

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Estudo de novos peptídeos preditos *in silico* visando a indução de resposta
imune protetora contra a infecção experimental de camundongos
C57BL/6 por *Toxoplasma gondii***

Heber Leão Silva Barros

UBERLÂNDIA, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

**Estudo de novos peptídeos preditos *in silico* visando a indução de resposta
imune protetora contra a infecção experimental de camundongos
C57BL/6 por *Toxoplasma gondii***

Dissertação apresentada ao Colegiado
do Programa de Pós-graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas
como requisito parcial a obtenção do
título de mestre.

Heber Leão Silva Barros

Professor Doutor José Roberto Mineo

Uberlândia, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B277e
2015 Barros, Heber Leão Silva, 1991-
Estudo de novos peptídeos preditos in silico visando a indução de resposta imune protetora contra a infecção experimental de camundongos C57BL/6 por *Toxoplasma gondii* / Heber Leão Silva Barros. - 2015.
72 f. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Peptídeos - Teses. 4. Imunização - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Heber Leão Silva Barros


“Estudo de novos peptídeos preditos in silico visando a indução de resposta imune protetora contra a infecção experimental de camundongos C57/BL6 por *Toxoplasma gondii*”


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

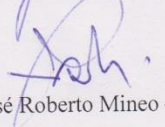
Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 25 de setembro de 2015.


Prof. Dr. Helder Franco de Andrade Junior – IMT/SP-USP


Profa. Dra. Angelica de Oliveira Gomes – UFTM


Prof. Dr. José Roberto Mineo – ICBIM/UFU (orientador)

www.imunoparasito.ufu.br - E-mail: coipa@ufu.br - Telefax: (034) 3225-8672
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

AGRADECIMENTO

A DEUS, por todas as dádivas e oportunidades alcançadas.

Aos meus pais, Harley e Helenilda, e irmão, Hugo, cujo apoio, paciência, compreensão, amizade, amor e humor foram fundamentais durante toda a trajetória, fazendo-a mais fácil e prazerosa.

À minha namorada, Lorraine, pela ajuda durante o planejamento dos experimentos e escrita do texto, pelo apoio e sorriso nos momentos difíceis, pelo entusiasmo e interesse que sempre me cativaram.

Ao meu orientador, prof. Dr. José Roberto Mineo, pela oportunidade concedida, confiança depositada, ensinamentos transmitidos, pelo acompanhamento e orientação durante todo o trabalho.

Aos companheiros de bancada, Luís Carlos Gebrim de Paula Costa, Silas Silva Santana, Fernando dos Reis de Carvalho, Vinícius Fernandes de Paiva, Patrício da Silva Cardoso Barros e Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba pela amizade e ajuda essencial no planejamento, execução e interpretação dos experimentos.

Aos técnicos do laboratório, Marley, Zilda e Cristina, pelo auxílio fornecido durante os experimentos e pelo excelente convívio.

Aos colegas de laboratório, Eliézer, Cristina, Lourenço, Márley, Zilda, Tamires, Leandro, Vanessa Resende, Vanessa Miranda, Lydiane, Mylla, Maraísa e Flávia, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de convívio.

À família Polloni, Luiz Sérgio, Aparecida, Luiz Paulo e Lorena, pela amizade e paciência.

“Não se amoldem ao padrão deste mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, para que sejam capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus”

Romanos 12:2

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença parasitária causada por *Toxoplasma gondii*, um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma grande variedade de hospedeiros. A infecção normalmente não apresenta sintomas em indivíduos saudáveis, mas é especialmente severa em pacientes imunocomprometidos ou durante a gestação, situações nas quais o hospedeiro é mais permissivo à multiplicação do parasito. Diversas espécies de animais também podem ser infectadas por esse parasito, causando abortos e perdas econômicas em rebanhos. Os tratamentos existentes consistem de drogas com alta toxicidade para o paciente, não sendo apropriado para gestantes e fetos. Considerando essa dificuldade de tratamento, uma vacina capaz de prevenir a doença ou reduzir as sequelas causadas por ela seria extremamente benéfico, tanto do ponto de visto médico como do veterinário. Até hoje, no entanto, não existem nenhuma vacina, disponível comercialmente, capaz de evitar a infecção pelo *T. gondii*, exceto por uma vacina capaz de reduzir abortos causados por esse parasito em rebanhos de ovinos. Considerando estes pontos, no presente estudo nós propusemos avaliar a resposta imunológica induzida por peptídeos sintéticos derivados de proteínas imunodominantes (SRS, ROP, MIC e GRA) deste parasito. Primeiramente, 22 peptídeos foram selecionados, considerando os valores de predição para epítomos de células B obtidos por análise *in silico*. Todos foram triados utilizando o soro de animais infectados, sendo que 11 peptídeos foram selecionados de acordo com vários critérios, entre eles a localização da organela da qual se originaram e a sororreatividade alcançada na triagem. Os peptídeos selecionados foram divididos em grupos e usados para imunizar camundongos C57Bl/6. Os animais imunizados foram infectados 45 dias após a primeira imunização com uma dose subletal de 10 cistos da cepa ME49. Sangue e cérebro desses animais foram coletados, sendo posteriormente utilizados para mensurar a produção de citocinas, títulos de anticorpos a quantificar a carga parasitária. A análise de citocinas mostrou que todos grupos experimentais tiveram níveis de IL-10, IL-4, IL-6, IL-2, IFN- γ e IL-17 menores que o grupo não imunizado. Além disso, os níveis de citocinas dos grupos SRS e MIC foram similares aos do grupo imunizado com antígeno solúbel de *T. gondii* (STAg). Os grupos imunizados com sequências relacionadas aos antígenos de superfície (SRS) e micronemas (MIC) tiveram significativamente menos DNA parasitário que o grupo não imunizado (PBS), similar aos resultados obtidos do grupo imunizado com STAg. Outros grupos de animais foram imunizados como descritos nesse trabalho e submetidos a desafio com 40 cistos. O grupo SRS teve o maior tempo de sobrevivência, mas os resultados não foram estatisticamente diferentes do grupo PBS. No presente trabalho, verificamos que peptídeos derivados das proteínas SRS e MIC demonstraram resultados promissores como antígenos vacinais no modelo murinho C57Bl/6, sendo que estudos adicionais são necessários para confirmar seus potenciais.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, imunoprofilaxia, peptídeos, predição *in silico*.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a parasitic disease caused by *Toxoplasma gondii*, an intracellular protozoan capable of infecting a wide range of hosts. The infection usually causes no disease in healthy individuals, but it is especially severe for immunocompromised patients or during pregnancy, situations when the parasite could have an environment more favorable for its multiplication. Several species of animals also are infected by this parasite, causing abortion and livestock economic losses as well. The existing treatment consists of drugs with high toxicity to patient, being not appropriate particularly for the fetuses. Therefore, a vaccine capable of prevent the disease or reducing the consequences would be extremely beneficial, both from medical and veterinary point of view. So far, there is no vaccine available to prevent the disease and only one vaccine capable of reducing abortion induced by this parasite is used currently only in sheeps. Considering these points, we proposed to evaluate in the present study the immune response induced by synthetic peptides derived from immunodominant proteins (SRS, ROP, MIC and GRA) of this parasite. First, 22 peptides were selected considering the highest scores for B cell epitope prediction by analysis *in silico*. All of them were screened, it was selected 11 of them, according with their higher reactivity against serum samples from infected animals, based on their organelle location and used to immunize C57Bl/6 mice. Afterwards, animals immunized were infected with a sublethal dose of 10 cysts of ME49 strain 45 days after the first step of immunization, blood and brains from immunized animals were collected, being posteriorly used to measure cytokines production, antibody titers and to quantify the parasite. Cytokines analysis showed that all experimental groups had IL-10, IL-4, IL-6, IL-2, IFN- γ and IL-17 levels lower than non-immunized group. Also, the cytokines levels from SRS and MIC immunized groups were similar to soluble *Toxoplasma* antigen (STAg) group. The immunized group with peptides from surface antigen proteins related sequences (SRS) and micronemes (MIC) had significant lower parasite DNA than non-immunized group (PBS), similarly to the results obtained from STAg immunized group. Another groups of immunized animals were immunized with the same peptide groups and submitted to challenge with 40 cysts. The group SRS had the longest survival time, but the results were not statistically different from PBS group. In summary, peptides from SRS and MIC proteins showed promising results as vaccine antigens in a murine model and further studies are needed to confirm their potential.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, immunoprophylaxis, peptides, *in silico* prediction.

LISTA DE ABREVIACÕES

SRS: Sequências relacionadas a antígenos de superfície

MIC: Micronemas

GRA: Grânulos densos

ROP: Roptrias

MIX: Mix de peptídeos, preparado com peptídeos representantes das 4 famílias

STAg: Antígeno solúvel de *T. gondii*

ELISA: Ensaio imunoenzimático

qPCR: Reação em cadeia pela polimerase quantitativa

Ig(G ou M): Imunoglobulina (G ou M)

PBS: Tampão salino-fosfatado

PBST: Tampão salino-fosfatado acrescido de detergente tween

CBEA: Centro de bioterismo e experimentação animal

CEUA: Comitê de ética na utilização de animais

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

PAMP: Padrão molecular associado ao patógeno (*pathogen associated molecule pattern*)

DAMP: Padrão molecular associado ao dano (*damage associated molecule pattern*)

TLR: Receptores semelhantes a toll (*Toll-like receptors*)

IL: Interleucina

IFN: Interferon

TNF: Fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1: Estágio infecciosos do <i>T. gondii</i>.....	13
Figura 2: Ciclo biológico do <i>T. gondii</i>.....	15
Figura 3: Formas de transmissão do <i>T. gondii</i>.....	18
Figura 4: Delineamento dos experimentos de imunização e infecção.....	38
Figura 5: Sororreatividade observada no dia 49 pós infecção.....	43
Figura 6: Produção de anticorpos específicos aos peptídeos, por animais imunizados e infectados.....	45
Figura 7: Produção de anticorpos específicos ao STAg por animais imunizados e infectados.....	46
Figura 8: Expressão de citocinas por animais imunizados, 30 dias após a infecção....	48
Figura 9: Quantidade de DNA parasitário encontrado no cérebro dos animais imunizados, 30 dias após a infecção.....	49
Figura 10: Desafio letal com 40 cistos por animal.....	50
Tabela 1: Parâmetros da síntese dos peptídeos.....	34
Quadro 1: Grupos de imunização.....	37

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	12
1.2 Ciclo biológico.....	14
1.3 Formas de transmissão	16
1.4 Prevalência.....	18
1.5 Relação parasito-hospedeiro	20
1.5.1 Invasão da célula do hospedeiro.....	20
1.5.2 Resposta imunológica	22
1.5.3 Regulação da resposta imunológica	26
1.6 Diagnóstico.....	27
1.7 Tratamento	28
1.8 Prevenção	28
2 JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Predição, <i>design</i> e síntese dos peptídeos	33
4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)	34
4.3 Animais e parasitos	35
4.4 Triagem sorológica dos peptídeos.....	36
4.5 Produção de STAg.....	36
4.6 Imunização, infecção e desafio	37
4.7 Análise de produção de citocinas	38
4.8 Carga parasitária	39
4.9 Ética e biossegurança	41
4.10 Análises estatísticas	41
5 RESULTADOS.....	42
5.1 Características dos peptídeos sintetizados	42

5.2 Sororreatividade de animais infectados com <i>T. gondii</i>	42
5.3 Delineamento dos grupos de imunização	43
5.4 Imunização dos animais	44
5.4.1 Resposta imunológica específica aos peptídeos	44
5.4.2 Resposta imunológica específica ao STAg	45
5.5 Produção de citocinas na fase aguda da infecção	47
5.6 Redução de quantidade de DNA do parasito	48
5.7 Desafio letal e curva de sobrevivência	49
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS	67
ANEXO 1	67
ANEXO 2	72

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório capaz de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, sendo importante tanto na medicina quanto na veterinária (OKADA et al., 2013). Foi descrito pela primeira vez por Nicolle e Manceaux em 1908, após a análise de tecidos obtidos de um pequeno roedor do norte da África, conhecido como gundi (*Ctenodactylus gundi*). Logo, o novo parasito foi batizado de *Toxoplasma* (*toxon*, forma de arco; *plasma*, vida) *gondii* (*gundi*) (DUBEY, 2008).

Toxoplasma gondii pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae, gênero *Toxoplasma* e espécie *Toxoplasma gondii*. No filo Apicomplexa encontram-se ainda outros patógenos de importância médica e veterinária, como o *Plasmodium* spp., parasito responsável por causar a malária (KUMAR et al., 2015); *Cryptosporidium* spp., responsável por causar diarreias graves em indivíduos imunocomprometidos (JACOB; LORBER, 2015); e o *Neospora caninum*, parasito causador de patologia em cães e bovinos (CIMINO et al., 2015; MOTA et al., 2014).

