant patients***Clinical Microbiology and Infection*, 2008.

DIMIER, I. H.; BOUT, D. T. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. **Immunology and cell biology**, v. 75, p. 511–514, 1997.

DIMITROV, I.; FLOWER, D. R.; DOYTCHINOVA, I. AllerTOP - a server for in silico prediction of allergens. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. Suppl 6, p. S4, 2013.

DONAHOE, S. L. et al. Clinical and pathological features of toxoplasmosis in free-ranging common wombats (*Vombatus ursinus*) with multilocus genotyping of *Toxoplasma gondii* type II-like strains. **Parasitology international**, v. 64, n. 2, p. 148–53, 2015.

DOOMS, H.; ABBAS, A. K. **Control of CD4+ T-cell memory by cytokines and costimulators***Immunological Reviews*, 2006.

DRAPAŁA, D.; HOLEC-GĄSIOR, L.; KUR, J. New recombinant chimeric antigens, P35-MAG1, MIC1-ROP1, and MAG1-ROP1, for the serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, p. 34–39, 2015.

DUBEY, J. P. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Veterinary Parasitology**, v. 64, n. 1–2, p. 65–70, 1996.

DUBEY, J. P. **Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii***. *International Journal for Parasitology*. **Anais...**1998

DUBEY, J. P. **The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years***Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2008.

DUBEY, J. P. et al. **Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology***Parasitology*, 2012.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. **Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts***Clinical Microbiology Reviews*, 1998.

DUNN, D. et al. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: Risk estimates for clinical counselling. **Lancet**, v. 353, n. 9167, p. 1829–1833, 1999.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. **Immune response and immunopathology during toxoplasmosis***Seminars in Immunopathology*, 2012.

EKMAN, C. C. J. et al. Case-control study of an outbreak of acute toxoplasmosis in an industrial plant in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 5, p. 239–244, 2012.

EL BISSATI, K. et al. Adjuvanted multi-epitope vaccines protect HLA-A*11:01 transgenic mice against *Toxoplasma gondii*. **JCI insight**, v. 1, n. 15, p. e85955, 2016.

ERMOLAEVA, M. D. Synonymous codon usage in bacteria. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 3, n. 4, p. 91–97, 2001.

EZA, D. E.; LUCAS, S. B. Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. **HIV Medicine**, v. 7, n. 6, p. 415–420, 2006.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 133–148, 2009.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Ann Ist Super Sanita**, v. 40, n. 1, p. 71–80, 2004.

FISCHER, H. G. et al. GRA7, an excretory 29 kDa *Toxoplasma gondii* dense granule antigen released by infected host cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 91, n. 2, 1998.

FLOWER, D. R. Designing immunogenic peptides. **Nature Chemical Biology**, v. 9, n. 12, p. 749–753, 2013.

GADDI, P. J.; YAP, G. S. Cytokine regulation of immunopathology in toxoplasmosis. n. January, p. 155–159, 2007.

GARCÍA-MARTÍNEZ, K.; LEÓN, K. Modeling the role of IL2 in the interplay between CD4⁺ helper and regulatory T cells: Studying the impact of IL2 modulation therapies. **International Immunology**, v. 24, n. 7, p. 427–446, 2012.

GARCIA, J. L. **Vaccination concepts against toxoplasma gondii**Expert Review of Vaccines, 2009.

GARCIA BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 55–62, 2003.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: **The Proteomics Protocols Handbook**. [s.l.: s.n.]. p. 571–607.

GAZZINELLI, R. T. et al. SYNERGISTIC ROLE OF CD4 + AND CD8 + T LYMPHOCYTES IN IFN- γ PRODUCTION AND PROTECTIVE IMMUNITY INDUCED BY AN *Toxoplasma gondii* VACCINE. p. 286–292, 1991.

GAZZINELLI, R. T. et al. Role of Macrophage-Derived Cytokines in the Induction and Regulation of Cell-Mediated Immunity to *Toxoplasma gondii*. In: **Toxoplasma gondii**. [s.l.: s.n.]. p. 127–139.

GOLUBOVSKAYA, V.; WU, L. **Different subsets of T cells, memory, effector functions, and CAR-T immunotherapy**Cancers, 2016.

GÓMEZ MARÍN, J. E. et al. Does human toxoplasmosis involve an imbalance in T1/T2 cytokines? **Medical hypotheses**, v. 48, n. 2, p. 161–9, 1997.

GUITON, R. et al. Interleukin 17 Receptor Signaling Is Deleterious during *Toxoplasma gondii* Infection in Susceptible BL6 Mice. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 3, p. 427–435, 2010.