1.1 *Toxoplasma gondii*

O parasito possui ciclo biológico composto por 3 estágios: o taquizoíto, forma circulante e capaz de intensa multiplicação; o bradizoíto, encontrado no interior dos cistos teciduais; e o esporozoíto, encontrado no interior dos oocistos. Cada estágio é característico de uma fase da toxoplasmose (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

O taquizoíto possui forma alongada e recurvado, assumindo forma de “meia-lua” ou banana. As extremidades do parasito são diferentes: a extremidade anterior é afilada e a extremidade posterior arredondada (figura 1A). As dimensões do taquizoíto são de aproximadamente 5 µm de comprimento e 2 µm de largura. É capaz de se multiplicar rapidamente (taquizoíto vem de *tachos*, palavra grega para rápido), por endodiogenia, sendo a forma parasitária encontrada durante a fase aguda da infecção. Esse estágio do parasito possui diversas organelas, tais como anéis apicais, roptrias, micronemas, mitocôndrias, retículo endoplasmático, grânulos densos, entre outros. O complexo apical chama a atenção, pois é peculiar ao filo Apicomplexa e responsável por iniciar o processo de invasão (BICHET

et al., 2014; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). Ele funciona como um canal, atuando no direcionamento de proteínas e outras secreções durante o processo de invasão celular (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

O bradizoíto é a forma parasitária encontrada dentro dos cistos em vários tipos celulares do hospedeiro. Esse estágio do parasito é característico de infecções crônicas, pois é capaz de produzir uma camada externa protetora que envolve centenas ou até milhares de parasitos em um único cisto (figura 1B). O número de bradizoítos dentro de um cisto varia com o tamanho dele, sendo que os cistos mais jovens normalmente são menores (10 μm) e eles podem aumentar de diâmetro até ficarem 10 vezes maiores (ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012). A estrutura do bradizoíto é muito semelhante à do taquizoíto, exceto por ele ter maior comprimento e ser ligeiramente mais fino (7 μm e 1,5 μm , respectivamente.) e possuir menor número de roptrias, micronemas e outras organelas citoplasmáticas (DUBEY et al., 1998).

O esporozoíto pode ser encontrado dentro do esporocisto que, por sua vez, fica dentro do oocisto. Cada oocisto maduro possui 2 esporocistos, que por sua vez possuem 4 esporozoítos cada, totalizando 8 esporozoítos por oocisto (figura 1C). É derivada da reprodução sexuada do parasito no único hospedeiro definitivo conhecido: membros da família felidae. Essa forma, dentro do oocisto, é a única que pode ser encontrada no ambiente (DUBEY et al., 1998).

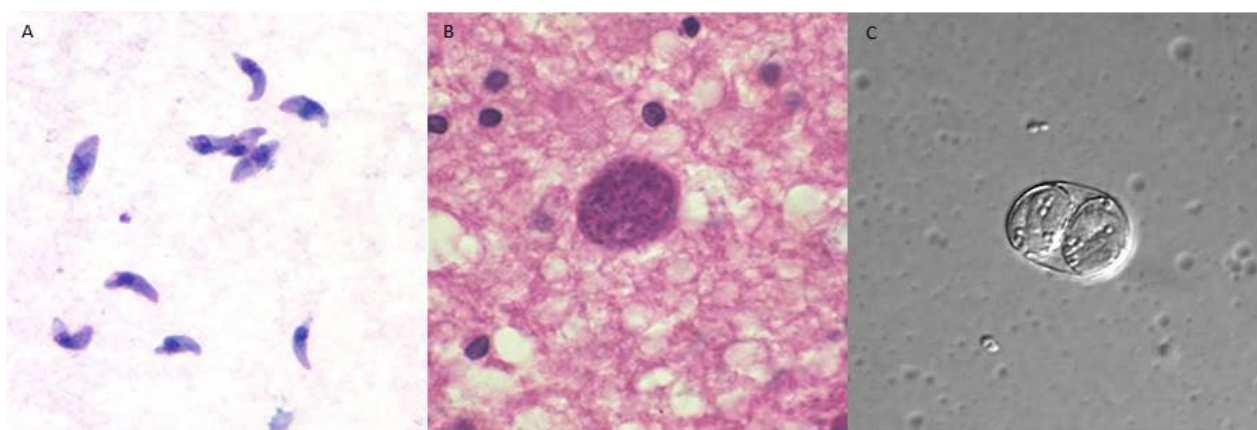


Figura 1: Estágios infecciosos do *T. gondii*. (A): Taquizoítos de *T. gondii* corados com Giemsa. (B): Cisto de *T. gondii* no tecido cerebral em corte corado com hematoxilina e eosina. (C): Oocisto esporulado não corado. Fonte: Todas imagens foram obtidas do centro de controle e prevenção de doenças (center for disease control and prevention - www.cdc.gov).

1.2 Ciclo biológico

Toxoplasma gondii é um parasito de ciclo heteroxeno, o que significa que ele possui fases distintas em seu desenvolvimento: ele alterna entre as fases sexuada e assexuada de acordo com o hospedeiro no qual se aloja. Os únicos hospedeiros definitivos conhecidos desse parasito são os membros da família felidae, tais como o gato doméstico e outros felinos. É somente nas células epiteliais do intestino desses animais que ocorre a reprodução sexuada. O ciclo pode envolver diversos hospedeiros intermediários, uma vez que o *T. gondii* é capaz de infectar inúmeros animais diferentes (GAZZINELLI et al., 2014).

O hospedeiro intermediário se infecta ao consumir alimentos ou água contaminados com o oocisto esporulado presente no ambiente ou carne malcozida que possua cistos. Ao ser consumido pelo hospedeiro intermediário, as paredes do oocisto são destruídas pelo conteúdo estomacal, liberando os esporocistos que posteriormente liberam os esporozoítos na altura do intestino. Os esporozoítos penetram nas células intestinais dos hospedeiros, onde se diferenciam em taquizoítos e em seguida iniciam sua replicação. Esta ocorre de forma assexuada e por endodiogenia, resultando numa quantidade de parasitos significativamente maior que a inicial. Uma vez que esse primeiro ciclo de replicação termine, os taquizoítos destroem as células parasitadas e infectam quaisquer outras células nucleadas, resultando em novo ciclo de multiplicação e lise, resultando em aumento da carga parasitária, característica da fase aguda. Uma vez que a infecção aguda tenha sido controlada pelo hospedeiro, os taquizoítos restantes se transformam na forma de bradizoíto e formam os cistos intracelulares, essenciais para a continuação do ciclo (figura 2). Esses cistos ficam preferencialmente nos tecidos musculares e no tecido nervoso. A partir desse ponto, hospedeiro e parasitos convivem sem causar grandes danos um ao outro até o fim da vida do hospedeiro, exceto em episódios de imunossupressão (DUBEY et al., 1998; TENTER, 2009).

Uma vez que o animal parasitado, como roedores, pássaros e outros pequenos animais, é predado pelo felídeo (ou ele consome os cistos de alguma outra forma), o ciclo sexuada tem início. O cisto, assim como o oocisto, tem a parede destruída pelo conteúdo estomacal do felino, liberando os bradizoítos, que invadem as células do epitélio intestinal do gato. Dentro destas células, os bradizoítos se multiplicam de forma assexuada. Em seguida, os bradizoítos dentro das células se transformam em merozoítos através de um

processo chamado esquizogonia. Os merozoítos rompem então as células do hospedeiro e invadem outras, onde eles se transformam novamente, formando os gametas femininos e masculinos através de um processo chamado de gamogonia. Gametas feminino e masculino se unem, formando o oocisto. Esse oocisto é gerado dentro da célula e inicialmente não é esporulado. Após sair da célula e ser expelido juntamente com as fezes do gato, esse oocisto se torna esporulado (figura 2), pronto para recomençar o ciclo (DUBEY et al., 1998; GAZZINELLI et al., 2014; TENTER, 2009).

A transmissão pode ocorrer ainda sem a necessidade de oocistos: o hospedeiro intermediário pode consumir a carne de algum outro animal parasitado, resultando na liberação de bradizoítos no intestino, invasão das células epiteliais intestinais, conversão de bradizoítos em taquizoítos e início da infecção aguda, como já descrita (GAZZINELLI et al., 2014).

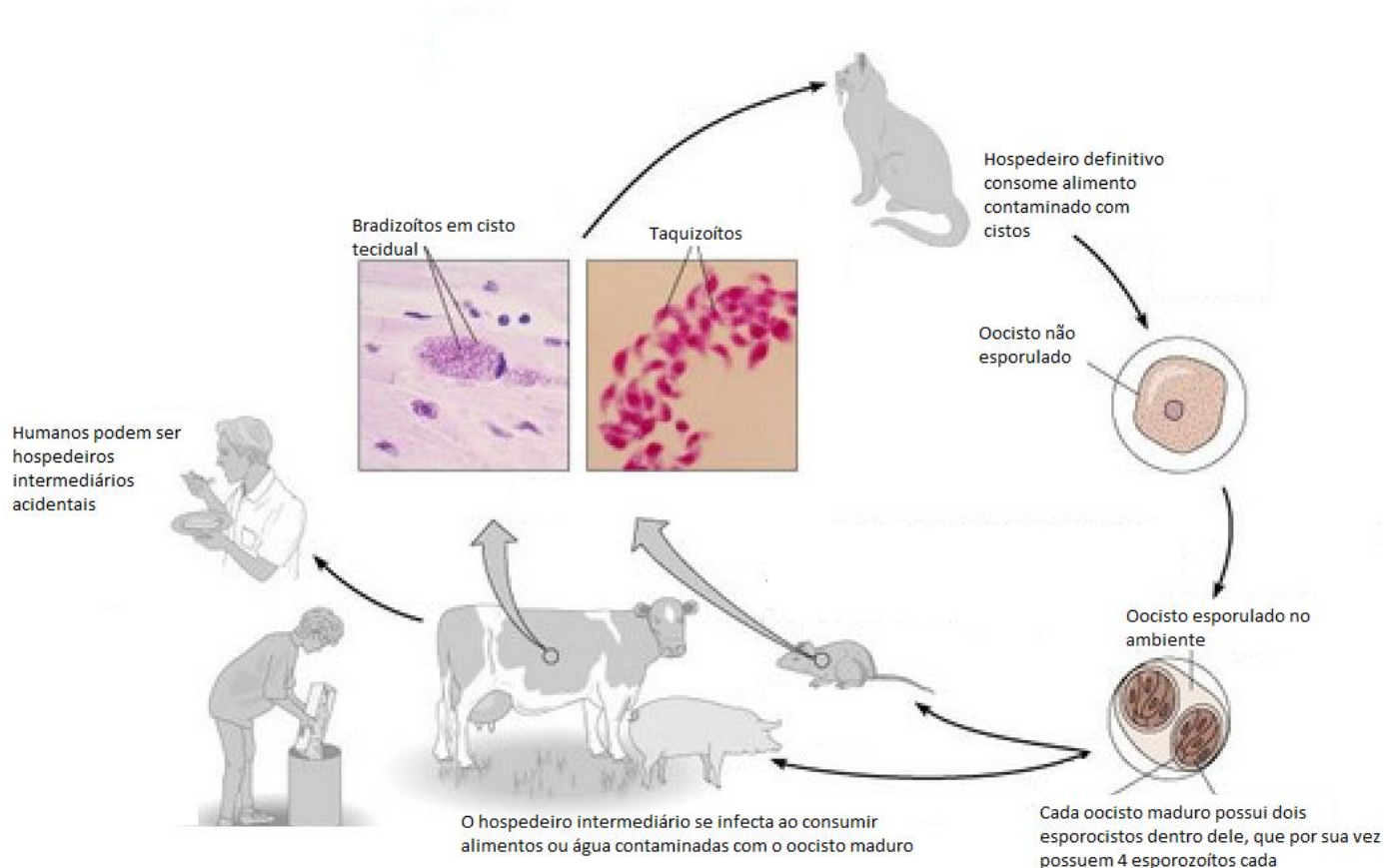


Figura 2: Ciclo biológico do *T. gondii*. Este parasito possui ciclo heteroxeno, possuindo diferentes estágios infecciosos, sendo capaz de infectar grande diversidade de hospedeiros intermediários. Fonte: imagem adaptada de Center for Food Security & Public Health, Iowa State University (<http://www.cfsph.iastate.edu>).

1.3 Formas de transmissão

Toxoplasma gondii possui diversos estágios, sendo que a maiores deles são infecciosos (taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos). A alimentação normalmente é a maior fonte de infecção, mas existem outras formas de transmissão que surgiram com o avanço da medicina e atualmente ganham importância (figura 3).

A via oral é a mais comum e ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados com o oocisto ou carne malcozida contaminada com o cisto do parasito. Vários fatores podem influenciar essa via de transmissão, sendo que boa parte deles é cultural: falta de higiene, preferência por carne malcozida, possuir gatos como animais de estimação e não restringir o acesso desses animais somente ao ambiente caseiro (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014; ESCH; PETERSEN, 2013). Um estudo europeu estimou que 30-63% dos casos de toxoplasmose registrados no continente tiveram início com a infecção através do consumo de carne inapropriadamente preparada, enquanto somente 6-17% dos casos foram causados por contaminação ambiental (COOK et al., 2000). A contaminação por essa via pode ser ainda maior em países em desenvolvimento, tais como o Brasil, devido ao menor acesso a saneamento e água tratada (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014).

Outra via de transmissão é a congênita, ou vertical. Essa transmissão ocorre quando taquizoítos passam da mãe para o feto através da placenta. A infecção em gestantes é uma situação de risco, pois a toxoplasmose pode causar danos severos no tecido nervoso e até morte do feto, tanto em humanos quanto em outros animais, sendo especialmente perigosa a infecção primária (CAMARA; SILVA; CASTRO, 2015; INNES et al., 2009). Essa transmissão normalmente ocorre quando os taquizoítos, durante a replicação e disseminação intensa da fase aguda, colonizam a placenta e os tecidos fetais (ROBERT-GANGNEUX, 2014).

A transmissão via órgãos transplantados representa uma grave ameaça à saúde dos receptores dos órgãos caso ele seja soronegativo para toxoplasmose, resultando em toxoplasmose primária e que será ainda mais danosa devido ao ambiente imunossuprimido. O risco de transmissão aumenta significativamente quando o órgão transplantado é o coração, pois apesar do *T. gondii* parasitar quaisquer células nucleadas, ele possui preferência por células do sistema nervoso e musculares (FERNANDEZ-SABE et al., 2012). Existem poucos

casos registrados de transmissão do *T. gondii* via transfusão sanguínea (SIEGEL et al., 1971), talvez pela implementação de políticas públicas de doação de sangue e pelo fato desse tipo de transmissão ocorrer somente se o doador tiver o sangue colhido durante a fase aguda da infecção, logo após a infecção. Esse período não é constante, variando de acordo com a cepa e *status* imunológico do hospedeiro (SROKA et al., 2010).

A transmissão pode ocorrer ainda de modo acidental, através do manuseio de instrumentos perfuro cortantes contaminados com taquizoítos por profissionais da saúde ou pesquisadores. Existem poucos casos descritos de infecção dessa forma, sendo 14 deles com infecção com a cepa RH através de agulha contaminada durante realização de experimentos. Nenhum dos casos resultou em parasitemia grave, visto que a quantidade “aplicada” foi mínima, mas houve a soroconversão, indicando que realmente houve a infecção (HERWALDT, 2001).

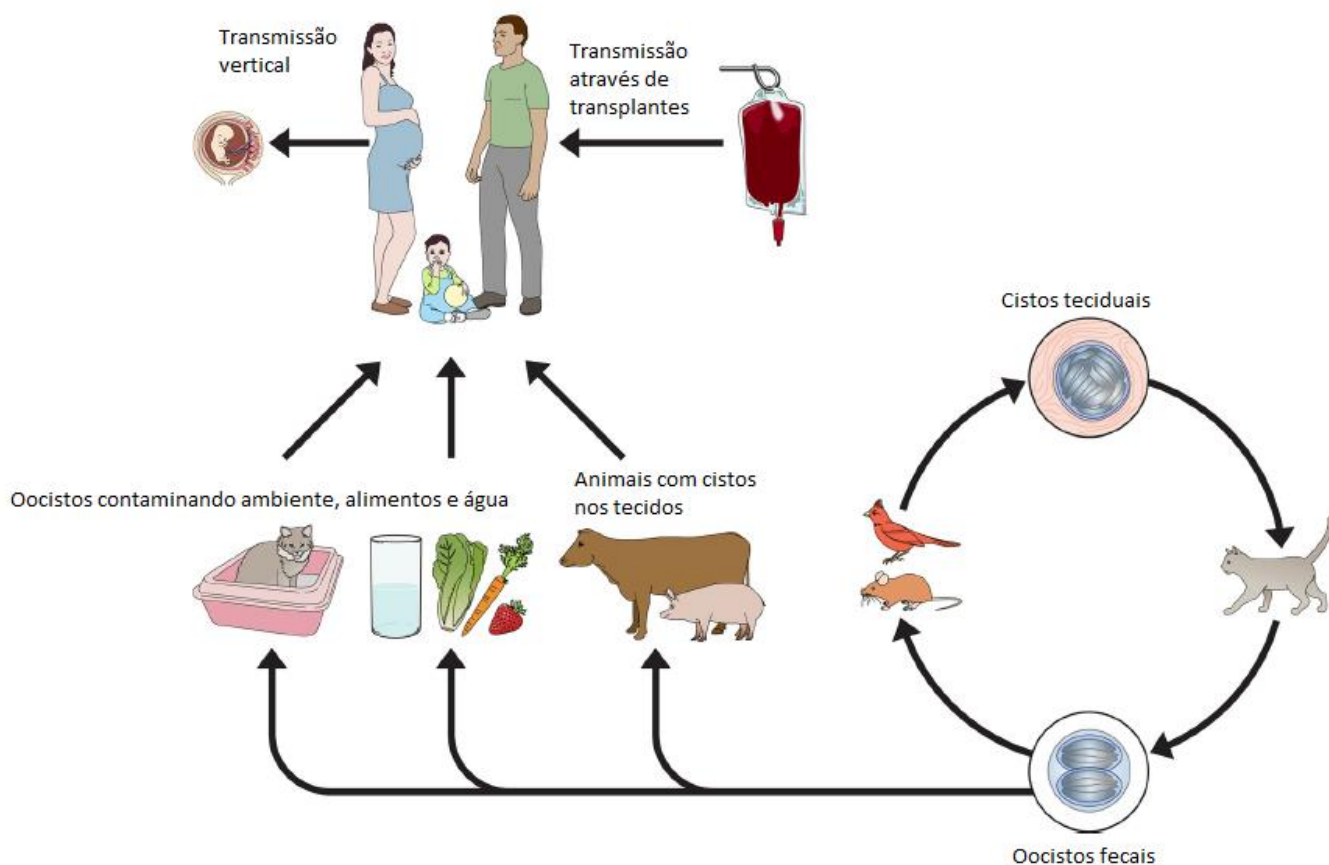


Figura 3: Formas de transmissão do *T. gondii*. *Toxoplasma gondii* pode ser transmitido pela via oral, através da alimentação ou falta de higiene, pela via congênita, na qual a gestante é primariamente infectada durante a gestação e pode transmitir o parasito para o filho (além da chance do feto não se desenvolver normalmente). Outra via, menos frequente, é a transmissão através de transplante de órgãos. Fonte: adaptado a partir de Esch e Petersen (2013).

1.4 Prevalência

Toxoplasma gondii é um parasito amplamente distribuído por diversas espécies de animais, inclusive os humanos (SROKA et al., 2010). Acredita-se que um terço da população humana possui a forma crônica ou aguda da toxoplasmose, sendo que a prevalência pode variar de 10-80% de acordo com a região, condições socioeconômicas e aspectos culturais analisadas (CARELLOS et al., 2014; TENTER, 2009). A prevalência da toxoplasmose é associada a vários fatores socioeconômicos, culturais e climáticos. Regiões próximas à linha do Equador possuem clima mais favorável (quente e úmido) à persistência do oocisto no ambiente, o qual pode se manter infeccioso por mais de um ano, aumentando a chance com

que animais ou humanos possam ser infectados. Proximidade com animais de estimação, especialmente gatos e cães, pode aumentar a chance de transmissão desse parasito (DANTAS-TORRES; OTRANTO, 2014; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A alimentação, entretanto, é a maior responsável pela disseminação do *T. gondii* devido ao consumo de água e alimentos contaminados com oocistos e consumo de carne malcozida contaminada com cistos (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013).

Um estudo realizado no Brasil usou soros obtidos de gestantes com baixo poder financeiro da cidade de Fortaleza, Ceará, para analisar a prevalência do parasito. O resultado obtido mostrou que, de um total de 963 mulheres analisadas, 660 foram soropositivas para toxoplasmose, tendo então uma taxa de aproximadamente 69% de gestantes infectadas com esse parasito. Vários fatores foram analisados nesse trabalho, tais como condições de infraestrutura básica, rede de esgoto, pavimentação de vias públicas próximo ao domicílio das gestantes, posse de cachorro ou gato como animais de estimação, escolaridade, entre outros, e os resultados demonstraram que comunidades em situações precárias apresentam maior soroprevalência do *T. gondii*, além de relação positiva entre a presença de animais de estimação e *T. gondii* (SROKA et al., 2010). Outros estudos feitos em diferentes estados brasileiros encontraram maiores soroprevalências: no estado de Maranhão foi encontrada sororreatividade de 78% das gestantes analisadas (CAMARA et al., 2015), enquanto na população carente do norte do estado do Rio de Janeiro 84% da população de baixo poder econômico foi soropositiva para o *T. gondii* (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). Esses dados revelam que diversas regiões brasileiras são endêmicas para toxoplasmose, atingindo altas taxas de soropositividade, possivelmente motivadas pelo clima quente e úmido de grande parte do território brasileiro, ideal para a sobrevivência prolongada do oocisto no ambiente, falta de conhecimento decorrente da educação deficiente, falta de saneamento básico, convívio com animais criados soltos e consumo de alimentos e água inapropriadamente preparados.

A soroprevalência sistemática de *T. gondii* em animais ainda não foi realizada, apesar da importância da transmissão através de animais ser evidente, especialmente na disseminação pela alimentação com carne contaminada com cistos, como evidenciado por estudos que demonstram a soroprevalência regional de determinadas espécies de rebanhos usados na alimentação humana (BACCI et al., 2015; CORREIA et al., 2015;

GEBREMEDHIN et al., 2015). Isso se deve a dificuldades propiciadas pelos diferentes tipos de animais que podem agir como hospedeiros intermediários, cada espécie com sua resistência natural e também afetada pelo ambiente onde vive. Análises com rebanhos de corte já foram feitas, chegando à conclusão que porcos, ovelhas e bodes apresentam riscos iminentes de transmissão. Galinhas (e outras aves domésticas dedicadas ao consumo), coelhos, cavalos e vacas apresentam menores quantidades de cistos na carne (TENTER et al., 2000). Medidas simples podem diminuir o risco de infecção desses animais, tais como manter o rebanho sempre em ambientes controlados, não permitindo que outros animais, especialmente roedores, gatos e cães tenham acesso ao ambiente e tratamento da água e alimentos consumidos por esses animais, porém tais medidas atualmente estão sendo criticadas devido à preferência por animais criados de forma natural (não confinados) (SCHLUTER et al., 2014). Quanto à prevalência de toxoplasmose em animais de estimação, o gato tradicionalmente representa um fator de risco para esse parasito, devido ao fato de ser o hospedeiro definitivo e liberar milhares ou milhões de oocistos para o ambiente, mas outro animal doméstico tem ganhado importância com o avanço das pesquisas. O cão, devido ao comportamento de rolar em material em decomposição e à coprofagia (uma pequena fração dos oocistos que passam pelo intestino do animal são defecados pelo cão da mesma forma), pode veicular o oocisto para outros animais e ser humano (SROKA et al., 2010).

1.5 Relação parasito-hospedeiro

1.5.1 Invasão da célula do hospedeiro

A invasão da célula do hospedeiro é um ponto essencial para os integrantes do filo apicomplexa, como o *T. gondii*, visto a obrigatoriedade de seu ciclo intracelular. A invasão se divide em vários estágios e em cada um deles o parasito expressa diferentes proteínas, as quais controlam fatores da célula hospedeira visando criar e manter um ambiente seguro, além de garantir a disponibilidade de nutrientes necessários para a replicação intensa (DUPONT et al., 2014; HUNTER; SIBLEY, 2012).

O processo de invasão se inicia com o contato e reconhecimento das células do hospedeiro pelo parasito. Esse papel de reconhecimento é exercido pelos antígenos de superfície do parasito (*surface antigen* – SAG) que recobrem sua membrana externa (LIU et

al., 2006). O próximo passo é a reorientação do parasito para que a sua extremidade apical fique em contato direto com a membrana celular (uma vez que, durante o reconhecimento promovido pelos antígenos de superfície, o protozoário pode estar com qualquer orientação). Essa reorientação é promovida pelos adesinas secretadas pelas micronemas (MIC), organelas secretórias situadas próximas ao complexo apical, além de atuar também promovendo a adesão do parasito à célula (que se tornará) hospedeira (HUNTER; SIBLEY, 2012). Uma das micronemas melhor estudadas é a MIC 2, essencial no adesão e reorientação do parasito (SIBLEY, 2011). Essas adesinas se ligam às proteínas alvo do hospedeiro com sua extremidade extracelular, enquanto a extremidade intracelular fica ligada ao citoesqueleto do parasito. A área de junção íntima entre parasito e hospedeiro recebe o nome de junção de movimento (SIBLEY, 2011). Juntamente com as adesinas, as micronemas secretam uma proteína conhecida como antígeno de membrana apical (AMA) 1, que se espalha por toda superfície do parasito, e proteínas das organelas roptrias, que se inserem na membrana citoplasmática da célula hospedeira (TYLER; TREECK; BOOTHROYD, 2011).