HAJISSA, K. et al. Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 315, 2015.

HAMMOND, J. B.; KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 3, p. 25–32, 1988.

HARNING, D. et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 3, n. 3, p. 355–357, 1996.

HASHEMINASAB, S. S.; MAGHSOOD, H.; KHALILI, S. Immunoinformatic prediction about potential novel vaccine in surface antigen fragment protein of *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Health**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2016.

HEUKELBACH, J. et al. Waterborne toxoplasmosis, northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 287–289, 2007.

HOLEC-GASIOR, L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 9, p. 1343–1351, 2013.

HOLEC-GASIOR, L.; FERRA, B.; DRAPAŁA, D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1977–1979, 2012.

HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766–778, 2012.

INNES, E. A. A Brief History and Overview of *Toxoplasma gondii*. v. 57, p. 1–7, 2010.

JACOBS, D.; VERCAMMEN, M.; SAMAN, E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 6, n. 1, p. 24–29, 1999.

JOHNSON, L. L.; SAYLES, P. C. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 1, p. 185–191, 2002.

KAHI, S. et al. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 5, n. 6, p. 745–8, 1998.

- KANDUC, D.; LUCCHESI, A.; MITTELMAN, A. Individuation of monoclonal anti-HPV16 E7 antibody linear peptide epitope by computational biology. **Peptides**, v. 22, n. 12, p. 1981–1985, 2001.
- KAPER, J. B.; BRIEN, A. D. O.; NATARO, J. P. Apical organelle secretion by *Toxoplasma* controls Innate and adaptive immunity and mediates Long-Term Protection. p. 1–33, 2014.
- KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the web: A case study using the phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–373, 2009.
- KELLY, K.; SHORTMAN, K.; SCOLLAY, R. The surface phenotype of activated T lymphocytes. **Immunology & Cell Biology**, v. 66, n. 4, p. 297–306, 1988.
- KHADEM VATAN, S. et al. *Toxoplasma gondii* Exposure and the Risk of Schizophrenia. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 7–11, 2014.
- KHALIL, S. S.; RASHWAN, E. A. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human toxoplasmosis. **J Egypt Soc Parasitol**, v. 26, n. 1, p. 53–61, 1996.
- KIRPACH, J.; MULLER, C. P. Epitopes. In: **eLS**. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- KOLASKAR, A. S.; TONGAONKAR, P. C. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1–2, p. 172–174, 1990.
- LAGAL, V. et al. AMA1-Deficient *Toxoplasma gondii* Parasites Transiently Colonize Mice and Trigger an Innate Immune Response That Leads to Long-Lasting Protective Immunity. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 6, p. 2475–2486, 2015.
- LANI, Á. H. **Toxoplasmose ocular: abordagem do diagnóstico e tratamento**. [s.l.: s.n.].
- LARSEN, J. E. P.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, n. 1, p. 2, 2006.
- LEKUTIS, C. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International journal for parasitology**, v. 31, p. 1285–1292, 2001.
- LETSCHER-BRU, V. et al. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 Protein Is Protective against Congenital Toxoplasmosis in BALB / c Mice but Not in CBA / J Mice. **Society**, v. 71, n. 11, p. 6615–6619, 2003.
- LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **J Protozool**, v. 24, n. 1, p. 36–41, 1977.
- LIESENFELD, O. et al. TNF- α , nitric oxide and IFN- γ are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with *Toxoplasma gondii*. n. May 1998, p. 365–376, 1999.
- LIU, Q. et al. A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12–13, p. 1355–1362, 2008.
- LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **???**, v. 1, p. 1–14, 2015.