Uma vez que o parasito tenha se aderido à célula hospedeiro através das adesinas secretadas pela MIC, o parasito começa a invasão através de um processo conhecido como *gliding*, no qual ele altera seu citoesqueleto rapidamente, de forma organizada e sucessiva, a partir da junção de movimento. Nesse movimento, as adesinas secretadas pelas micronemas e ligadas a proteínas da célula hospedeira são transportadas pela membrana do parasito, da extremidade anterior até a extremidade posterior. Isso fará com que haja uma invaginação da membrana citoplasmática da célula a partir do ponto onde foi formada a junção de movimento. Essa invaginação englobará todo o parasito, resultando no vacúolo parasitóforo, que o envolve durante quase toda sua estadia dentro da célula (TYLER et al., 2011).

Após a invasão, o parasito estará alojado no compartimento citoplasmático, dentro do vacúolo parasitóforo, que o isola do resto do citoplasma da célula hospedeira. O vacúolo parasitóforo é quase totalmente formado por componentes da membrana do hospedeiro, com pequena participação do parasito (cerca de 20%). Para que o vacúolo parasitário seja gerado e mantido, as organelas ROP secretam proteínas diferentes que possuem diversas funções: criar e manter a membrana do vacúolo parasitóforo, garantir que o hospedeiro não seja capaz de fagocitar o parasito ao impedir que o vacúolo parasitóforo se funda com lisossomos e, dependendo da virulência da cepa, regular a transcrição de fatores proinflamatórios pela

célula, o que pode causar modulação da resposta imunológica para um perfil permissivo à infecção (DLUGONSKA, 2008; GAZZINELLI et al., 2014; HUNTER; SIBLEY, 2012).

Uma vez que o parasito esteja alojado no vacúolo parasitóforo e a célula tenha sido controlada pelos fatores secretados pelo parasito, começa a secreção de proteínas do grânulo denso (GRA). Essas proteínas possuem a capacidade de modificar a membrana do vacúolo parasitóforo, tornando-a permeável a nutrientes necessários para a replicação, além de agir na célula hospedeira, mobilizando os nutrientes citoplasmáticos para serem usados pelo parasito. Finalizados os preparativos, o parasito se divide por endodiogenia até atingir o número de 64 a 128 parasitos filhos. Nesse momento, os parasitos secretam moléculas que facilitam o rompimento do vacúolo parasitóforo, que faz que fiquem livres no citoplasma, em seguida provocam a lise da célula e caem no ambiente extracelular, onde recomeçam o ciclo (RAVINDRAN; BOOTHROYD, 2008).

1.5.2 Resposta imunológica

A resposta imunológica decorrente da infecção pelo *T. gondii* é caracterizada por um conflito entre hospedeiro e parasito que se inicia no momento da infecção e termina somente com a morte do hospedeiro, seja ela causada ou não pelo parasito.

A primeira etapa desse conflito ocorre com a infecção do hospedeiro. Ao consumir alimentos contaminados com cistos ou oocistos de *T. gondii*, as formas infecciosas do parasito são liberadas no intestino, onde os esporozoítos ou bradizoítos entram em contato com as células do intestino. O reconhecimento inicial do parasito ocorre através de receptores de reconhecimento de padrões associados aos patógenos (*pathogen associated molecule pattern* – PAMP), notadamente através de receptores semelhantes a toll (*toll like receptor* - TLR). Em murinos, o reconhecimento do *T. gondii* parece ocorrer principalmente através dos TLRs 2, 4, 7, 9 e complexo TLR 11 e 12. TLRs 2 e 4 reconhecem a glicosilfosfatidilinosito (*glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins*-GPI), uma proteína presente em toda superfície do taquizoíto e conservada entre as cepas (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007); TLR 11 é capaz de reconhecer moléculas semelhantes a profilina (molécula conservada entre parasitos protozoários) e, juntamente com o TLR12, sinaliza o seu reconhecimento para a molécula adaptadora MYD 88 (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012); TLR 7 e 9 reconhecem DNA e RNA parasitário que porventura sejam capturados nos

endolisossomos da célula. (ANDRADE et al., 2013). Receptores de padrão molecular associado ao dano (*damage associated molecular pattern* - DAMP) também reconhecem moléculas liberadas decorrentes do dano causado pelo parasito. O estímulo sofrido pelos TLRs, DAMPs e PAMPs faz com que as células endoteliais infectadas e vizinhas a elas liberem quimiocinas, que atraem células do sistema imunológico (STURGE; YAROVINSKY, 2014). Entre as células atraídas estão os neutrófilos, células dendríticas, monócitos e, indiretamente, células NK (*natural killer*). Neutrófilos são importantes na fagocitose de parasitos durante o estágio extracelular e na produção das citocinas interferon (IFN) γ e fator de necrose tumoral (TNF) (STURGE; YAROVINSKY, 2014); monócitos e células dendríticas também exercem a fagocitose mas, diferente dos neutrófilos, elas são capazes de liberar IL-12, uma citocina capaz de ativar outras células do sistema imunológico. As células dendríticas também tem a função de apresentadora de antígenos para células T, podendo facilitar a sua ativação e iniciar a fase adaptativa da resposta imune. As células NK são ativadas por IL-12 e produzem IFN- γ , além de possuírem também função citotóxica. A partir desse ponto, começa um ciclo de *feedback* positivo onde o IFN- γ liberado pelas células NK estimula maior produção de IL-12 pelas células dendríticas e monócitos, que por sua vez estimula o aumento da produção de IFN- γ (DUNAY; SIBLEY, 2010; STURGE; YAROVINSKY, 2014; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

A imunidade adaptativa que se segue à imunidade inata é constituída de 2 pontos principais: a imunidade humoral e a imunidade celular.

A imunidade adaptativa humoral é específica ao estágio extracelular do parasito, ocorrendo quando o taquizoíto sai de uma célula infectada para infectar uma sadia ou em eventuais situações nas quais algum cisto se rompa, liberando bradizoítos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Células APC (apresentadores de antígeno) iniciam a resposta imunológica adaptativa ao apresentarem porções do antígeno de *T. gondii* através do MHC de classe I para células T CD4⁺ e, pelo MHC de classe II, para células TCD8⁺. A apresentação de antígeno, juntamente com estímulos de citocinas e de moléculas co-estimuladoras, ativa o linfócito TCD4⁺ presente nos órgãos linfoides secundários que, por sua vez, ativa linfócitos B dos órgãos linfoides secundários (CORREA et al., 2007). Os anticorpos produzidos contra o parasito possuem funções distintas: podem neutralizar fragmentos chave do parasito, sem os quais a invasão e/ou replicação não possam acontecer;

podem também opsonizar o patógeno, facilitando que células fagocíticas possam captura-lo e destruí-lo; e, por fim, anticorpos ligados a superfície do patógeno são capazes de ativar a via clássica do complemento, resultando na destruição da membrana do parasito (DUPONT et al., 2012).

A primeira classe de imunoglobulinas (Ig), produzida por camundongos imunocompetentes em resposta à infecção primária com *T. gondii*, é a M, a qual já pode ser detectado entre 5 e 7 dias após a infecção. Esses anticorpos são marcadores do início da fase aguda da infecção por serem os primeiros a serem gerados e também os primeiros a desaparecerem (exceto por raros casos em que seus níveis podem perdurar por meses). Possuem menor capacidade neutralizante que o IgG (CORREA et al., 2007; GRAS et al., 2004; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004). Observando o soro do animal, a próxima imunoglobulina intensamente produzida é a IgG, a qual já começa a ser detectada antes mesmo do desaparecimento do IgM. Em camundongos, ela começa a ser produzida 2 semanas após a infecção e atingirá níveis de produção mais elevados que qualquer outra imunoglobulina. Mesmo que o hospedeiro sobreviva à infecção crônica, níveis reduzidos dessa classe de anticorpos perdurarão por toda a vida do hospedeiro, variando de acordo com o estímulo fornecido pelos parasitos remanescentes. O IgG é o anticorpo mais eficiente no combate ao parasito circulante (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; PALMEIRA et al., 2012). Considerando que a infecção pelo *T. gondii* ocorre com o parasito penetrando através da mucosa intestinal, IgA desempenha também um papel importante na proteção das mucosas, visto que este é o único anticorpo secretado em tais sítios, evitando que o hospedeiro seja reinfectado com o parasito, ou pelo menos reduzindo a carga parasitária da nova infecção. Eventualmente essa classe pode ser encontrada em outros locais (MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

A imunidade celular é o aspecto mais importante da resposta imunológica contra o *T. gondii*, pois o parasito é intracelular obrigatório, o que significa que todo o seu ciclo replicatório, assim como as patogenias resultantes, ocorrem dentro da célula do hospedeiro. A resposta adaptativa celular se inicia com a apresentação de moléculas fagocitadas pelos MHC de classe II de APCs que tenham fagocitado o parasito e pela exposição da célula T à citocina IL-12, resultando na diferenciação de células TCD4+ *naïve* (virgem) em células da subpopulação Th1 (*helper*). Esse perfil de células Th é essencial para o combate à infecção.

Células Th1 diferenciadas e ativadas pela exposição migram dos linfonodos para os tecidos do hospedeiro, onde atuam secretando citocinas (especialmente IFN- γ) que amplificam mecanismos da resposta imune inata, tornando as células fagocíticas mais eficientes (SANECKA; FRICKEL, 2012; STURGE; YAROVINSKY, 2014). O IFN- γ produzido pelas células TCD4+ (e outras células, tais como NKT, NK e neutrófilos) possui grande importância na imunidade contra o *T. gondii*, visto que sua função é a de ativar diversas células do sistema imune inato, especialmente o macrófago, fazendo com que eles fagocitem mais parasitos que não estejam parasitando células e tornando-os também mais resistentes aos parasitos que porventura já os tenham invadido (MILLER, C. M. et al., 2009). Os mecanismos de resistência à infecção, induzidos pelo IFN- γ , podem ocorrer pela expressão aumentada de enzimas fagocíticas, produção de outras citocinas pró-inflamatórias e diminuição da oferta de nutrientes necessários para a replicação do parasito (ALIBERTI, 2005; DUPONT et al., 2012; MILLER, C. M. et al., 2009; STURGE; YAROVINSKY, 2014).

O IFN- γ estimula a depleção de pelo menos dois nutrientes citoplasmáticos essenciais para a replicação do parasito: o aminoácido triptofano, o qual o parasito não é capaz de produzir, é depletado através da maior expressão da enzima indoleamina 3,2-dioxigenase (IDO), responsável por degradar esse aminoácido e, uma vez que a célula hospedeira não possua os níveis mínimos desse aminoácido, o parasito não conseguirá se replicar (MILLER, C. M. et al., 2009). O outro componente essencial para a replicação do parasito e que é depletado pela ação do IFN- γ é o aminoácido L-arginina. Essa depleção ocorre indiretamente, por ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), pois esta enzima produz reativos intermediários de nitrogênio (RNI) usando esse aminoácido. Quando a expressão de iNOS é aumentada, a produção de RNI também aumenta, diminuindo a quantidade de L-arginina disponível para replicação do parasito (MILLER, C. M. et al., 2009; STURGE; YAROVINSKY, 2014).

O IFN- γ estimula macrófagos a produzirem TNF, um potente estimulador de várias células e mecanismos da resposta imune (ALIBERTI, 2005).

Por fim, o IFN- γ estimula a produção de várias enzimas necessárias para a amplificação da resposta imune. A iNOS é uma das enzimas estimuladas por essa citocina e o efeito é o aumento da produção de RNIs. Um dos RNIs produzidos é o óxido nítrico (NO),

que possui atividades microbicidas ao se combinar com várias proteínas presentes no vacúolo parasitóforo e no próprio parasito, modificando a estrutura e função delas, o que acarreta a perda de função, culminando na inibição da replicação e morte parasitária (MILLER, C. M. et al., 2009). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) também é amplificada pelo IFN- γ . ROS são extremamente reativas e, uma vez que sejam liberadas no vacúolo parasitóforo, promovem a destruição do parasito e eventualmente também destroem componentes celulares (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

As células TCD8+, conhecidas como linfócitos T citotóxicos, também participam na imunidade contra o *T. gondii*. Quando são ativadas pelo IL-12, as células TCD8+ agem lisando as células infectadas, importante para evitar que o parasito se multiplique, e produz citocina IFN- γ (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; DUPONT et al., 2012).

1.5.3 Regulação da resposta imunológica

A resposta imune dirigida contra o *T. gondii* é vital para a sobrevivência do hospedeiro pois quando esse parasito não encontra obstáculos para sua replicação, como observado em animais imunossuprimidos, a infecção leva à morte do hospedeiro ou resulta em sequelas graves. Apesar de essencial, a resposta imune frequentemente é muito tóxica ao hospedeiro, como observado em modelos murinos susceptíveis como os da linhagem C57Bl/6, nos quais o excesso de ativação (induzida pelo IFN- γ e TNF) leva à necrose da mucosa intestinal e ao óbito (EGAN; COHEN; DENKERS, 2012). Para limitar os efeitos danosos causados pela resposta imune, o hospedeiro possui maneiras de regular a resposta inflamatória para que ela não cause mais danos que o necessário. A regulação da resposta imune contra o *T. gondii* é exercida principalmente por duas citocinas, a IL-10 e o fator transformador do crescimento β (TGF- β). A produção dessas citocinas é feita por subpopulações de células específicas, como as células T regulatórias (Treg). O efeito da IL-10 no ambiente inflamatório é a inibição da atividade microbicida de macrófagos, inibição da diferenciação de células T CD4+ para o perfil Th1 e redução da produção de IFN- γ por células T e NK. O resultado é a inibição, ou redução, do *feedback* positivo entre IL-12 e IFN- γ , que leva à inibição da produção dessas citocinas e regulação da resposta imune no sítio da infecção, permitindo que o hospedeiro sobreviva à própria resposta imune durante a fase aguda da infecção (BUTLER; HARRIS; BLADER, 2013; DUPONT et al., 2012).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* hoje é feito, em humanos, preferencialmente através de métodos indiretos que demonstram se o hospedeiro possui anticorpos específicos ao patógeno e a classe de anticorpo detectado, demonstrando (nem sempre de forma precisa) se a fase na qual a infecção se encontra é a aguda ou crônica (SENSINI, 2006). Existem ainda outras formas de diagnóstico, direto e indiretos.

As formas diretas de detecção buscam o parasito dentro dos tecidos do hospedeiro, em tecidos como o sangue, cérebro e outros tecidos. A detecção pode ser feita pelo isolamento do parasito em cultura de células, inoculação de amostras biológicas com suspeita de presença do parasito em animais de laboratório (bioensaio), reação em cadeia pela polimerase (PCR) ou por outros métodos.

A PCR é uma técnica capaz de detectar quantidades mínimas do parasito na amostra biológica, pois sequências genômicas específicas do parasito são amplificadas através do uso da enzima DNA polimerase. Essa técnica pode ser quantitativa ou qualitativa, de acordo com o método de detecção usado: o gel de agarose é usado para análises qualitativas, enquanto a PCR em tempo real (com sondas que emitem fluorescência a cada sequência amplificada) é usada para análises qualitativas. Quando aliada a um protocolo de extração do material genético eficiente, essa técnica apresenta sensibilidade e especificidade altas, mas tem alto custo e execução demorada, então não é usado na rotina hospitalar, exceto em casos de risco nos quais a detecção da fase da infecção é essencial, como acontece em gestantes com suspeita de toxoplasmose primária (BIRADAR et al., 2014; BOURDIN et al., 2014; SWITAJ et al., 2005).

O isolamento de parasitos em cultura de células ou em animais de laboratório (bioensaio) também são técnicas que visam identificar o parasito numa amostra biológica. Nessas técnicas, as amostras biológicas em que (possivelmente) existam parasitos são inoculadas em cultura de células ou animal de experimentação, onde eles poderão invadir outras células. Caso haja algum parasito na amostra, ele migrará para as células da cultura ou do animal, onde se replicarão e, depois de alguns dias (varia de acordo com a carga parasitária presente na amostra inoculada) os parasitos serão visíveis na cultura de células ou no material colhido do animal infectado. Essa técnica não é usada para diagnóstico hospitalar de rotina,

já que ela pode demorar até semanas para demonstrar algum resultado e na amostra devem conter parasitos viáveis, o que afeta a sensibilidade do ensaio (FEITOSA et al., 2014; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDE, 2012).

Os métodos de diagnóstico indireto se baseiam na detecção de anticorpos específicos contra o parasito. Para isso, podem ser empregadas técnicas como a imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reações de *immunoblotting* e outros. Essas técnicas possuem boa sensibilidade e especificidade, mas não são capazes de diferenciar estágios da infecção (aguda ou crônica), ou esses resultados são menos precisos que os métodos diretos (MARCOLINO et al., 2000; MCLEOD et al., 2009; SENSINI, 2006).

1.7 Tratamento

A fase aguda da toxoplasmose pode ser tratada através do uso de diferentes grupos de drogas que agem diretamente sobre o parasito ou indiretamente, ao fazer com que os taquizoítos não tenha acesso a nutrientes celulares (INNES, 2010). Drogas do grupo dos folatos podem ser usadas para o tratamento da toxoplasmose, pois elas agem como antagonistas do folato e inibem a síntese dele, resultando na redução da proliferação do parasito. Os grupos de drogas dos macrolídeos e das hidroxinaftoquinonas apresentam efeito tóxico ao parasito, inibindo moléculas que fazem parte da cadeia respiratória do parasito. Por fim, existem também as drogas do grupo das fluoroquinolonas, as quais impedem que o parasito se multiplique ao inibir enzimas envolvidas na replicação de seu DNA (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Ainda não existe uma droga patenteada capaz de eliminar a forma crônica da doença (INNES, 2010)

1.8 Prevenção

A prevenção da infecção pelo *T. gondii* é feita através da adoção de medidas diversas, especialmente alimentares, tais como não consumir carnes cruas ou malcozidas (sempre submetê-las a temperaturas superiores a 70°C); lavar bem utensílios de cozinha que entrem em contato com carne crua; somente beber água filtrada ou fervida e lavar vegetais consumidos crus com água tratada; descascar vegetais e frutas consumidas cruas (quando

possível); lavar sempre as mãos, especialmente após manusear o solo em locais frequentados por gatos; evitar contato com fezes de gatos. Com essas simples medidas, é possível evitar a infecção pelo *T. gondii* (BOJAR; SZYMANSKA, 2010; JONES; DUBEY, 2012; ROBERT-GANGNEUX, 2014; SUKTHANA, 2006).

Atualmente, não existem vacinas contra o *T. gondii* para humanos e somente uma para ovelhas, produzida a partir de taquizoítos vivos atenuados, usada para reduzir o número de abortos em rebanhos (INNES, 2010). Pesquisas para desenvolver uma vacina contra esse parasito enfrentam diversas dificuldades, como a diversidade de genótipos existentes no ambiente (BOOTHROYD, 2009), os vários mecanismos de evasão do parasito (ZIMMERMANN et al., 2006) e a expressão de proteínas distintas nas diversas fases do parasito (VERMA; KHANNA, 2013). Buscando contornar essas dificuldades, diferentes métodos de pesquisa são usados na tentativa de desenvolver uma vacina contra a toxoplasmose, como parasitos inativados (ZORGI et al., 2011), imunização com proteínas do parasito (TAN et al., 2011; YUAN et al., 2011), vacinas com plasmídeos contendo DNA do parasito (ANGUS et al., 2000; XU et al., 2014) e, mais recentemente, imunização com peptídeos derivados de proteínas imunodominantes do parasito (ZHANG, T. E. et al., 2015a).

Utilizar taquizoítos vivos e atenuados como antígenos vacinais é uma das estratégias de vacinação mais antigas adotadas. Nela, o parasito inteiro é atenuado de alguma forma como, por exemplo, a passagem dele em cultura de células ou exposição a materiais radioativos (ZORGI et al., 2011). A única vacina veterinária disponível atualmente, toxovax, é produzida dessa forma (VERMA; KHANNA, 2013). Essa técnica apresenta várias desvantagens com relação a outras, como o curto tempo pelo qual a vacina permanece viável, necessidade de produzir grandes quantidades do parasito e de mantê-los sempre em condições ideais de temperatura, o risco de acidentes que resultem em auto-infecção do profissional envolvido na sua produção e na aplicação (VERMA; KHANNA, 2013).

Uma alternativa ao uso do parasito todo foi a utilização de proteínas específicas dele para imunização. Para tanto, a escolha do antígeno torna-se um importante passo no delineamento do estudo, pois é necessário escolher uma proteína que seja essencial para a patogenia do parasito (AZZOUZ et al., 2012). Essa técnica apresenta vantagens quando comparada com a utilização do patógeno atenuado, como a impossibilidade do profissional

ser contaminado com o parasito e não necessitar de animais de experimentação para a sua produção (AZZOUZ et al., 2012).

Por fim, surgiu uma nova estratégia para o desenvolvimento de vacina semelhante ao uso de proteínas do parasito, exceto que o antígeno vacinal usado nesse método é bem menor. A imunização com peptídeos derivados de proteínas imunodominantes do parasito é uma estratégia nova, mas que já apresenta resultados interessantes. Zhang e colaboradores (2015) fizeram a predição *in silico* de peptídeos curtos (15, 30 e 32 aminoácidos) a partir do antígeno da membrana apical-1, das roptrias 2 e 4. Utilizando esses peptídeos para imunizar animais, eles verificaram que houve produção de anticorpos específicos aos antígenos, a resposta imune celular foi amplificada pela imunização, a carga parasitária do cérebro foi reduzida e a sobrevivência pós desafio foi aumentada. Torres-Morales e colaboradores (2014) também observaram que peptídeos sintetizadas a partir de roptrias obtiveram altos índices de reconhecimento pelos soros de humanos infectados.

2 JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é uma doença que atinge um terço da população humana e possui prevalência desconhecida em boa parte dos animais, presumidamente tão intenso quanto à prevalência humana. Em humanos, a infecção por esse parasito é responsável por extensa morbidade e mortalidade em gestantes, fetos, neonatos e indivíduos imunocomprometidos e responsável por grandes perdas econômicas na pecuária, causando aborto e morte em várias espécies de animais.

Toxoplasma gondii é um parasito capaz de empregar vários mecanismos para escapar da resposta imunológica do hospedeiro, possui ciclo heteroxeno no qual existem incontáveis hospedeiros intermediários acidentais e diferentes cepas do parasito no ambiente, então desenvolver uma vacina que seja segura ao hospedeiro, capaz de combater a infecção aguda e elimine, ou pelo menos reduza, os cistos teciduais na fase crônica é uma pesquisa que vem sendo desenvolvida há décadas e é considerada uma prioridade, visto a alta prevalência e intensos danos sociais e econômicos causados por esse protozoário. Tendo em vista esta necessidade, no presente trabalho propusemos verificar a capacidade protetora de 22 peptídeos sintetizados a partir de proteínas imunodominantes (SAG, ROP, GRA e MIC) e que possuem funções essenciais na invasão e/ou multiplicação do parasito, em modelo murino de experimentação, buscando antígenos que possam diminuir os danos biológicos, sociais e econômicos causados pela toxoplasmose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a capacidade protetora de peptídeos sintetizados a partir de proteínas imunodominantes do parasito *Toxoplasma gondii* em modelo murino de infecção oral.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar quais peptídeos são mais reconhecidos pelos soros de animais infectados
- Analisar a resposta imune humoral em animais imunizados, antes e após a infecção
- Verificar se a imunização com os peptídeos induziu mudança na produção de citocinas
- Comparar a carga parasitária cerebral de animais imunizados e não imunizados
- Desafiar animais imunizados e verificar a proteção induzida pelos peptídeos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Predição, *design* e síntese dos peptídeos

Para analisar a presença de epítomos de célula B em antígenos imunodominantes de *T. gondii*, sequências completas de proteínas desse parasito (SRS, ROP, MIC e GRA) foram obtidas do banco de dados ToxoDB (<http://www.toxodb.org/toxo>). Os dados coletados foram analisados usando recursos online de predição de epítomos de célula B, disponíveis no banco de dados e recursos de análise de epítomos imunológicos (*epitope database and analysis resource* – IEDB) (<http://www.iedb.org>). A predição dos epítomos lineares foi feita baseada nos dados obtidos, através do método de predição de epítomos lineares Bepipred, usando o *score* mínimo de 1,5 (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006). Baseado nos resultados obtidos, as sequências de 15 aminoácidos com maiores *scores* foram escolhidas como epítomos e usados para desenhar os peptídeos. A predição resultou num total de 22 peptídeos que satisfizeram todas condições (tabela 1). Esses peptídeos foram submetidos a análises de BLASTP (*Basic local alignment search tool for proteins*), uma ferramenta capaz de comparar se o trecho de interesse possui homólogos com outros organismos. Os peptídeos foram então quimicamente sintetizados (GenScript EUA Inc., New Jersey, EUA), usando moléculas de albumina bovina sérica (*bovine serum albumin* – BSA) como núcleo aos quais as sequências foram anexadas. Cromatografia líquida de alta performance (*high-performance liquid chromatography* – HPLC) e espectrometria de massa foram realizadas para avaliar a pureza e a sequência dos peptídeos produzidos, servindo como controle da produção dos peptídeos.

Tabela 1: Parâmetros da síntese dos peptídeos. Os peptídeos foram preditos *in silico* a partir de proteínas imunodominantes do *T. gondii*, usando ferramentas de bioinformática.