- LUCCHESI, A. et al. Role of MHC II affinity and molecular mimicry in defining anti-HER-2/neu MAb-3 linear peptide epitope. **Peptides**, v. 24, n. 2, p. 193–197, 2003.
- MACRAILD, C. A. et al. Apical Membrane Antigen 1 as an Anti-Malarial Drug Target. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2039–2047, 2011.
- MAKSIMOV, P. et al. Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 865–874, 2012a.
- MAKSIMOV, P. et al. Peptide Microarray Analysis of In Silico-Predicted Epitopes for Serological Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 865–874, 2012b.
- MEIRA, A. R. Splendore : facets of life of the *Toxoplasma* discoverer. **Scientia**, v. 20, p. 9–12, 2010.
- MEIRA, C. S. et al. Use of the serum reactivity against *Toxoplasma gondii* excreted-secreted antigens in cerebral toxoplasmosis diagnosis in human immunodeficiency virus-infected patients. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 845–850, 2008.
- MEYLAN, P.; PARIS, L.; LIESENFELD, O. Multicenter evaluation of the Elecsys Toxo IgG and IgM tests for the diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii*. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 2, p. 150–158, 2015.
- MIN, J. et al. Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. **Vaccine**, v. 30, n. 38, p. 5631–5636, 2012.
- MIRZADEH, A. et al. Production of refolded *Toxoplasma gondii* recombinant SAG1-related sequence 3 (SRS3) and its use for serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Protein Expression and Purification**, v. 133, p. 66–74, 2017.
- MIYAMOTO, C. et al. Use of CD25 as an immunohistochemical marker for acquired ocular toxoplasmosis. **Arquivos brasileiros de oftalmologia**, v. 73, n. 5, p. 443–446, 2010.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965–1976, 2004.
- NAGINENI, C. N. et al. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 64, n. 10, p. 4188–4196, 1996.
- NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47, n. SUPPL., p. 29–38, 2009.
- NEUDECK, A. et al. Expression variance, biochemical and immunological properties of *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 6, p. 581–90, 2002.
- NGÔ, H. M. et al. *Toxoplasma* Modulates Signature Pathways of Human Epilepsy,

Neurodegeneration & Cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–32, 2017.

NOLAN, S. J.; ROMANO, J. D.; COPPENS, I. Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 6, 2017.

OYARZUN, P. et al. A bioinformatics tool for epitope-based vaccine design that accounts for human ethnic diversity: Application to emerging infectious diseases. **Vaccine**, v. 33, n. 10, p. 1267–1273, 2015.

OYARZÚN, P. et al. : CD4+ T-cell epitope prediction for vaccine design that covers 95% of HLA class II DR protein diversity. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, 2013.

PACHECO-SOARES, C.; DE SOUZA, W. Redistribution of parasite and host cell membrane components during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cell Struct Funct**, v. 23, n. 3, p. 159–168, 1998.

PAPOIN, J. et al. The RON2-AMA1 Interaction is a Critical Step in Moving Junction-Dependent Invasion by Apicomplexan Parasites. v. 7, n. 2, 2011.

POPE, B.; KENT, H. M. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 3, p. 536–537, 1996.

PRUSA, A. R. et al. Evaluation of the Roche Elecsys Toxo IgG and IgM electrochemiluminescence immunoassay for the detection of gestational *Toxoplasma* infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 4, p. 352–357, 2010.

REDDY CHICHILI, V. P.; KUMAR, V.; SIVARAMAN, J. Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. **Protein Science**, v. 22, n. 2, p. 153–167, 2013.

RIBEIRO, M. et al. Experimental Parasitology Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. v. 181, p. 111–118, 2017.

RICARD, J. et al. TNF-alpha enhances *Toxoplasma gondii* cyst formation in human fibroblasts through the sphingomyelinase pathway. **Cellular signalling**, v. 8, n. 6, p. 439–42, 1996.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012.

SABIN, A. B. Toxoplasmic encephalitis in children. **Journal of the American Medical Association**, v. 116, n. 9, p. 801–807, 1941.

SAEI, J. P. J.; BOYLE, J. P.; BOOTHROYD, J. C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host **Trends in Parasitology**, 2005.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. : Prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. **Artificial Immune Systems: Third international conference, ICARIS 2004, Catania Sicily, Italy, September 13-16, 2004 Proceedings**, p. 197–204, 2004.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. SHORT COMMUNICATION Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. v. 48, n. May 2005, p. 40–48, 2006.

SAKI, J. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Women Who Have Aborted in Comparison with the Women with Normal Delivery in Ahvaz, Southwest of Iran. **Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–5, 2015.

SANTOS, I. **Natal tem surto de Toxoplasmose**. Natal: [s.n.].

SANTOS, W. V. **PERSPECTIVAS DO USO DE PEPTÍDEOS QUIMÉRICOS NA PROSPECÇÃO DE VACINAS E COMO POTENCIAL MARCADOR SOROLÓGICO DE DIAGNÓSTICO PARA A TOXOPLASMOSE**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.

SAÚDE, M. DA. **Surto De Toxoplasmose Adquirida, Anápolis-Go, Fevereiro De 2006** Secretaria de Vigilância em Saúde. [s.l: s.n.].

SCHARTON-KERSTEN, T. et al. Role of IL 12 in induction of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. **Research in Immunology**, v. 146, n. 7–8, p. 539–545, 1995.