Peptídeos	Antígeno	Posições de início e término	SCORE MÁXIMO NA PREDIÇÃO
Pep1	SRS16C-BSR4	336-350 aa	2,6
Pep2	SRS49A-SAG2Y	296-310 aa	3,0
Pep3	SRS49C-SAG2D	156-170 aa	2,6
	SRS49D-SAG2C	324-338 aa	
Pep4	SRS52A	123-137 aa	2,7
Pep5	ROP7	528-542 aa	2,9
Pep6	MIC1	248-262 aa	3,2
Pep7	ROP2	100-114 aa	3,1
Pep8	MIC6	250-264 aa	2,7
Pep9	MIC8	27-41 aa	3,2
Pep10	MIC8	652-666 aa	3,0
Pep11	MIC14	910-924 aa	2,9
Pep12	MIC14	946-960 aa	2,6
Pep13	GRA4	40-54 aa	3,0
Pep14	GRA4	176-190 aa	2,8
Pep15	GRA6	178-192 aa	2,8
Pep16	GRA10	590-604 aa	4,1
Pep17	GRA10	674-688 aa	2,8
Pep18	GRA15	283-297 aa	2,8
Pep19	GRA15	370-384 aa	2,9
Pep20	GRA15	492-506 aa	2,7
Pep21	MIC2-associated protein-M2AP	208-222 aa	2,9
Pep22	MIC2-associated protein-M2AP	260-274 aa	3,1

4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA)

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto foi feito para verificar a presença de imunoglobulinas G (IgG), como descrito em outro trabalho (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Brevemente, placas de microtitulação de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com uma solução de antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* (STAg) em tampão carbonato (pH 9,6) na concentração de 10 µg/mL, 50µL por poço, seguido por incubação de 18 horas a 4°C. Em seguida, cada poço foi lavado com 200 µL de PBS-Tween 0,05% (PBST) três vezes. Então, os sítios de ligação restantes dos poços foram bloqueados com 100 µL de PBST-5% de leite desnatado (PBSTD) por 1 hora à temperatura ambiente. A placa foi lavada novamente,

amostras de soros dos camundongos foram diluídos em PBSTD na diluição de 1:50, e cada poço recebeu 50 µL da diluição do soro seguido por incubação de 1 hora a 37°C. Em seguida, os poços foram novamente lavados e 50 µL de uma solução 1:2000 de anticorpos Fc específicos anti-camundongos conjugados com enzima peroxidase (Sigma Chemical Co., Missouri, EUA), diluído em PBSTD, foi adicionado em cada poço, seguido por 1 hora de incubação a 37°C. Por fim, a reação foi revelada usando a solução comercial ABTS (0.03% H₂O₂ e 0,01 M de cromógeno 2,2' -azin-bis-3-etil ácido sulfônico benzotiazolina; Sigma Chemical Co., Missouri, EUA). As placas foram lidas na faixa de 405 nm (Titertek Multiskan Plus spectrophotometer, Flow Laboratories, McLean, EUA).

Para verificar a presença de anticorpos específicos aos peptídeos, foi utilizado o protocolo descrito acima, com pequenas modificações. Antes de aplicar as amostras nos poços, cada soro foi incubado, por 2 horas a 37°C, com uma solução de BSA 0,5mg/mL em PBST, seguido por centrifugação e coleta dos sobrenadantes, que foram posteriormente usados como as amostras a serem aplicadas nos poços. Com esse novo passo, anticorpos específicos ao BSA foram neutralizados, garantindo que os anticorpos detectados na conclusão do experimento são específicos aos peptídeos e não ao BSA. A placa foi sensibilizada com uma solução de grupos peptídicos, com tampão fosfato pH 6,5, na concentração de 10 µg/mL. Nesse novo protocolo utilizamos somente PBST, tanto para bloqueio dos sítios não sensibilizados das placas quanto para diluir os reagentes e amostras. Por fim, poços sensibilizados com BSA foram usados como controles. Tempo de incubação, lavagem, temperaturas e demais reagentes foram os mesmos que os descritos anteriormente.

4.3 Animais e parasitos

Para realizar a triagem sorológica, utilizamos os soros de 10 camundongos fêmeas BALB/c, infectados com a cepa ME49 de *T. gondii*, cujas amostras foram coletadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 49 e 60 pós infecção. As amostras faziam parte do banco de soros do laboratório.

Um total de 90 fêmeas isogênicas de camundongos C57Bl/6, tipo selvagem (*wild type* – WT), foram fornecidas pelo centro de bioterismo e experimentação animal (CBEA) da

Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram mantidos também no CBEA, com água e comida *ad libitum* e foram usados nos experimentos de imunização.

A cepa ME49 do parasito *T. gondii* foi usada para infectar os animais imunizados e a cepa RH foi usada para produzir STAg.

4.4 Triagem sorológica dos peptídeos

Buscando selecionar os peptídeos capazes de melhor estimular o sistema imunológico do modelo experimental, foi realizada uma triagem sorológica com soros de camundongos experimentalmente infectados com 10 cistos de ME49 de *T. gondii*. Amostras de sangue foram coletados destes animais nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 49 e 60 pós infecção para acompanhar a produção de anticorpos capazes de reconhecer o parasito e verificar se os anticorpos produzidos por esses animais também seriam capazes de reconhecer os peptídeos sintetizados. A verificação da presença de anticorpos foi realizada utilizando protocolo já descrito do método de ELISA. De acordo com os resultados obtidos, 11 peptídeos foram escolhidos e divididos em 4 grupos, separados de acordo com a proteína da qual derivaram (SRS, GRA, MIC OU ROP) e um grupo no qual foram colocados os peptídeos de melhor performance de cada grupo, exceto pelo P10, escolhido para esse grupo devido à alta sororreatividade precoce (MIX) (anexo 1). O peptídeo 7 (grupo ROP) foi uma exceção devido ao pequeno número de peptídeos sintetizados daquela proteína (somente 2).

4.5 Produção de STAg

STAg foi necessário nos experimentos de ELISA e na imunização de animais, agindo como grupo controle em ambos casos.

STAg foi produzido como descrito em outros trabalhos (MINEO et al., 1980; SANTANA et al., 2012). Brevemente, taquizoítos de *T. gondii* foram mantidos através de passagens seriadas no peritônio de camundongos Swiss. O exsudato peritoneal de camundongos infectados foi coletado e lavado em tampão salina-fosfatado (*phosphate-buffered saline* – pH7,2) e a suspensão parasitária foi ajustada para 1×10^8 taquizoítos/mL. Então, a suspensão foi submetida a ciclos de congelamento, aquecimento e sonicação, na

presença de inibidores de protease, centrifugada, o sobrenadante coletado e o conteúdo proteico foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

O método de produção *in vivo* de STAg foi preferido ao método *in vitro* devido ao *core* utilizado na produção dos peptídeos, o BSA. Os meios de cultura utilizados na manutenção das células possuem BSA na sua composição, o que poderia influenciar nos resultados de ensaios que comparassem resultados obtidos pelo grupo STAg e outros imunizados com os peptídeos.

4.6 Imunização, infecção e desafio

Os experimentos de imunização, infecção e desafio foram realizados usando um total de 90 camundongos C57BL/6 isogênicas fêmeas, com idades entre 6 e 8 semanas. 45 animais foram imunizados inicialmente para posterior infecção subletal e o restante foi imunizado posteriormente e usado no desafio. A imunização, em ambos casos, foi idêntica.

Os camundongos foram divididos em 9 grupos, cada grupo com 5 animais, sendo que 5 grupos foram imunizados com grupos de peptídeos (grupos experimentais) e os outros 4 grupos foram imunizados com substâncias necessárias para garantir a veracidade e melhor análise dos dados obtidos (grupos controle). Os grupos controles foram imunizados com BSA+adjuvante (hidróxido de alumínio, Alhydrogen®, InVivoGen, California, EUA), somente adjuvante, STAg ou PBS. Os animais foram imunizados 3 vezes com doses idênticas, 10 µg de cada peptídeo mais adjuvante (de acordo com instruções do fornecedor do adjuvante), nos dias 0, 15 e 30.

Os peptídeos usados na imunização e os grupos controles foram descritos no quadro 1.

Quadro 1: Grupos de imunização. Os grupos SRS, GRA, ROP, MIC e MIX são grupos experimentais, enquanto STAg, BSA, adjuvante e PBS são grupos controle.

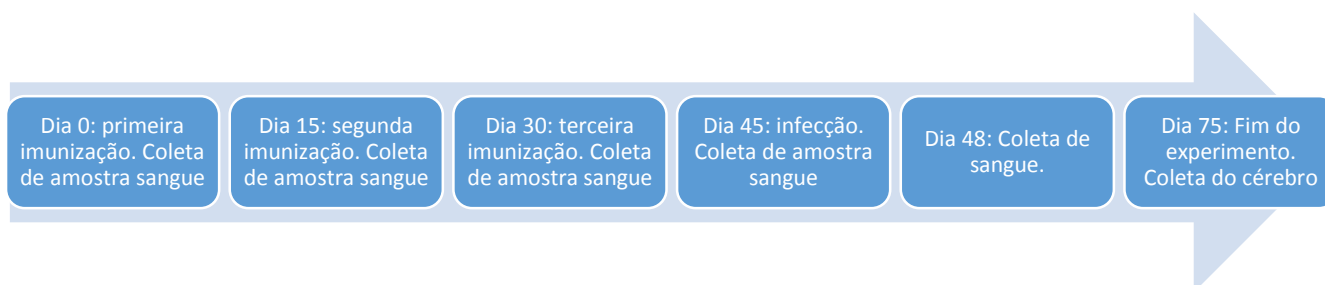
SRS	GRA	ROP	MIC	MIX	STAg	BSA	Adjuvante (Alumen)	PBS
Pep 2	Pep 13	Pep 5	Pep 8	Pep 2				
Pep 3	Pep 15	Pep 7	Pep 10	Pep 17				
Pep 4	Pep 17	-	Pep 21	Pep 5				
-	-	-	-	Pep 10				

Os animais do experimento de infecção subletal foram infectados via gavagem com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*, no dia 45. Amostras de sangue foram coletadas nos

dias 0, 15, 30, 45 e 75 para avaliar a produção de anticorpos, e coletadas no dia 48 para avaliar a produção de citocinas. No fim do experimento, dia 75, os animais foram eutanasiados e os cérebros coletados para posterior análise da carga parasitária (figura 4A).

A eficácia protetora dos peptídeos foi verificada por outro experimento, realizado com 45 C57Bl/6 fêmeas que foram imunizados em datas e com doses idênticas aos animais do grupo de infecção subletal. Esses animais foram desafiados com 40 cistos de parasito da cepa ME49, via gavagem, e foram usados para construir uma curva de sobrevivência (figura 4B).

A



B

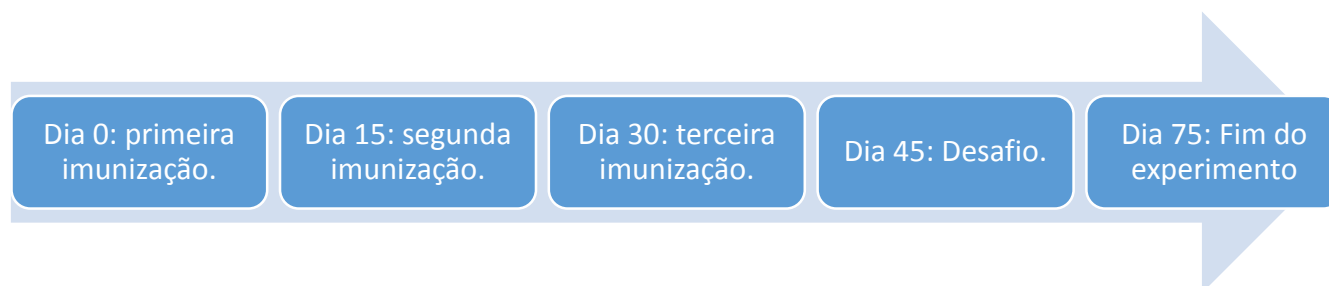


Figura 4: Delineamento dos experimentos de imunização e infecção. Foram imunizados dois grupos de camundongos C57Bl/6 fêmeas. O primeiro grupo (A) foi utilizado para estudar aspectos das respostas imune inata, adaptativa e a morbidade induzida pela infecção (10 cistos) em animais imunizados. O segundo grupo (B) foi imunizado de maneira idêntica ao primeiro e desafiado com 40 cistos de *T. gondii*, cepa ME49, visando observar se animais imunizados teriam uma sobrevivência maior que animais não imunizados.

4.7 Análise de produção de citocinas

Para verificar a produção de citocinas por animais imunizados e infectados, amostras de sangue foram coletadas de todos animais 3 dias depois da infecção, os soros foram obtidos e armazenados a -70°C . As concentrações das interleucina (IL)-2, IL-4, IL-6, interferon

(IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF), IL-17 e IL-10 foram mensuradas por citometria (*cytometric bead array*TM – CBA, Th1/Th2/Th17 kit, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), de acordo com as instruções do fornecedor. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo BDTM (FACSCantoII, BD Company, San Diego, CA, EUA) e os dados foram interpretados utilizando um *software* especializado (FCAP Array – software version 3.0). As concentrações das citocinas foram determinadas através de comparação com uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de citocinas murinas. Os limites de detecção para as citocinas foi 0,1 pg/mL (IL-2), 0,03 pg/mL (IL-4), 1,4 pg/mL (IL-6), 0,5 pg/mL (IFN- γ), 0,9 pg/mL (TNF), 0,8 pg/mL (IL-17) e 16,8 pg/mL (IL-10).

4.8- Carga parasitária

A carga parasitária foi mensurada através de uma relação da quantidade de DNA do parasito pela quantidade de DNA do hospedeiro, usando dados obtidos através de reação em cadeia pela polimerase quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction* – qPCR). Para obter esses dados, os cérebros dos animais foram primeiramente submetidos à extração do DNA contido em amostras dos mesmos para posterior submissão a qPCR.

O DNA foi extraído como descrito por MILLER, S. A.; DYKES; POLESKY (1988). Uma amostra do cérebro de cada animal imunizado e infectado foi congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e armazenados a -70°C. Então, o DNA destas amostras foi extraído através do seguinte protocolo: 100 mg de amostra foi macerada usando nitrogênio líquido e cadinho de porcelana. A amostra macerada foi pesada e todas as amostras tiveram aproximadamente 20 mg. No próximo passo, 500 μ L de tampão NLB (tris-HCl, NaCl e Na₂EDTA), 16 μ L de SDS 10% e 8 μ L de solução PK (20 mg/mL; Promega Corporation) foram adicionados e as amostras foram incubadas por 12 horas a 50°C. Após a incubação, 150 μ L de tampão NaCl 6M foram adicionados e vortexados por 15 segundos. Então, as amostras foram colocadas em gelo por 10 minutos e centrifugadas a 12000 RPM por 15 minutos. Após a centrifugação os sobrenadantes foram coletados e 800 μ L de etanol absoluto (96%) foram adicionados e o tubo agitado por inversão. Nesse ponto, o material genômico formou uma nuvem de aparência viscosa no sobrenadante. O DNA foi coletado, 1 mL de etanol 75% foi adicionado e centrifugado a 12000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante então

foi descartado. Por fim, os *pellets* obtidos foram ressuspensos com 150-200 µL de água destilada e estocados a -70°C. Antes de serem usados na qPCR, o DNA extraído foi quantificado (*NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Thermo Scientific*).

A qPCR foi realizada baseada no protocolo publicado por Collantes-Fernandez e colaboradores (2002), com modificações. Brevemente, dois pares de *primers* foram usados para amplificar o Tg529 (*forward*: 5' GCTCCTCCAGCCGTCTTG 3'; *reverse* 5' TCCTCACCCTCGCCTTCAT 3') e o GAPDH (*forward*: 5'GGAGAAACCTGCCAAGTATGATG; *reverse*: 5' CAGTGTAGCCCAAGATGCCC 3'), genes do parasito e hospedeiro, respectivamente. Foi preparada uma solução com DNA polimerase, dNTPs, *primers* e tampões de reações de acordo com as instruções do fabricante (GOTaq qPCR mastermix; Promega Corporation, CA, EUA) e 5 µL de amostra, com concentrações de DNA ajustadas para 20 ng/µL ou 0,5 ng/µL para a amplificação com os *primers* do parasito ou do hospedeiro, respectivamente. Em seguida, o DNA das amostras foi amplificado usando 40 ciclos de aquecimento (95°C, 40 minutos) e resfriamento (60°C, 40 minutos) (Step One Plus, Life Technologies, CA, EUA) e os dados foram obtidos através do sistema SYBR green de detecção. A análise foi feita usando o software especializado Step One Plus qPCR (Life Technologies, CA, EUA).

4.9 Ética e biossegurança

Todos procedimentos com animais foram aprovados pelo comitê de ética na utilização de animais (CEUA) da universidade federal de Uberlândia (UFU) (anexo 2).

Todos procedimentos que envolviam manuseio e/ou coleta de materiais biológicos, reagentes e equipamentos foram realizados de acordo com normas de biossegurança e conduta laboratorial apropriadas (MINEO et al., 2005).

4.10- Análises estatísticas

Todas análises estatísticas foram realizadas usando o *software* Graph Pad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e, de acordo com o resultado obtido, foram classificados em dados paramétricos ou não-paramétricos. Os dados não-paramétricos, dos experimentos de citocinas, foram comparados utilizando o teste Mann-Whitney, enquanto as análises dos dados paramétricos foram feitas usando o teste t não pareado para os resultados da carga parasitária e *one-way annova* para os resultados obtidos pela técnica de ELISA. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Características de peptídeos sintetizados

Os peptídeos usados nesse trabalho foram preditos a partir de dados obtidos em bancos de dados e usando ferramentas de bioinformática, ambos disponíveis online. Para verificar se as sequências preditas não possuíam homologia com sequências de outros organismos, foram realizadas análises de BLASTP, confirmando que os peptídeos não apresentavam nenhum alinhamento significativo com qualquer organismo além do *T. gondii*. Com essa análise, os peptídeos foram sintetizados quimicamente, as sequências dos aminoácidos foram correspondentes ao predito e a pureza obtida foi de 95%.

5.2 Sororreatividade de animais infectados com *T. gondii*

Os 22 peptídeos foram triados usando o soro de camundongos experimentalmente infectados. Utilizando a técnica de ELISA, várias placas foram sensibilizadas com diferentes peptídeos visando verificar se os anticorpos gerados pelos animais infectados seriam capazes de fazer esse reconhecimento e também foi analisada a cinética de reconhecimento desses anticorpos por um período de 60 dias. Os resultados obtidos foram representados no anexo 1. Os peptídeos foram reconhecidos em intensidades distintas, mas em geral apresentaram os mesmos comportamentos: aumento de absorbância do 7º ao 49º dia, seguido por queda até o 60º pós infecção. Os peptídeos 2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 15, 17 e 21 se destacaram com reconhecimentos mais intensos, alcançando absorbância líquida de até 0,6. O peptídeo 10, além de ser intensamente reconhecido a partir do dia 14 pós infecção, apresentou alta sororreatividade na fase mais aguda da infecção, com alto reconhecimento no dia 21 pós infecção, observado somente nesse peptídeo. Foi observado também que nenhum dos peptídeos atingiu as absorbâncias líquidas alcançadas pelo STAg.

5.3 Delineamento dos grupos de imunização

Os grupos experimentais foram formados a partir dos peptídeos cujos resultados de reconhecimento foram mais intensos no 49º dia pós-infecção da triagem sorológica (figura 4).

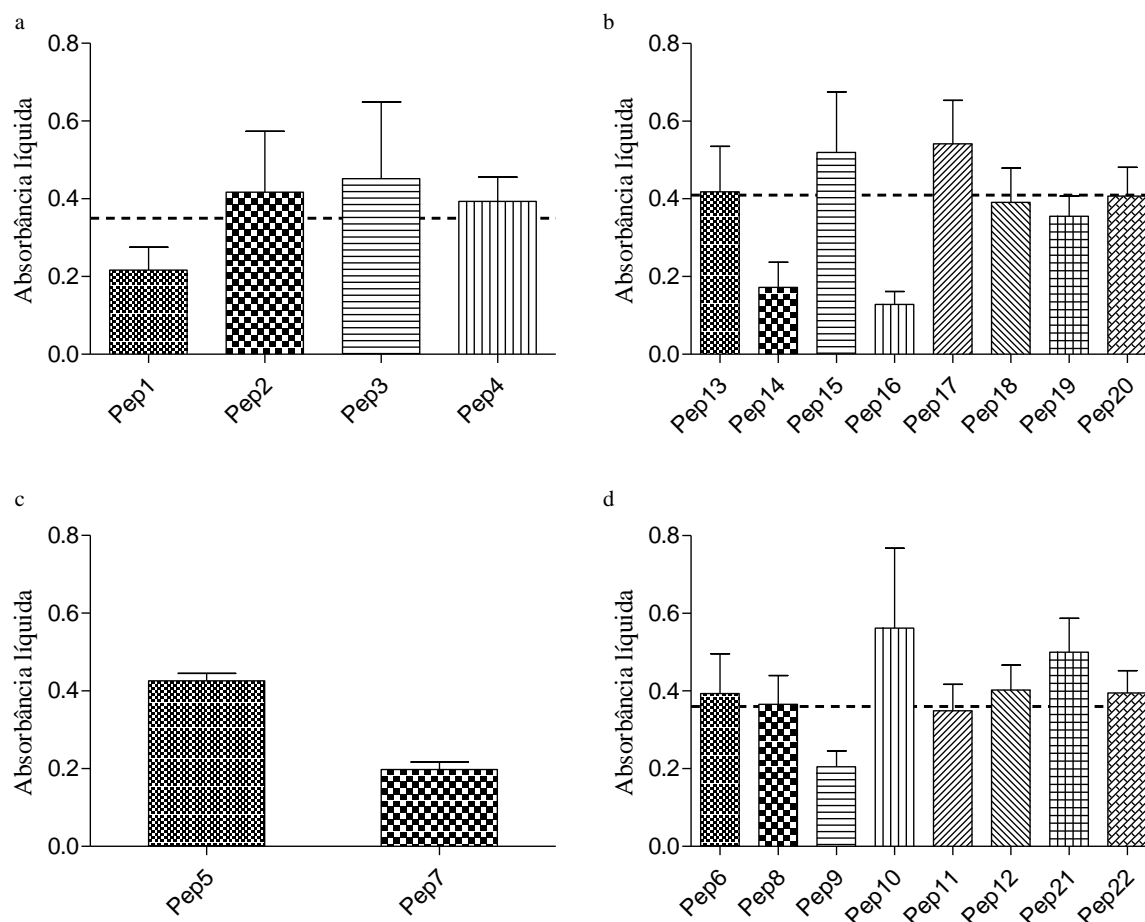


Figura 5: Sororreatividade observada no dia 49 pós infecção. Animais BALB/c foram infectados com 10 cistos de ME49, via intraperitoneal, e amostras de sangue foram coletadas em várias datas. Os resultados representados foram obtidos pela técnica de ELISA indireta, sensibilizando placas com os peptídeos e usando os soros do 49º dia pós-infecção. As linhas tracejadas representam o *cutoff* de cada grupo (elaborado especificamente para cada grupo visando destacar os peptídeos de melhor performance), sendo que os peptídeos cujas médias excederam o *cut-off* foram considerados candidatos para a vacinação. (a): Grupo SRS: os peptídeos 2, 3 e 4 foram selecionados para o grupo de imunização. (b): Grupo GRA: peptídeos 13, 15 e 17 foram selecionados para o grupo de imunização. (c): Grupo ROP: os únicos peptídeos sintetizados foram selecionados. (d): Grupo MIC: vários peptídeos passaram o valor de *cutoff* então selecionamos os peptídeos de maior disponibilidade, que são os peptídeos 8, 10 e 21.

Os peptídeos foram divididos em 5 grupos experimentais, sendo eles agregados de acordo com as organelas parasitárias das quais foram preditas, e 4 grupos controle, conforme descrito no material e métodos. Os peptídeos escolhidos e os grupos controles foram representados no quadro 1.

5.4 Imunização dos animais

5.4.1 Resposta imunológica específica aos peptídeos

Os 90 animais foram divididos em 9 grupos. Cada animal foi imunizado com 10 µg de cada peptídeo do seu grupo mais adjuvante e, no 45° dia pós primeira imunização, os grupos de animais foram divididos novamente, resultando em grupos de imunização com 5 animais cada. Metade dos animais foram usados nos ensaios para avaliação de morbidade, enquanto a outra metade foi usada no desafio letal.

O ensaio de morbidade foi feito infectando cada animal com 10 cistos via oral e foram colhidas amostras de sangue desses animais em vários momentos durante a imunização, antes e após a infecção. Para verificar se os peptídeos, juntamente com o adjuvante, seriam capazes de estimular os animais a produzir uma resposta imunológica específica aos antígenos vacinais, foram realizados ELISAs indiretos com os soros dos animais imunizados (antes do 45° dia) e infectados (após o 45° dia pós primeira imunização) em placas sensibilizadas com os peptídeos de cada grupo (figura 5). Os resultados demonstraram que todos os grupos foram capazes de induzir a produção de anticorpos, havendo variações significativas entre eles, sendo que o grupo ROP teve as menores médias em todas as datas quando comparado aos outros grupos, que se mantiveram em níveis semelhantes a partir do 15° ou 30° dia. O grupo MIC apresentou a maior produção na data de 15 dias entre todos grupos, atingindo o pico de produção no 15° dia e se mantendo em níveis semelhantes nas datas seguintes. O grupo SRS se manteve semelhante ao grupo MIC em todas datas, exceto no dia 15, quando sua produção foi significativamente menor. O grupo GRA não apresentou diferenças significativas com o grupo MIC. O grupo MIX teve a produção de anticorpos do dia 15 semelhante à produção do grupo ROP, sendo a produção das demais datas semelhantes ao grupo MIC.