SCHEIBLHOFER, S. et al. Removal of the circumsporozoite protein (CSP) glycosylphosphatidylinositol signal sequence from a CSP DNA vaccine enhances induction of CSP-specific Th2 type immune responses and improves protection against malaria infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 3, p. 692–698, 2001.

SELSELEH, M. et al. Production and evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant surface antigen 1 (SAG1) for serodiagnosis of acute and chronic *Toxoplasma* infection in human sera. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 7, n. 3, p. 1–9, 2012.

SHIRAHATA, T. et al. Enhancement by recombinant human interleukin 2 of host resistance to *Toxoplasma gondii* infection in pregnant mice. **Microbiol Immunol**, v. 37, n. 7, p. 583–590, 1993.

SILVA, J. C. R. et al. Cat-rodent *Toxoplasma gondii* Type II-variant circulation and limited genetic diversity on the Island of Fernando de Noronha, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

SILVA, J. L. A. et al. IL-17-expressing CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes in human toxoplasmosis. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 573825, 2014.

SINAI, A. P. Biogenesis of and activities at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane. **Sub-cellular biochemistry**, v. 47, p. 155–64, 2008.

SINGH, G.; SEHGAL, R. Transfusion-transmitted parasitic infections. **Asian journal of transfusion science**, v. 4, n. 2, p. 73–7, 2010.

SOBANSKI, V. et al. **Severe toxoplasmosis in immunocompetent hosts: Be aware of atypical strains** **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 2013.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. **An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development** **Journal of Biomedical Informatics**, 2015.

ŠTAJNER, T. et al. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2686–2690, 2013.

SUN, X. et al. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA1, GRA7 and soluble antigens for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. **Research in Veterinary Science**, p. 2013–2016, 2015.

TAN, T. G. et al. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. **Vaccine**, v. 28, n. 23, p. 3977–3989, 2010.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: From animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000.

TORRES-MORALES, E. et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. **Medical Microbiology and Immunology**, n. MAY, 2014.

TYLER, J. S.; TREECK, M.; BOOTHROYD, J. C. Focus on the ringleader : the role of AMA1 in apicomplexan invasion and replication. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 410–420, 2011.

VAUDAUX, J. D. et al. Identification of an Atypical Strain of *Toxoplasma gondii* as the Cause of a Waterborne Outbreak of Toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivai, Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 8, p. 1226–1233, 2010.

VELDERS, M. P. et al. Defined flanking spacers and enhanced proteolysis is essential for eradication of established tumors by an epitope string DNA vaccine. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, n. 9, p. 5366–5373, 2001.

VERCAMMEN, M. et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38–45, 2000.

VERMA, R.; KHANNA, P. **Development of toxoplasma gondii vaccine A global challenge** **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, 2013.

VITA R GREENBAUM JA HOOF I DAMLE R PETERS B, ZAREBSKI L, EMAMI H, SALIMI N, S. A.; VITA R GREENBAUM JA HOOF I DAMLE R PETERS B., ZAREBSKI L, EMAMI H, SALIMI N, S. A. .

WANG, P. Y. et al. Protective efficacy of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 13 plasmid DNA vaccine in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 12, p. 1916–1920, 2012.

WANG, Y. et al. Screening and identification of novel B cell epitopes of *Toxoplasma gondii* SAG1. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 125, 2013.

WANG, Y. et al. Review on the identification and role of *Toxoplasma gondii* antigenic epitopes. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 459–468, 2016.

WANG, Y.; YIN, H. Research progress on surface antigen 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 180, 2014.

WANG, Z.-D. et al. Toxoplasma gondii Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

WATFORD, W. T. et al. **The biology of IL-12: Coordinating innate and adaptive immune responses** *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2003.

WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. **Toxoplasmosis: A history of clinical observations** *International Journal for Parasitology*, 2009.

XIAO, J.; YOLKEN, R. H. Strain hypothesis of Toxoplasma gondii infection on the outcome of human diseases. **Acta Physiologica**, v. 213, n. 4, p. 828–845, abr. 2015.

ZHANG, H. et al. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between Neospora caninum and Toxoplasma gondii, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 2, p. 205–212, 2007.

ZHANG, T.-E. et al. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 15, 2015.

ZHENG, B. et al. [Sequence analysis and expression of GRA7 gene of Toxoplasma gondii isolates in Escherichia coli]. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 23, n. 2, p. 100–105, 2005.

ZHOU, H. et al. Toxoplasma gondii: Expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in Pichia pastoris. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 829–835, 2007.