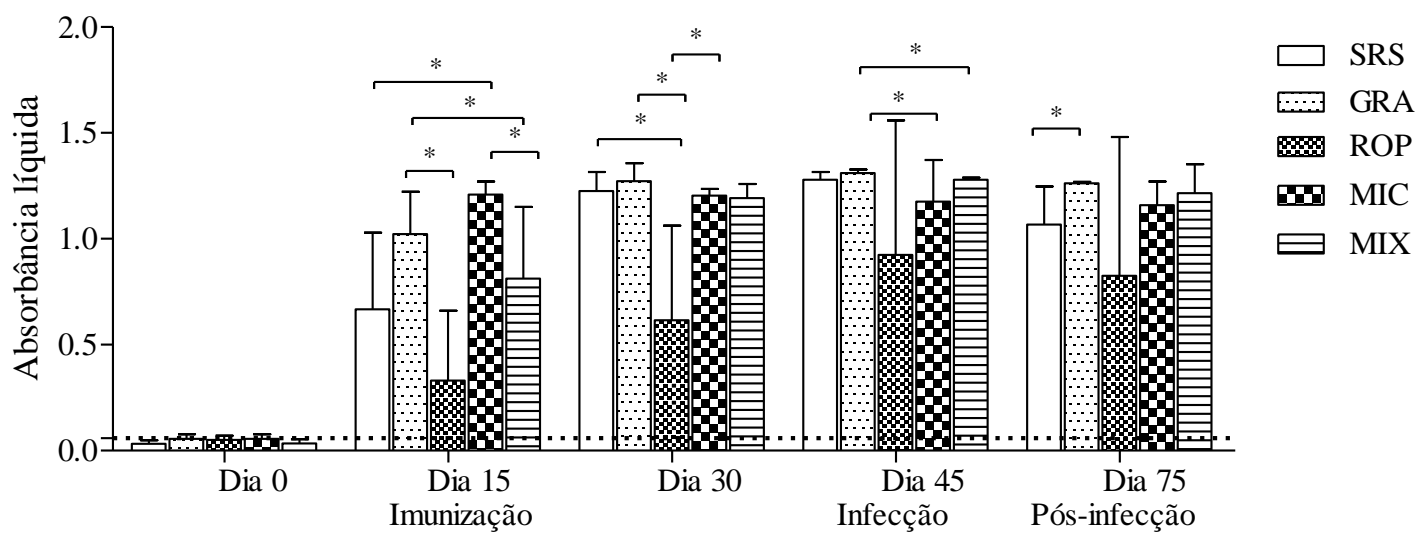


Figura 6: Produção de anticorpos específicos aos peptídeos por animais imunizados e infectados. Os animais foram imunizados três vezes com os peptídeos designados para cada grupo. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 15, 30, 45 e 75 pós primeira imunização e uma fração dos soros coletados dessas amostras foi utilizado para verificar a produção de anticorpos específicos contra os peptídeos usados na imunização através da técnica de ELISA indireto para detecção de IgG. Os resultados foram representados em média e desvio padrão, sendo o símbolo * indicativo de diferença significativamente diferente, quando submetidos ao teste *one-way annova*. A linha tracejada indica o *cutoff* da reação.

5.4.2 Resposta imunológica específica ao STAg

Visando verificar se a imunização com peptídeos seria capaz de gerar resposta específica contra o STAg, foram realizados experimentos de ELISA indireto sensibilizando placas com STAg e utilizando amostras de soro de animais imunizados, antes e depois da infecção. Os resultados obtidos foram representados na figura 6. Nenhum grupo apresentou reconhecimento ao STAg, exceto pelo grupo controle imunizado com STAg, cujas absorbâncias foram se elevando gradualmente até atingirem o pico, no dia 75. Somente após a infecção que foi verificado a produção de anticorpos específicos ao STAg (dia 75) e a produção apresentou intensidades distintas entre os grupos. Os grupos SRS, GRA, ROP e MIX apresentaram resultados significativamente diferentes dos grupos STAg e alúmen, enquanto os grupos MIC, BSA e PBS não foram significativamente diferentes de nenhum grupo.

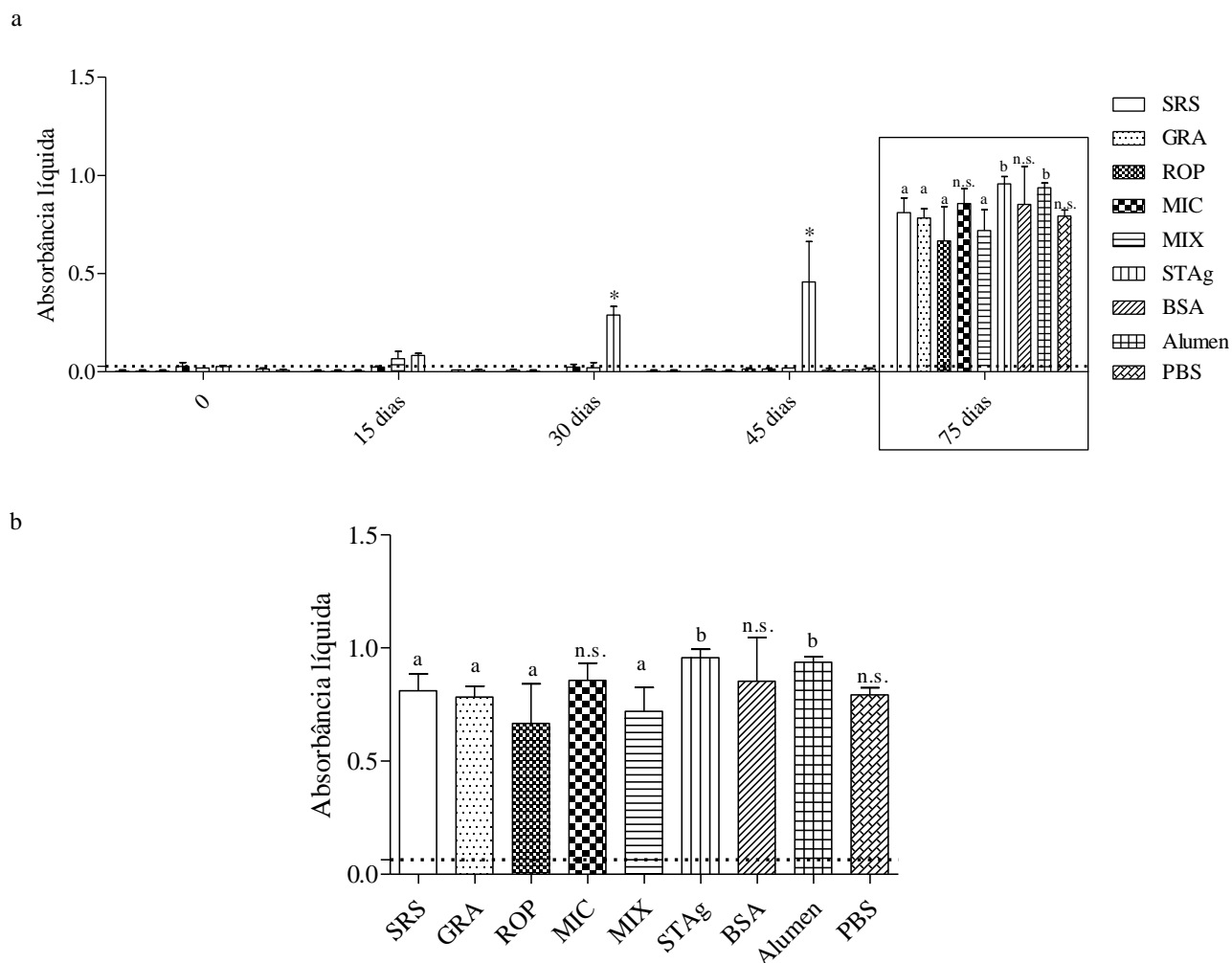


Figura 7: Produção de anticorpos específicos ao STAg por animais imunizados e infectados.

Amostras de sangue foram coletadas de animais imunizados, antes e após a infecção, e aplicados em placas de ELISA sensibilizadas com STAg. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e as letras colocadas no topo de cada barra indicam quais grupos foram diferentes (letra “a” indica resultados significativamente diferentes da letra “b”, enquanto a sigla “n.s.” significa que aquele grupo não foi estatisticamente diferente de nenhum outro grupo) pelo teste *one-way annova*. (a): amostras foram avaliadas nos dias 0, 15, 30, 45 e 75 pós primeira imunização, sendo que a infecção foi feita no dia 45. O STAg foi o único grupo que apresentou diferença estatisticamente significativa nas datas pré-infecção (anterior ao dia 45). (b): O dia 75 do gráfico anterior foi isolado para melhor visualização. A linha tracejada representa o *cutoff* da reação.

5.5 Produção de citocinas na fase aguda da infecção

Para avaliar se houve produção diferenciada de citocinas nos grupos imunizados, amostras de sangue de todos animais do ensaio de morbidade foram coletadas 3 dias após a infecção. Os soros coletados dessas amostras foram utilizados para verificar as concentrações das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF. Para mensurar as concentrações séricas dessas citocinas foi usada a técnica da citometria. As concentrações resultantes desse experimento demonstraram que os grupos tiveram diferentes perfis de produção de citocinas (figura 7). O grupo PBS se sobressaiu na produção de todas citocinas, exceto TNF. O grupo MIC teve comportamento semelhante ao do grupo controle STAg, com todos níveis de citocinas reduzidos. O grupo ROP apresentou quantidades medianas de citocinas, se aproximando mais das concentrações do grupo PBS que os outros grupos (experimentais ou controle), exceto pelas citocinas IL-2 e IL-4. Os grupos que mais produziram IL-2 e IL-4 foram os SRS e STAg, respectivamente.

A citocina que apresentou o resultado menos uniforme foi o TNF: os grupos ROP e MIX foram responsáveis pelos maiores níveis dessa citocina, produzindo significativamente mais que o grupo PBS. O grupo MIC apresentou a menor produção de TNF, ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

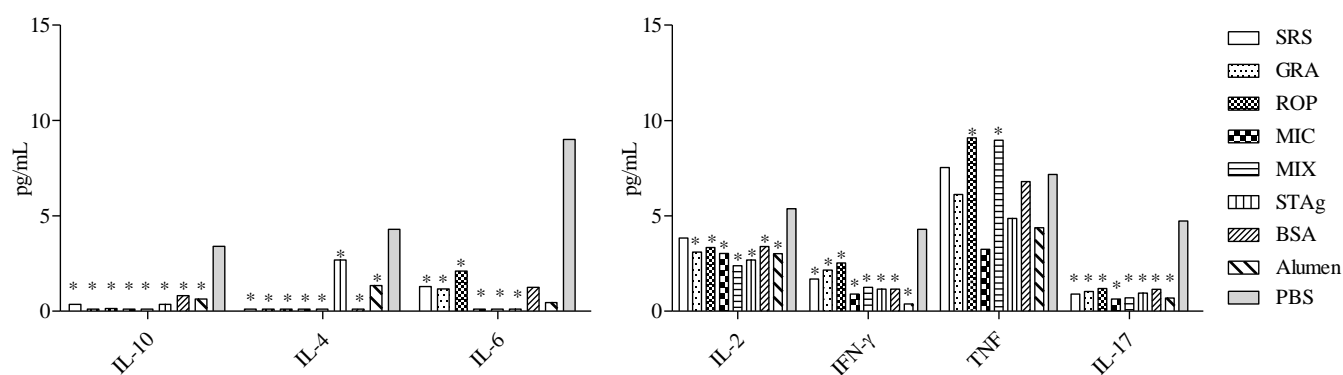


Figura 8: Expressão de citocinas por animais imunizados 3 dias após a infecção. As concentrações séricas das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF foram mensuradas através de citometria de fluxo, 3 dias após a infecção dos animais imunizados. Os níveis de citocinas obtidos foram representados como mediana. Os dados foram submetidos ao teste Mann-Whitney e os grupos que apresentaram diferença estatisticamente significantes ($p < 0,05$) do grupo controle PBS foram representados com o símbolo *.

5.6 Quantidade de DNA parasitário em animais infectados

Para avaliar a capacidade dos peptídeos de influenciar na quantidade de parasitos encistados no tecido cerebral do hospedeiro, os animais de todos grupos usados no ensaio de morbidade foram sacrificados 30 dias pós-infecção (75° dia pós-primeira imunização) e os cérebros coletados. Amostras dos cérebros foram usados para quantificar o DNA parasitário pela técnica de qPCR e esses dados foram representados na figura 8. Os resultados obtidos demonstraram que, juntamente com o grupo MIX, os animais imunizados com peptídeos ROP possuíam as maiores quantidades de DNA parasitário. Os grupos MIC e STAg, seguido pelo SRS, obtiveram as menores contagens de DNA parasitário, sendo significativamente menores que as contagens do grupo PBS. Os grupos GRA, MIX, BSA e alúmen tiveram quantidades intermediárias de DNA parasitário, não apresentando diferenças significativas com o grupo PBS.

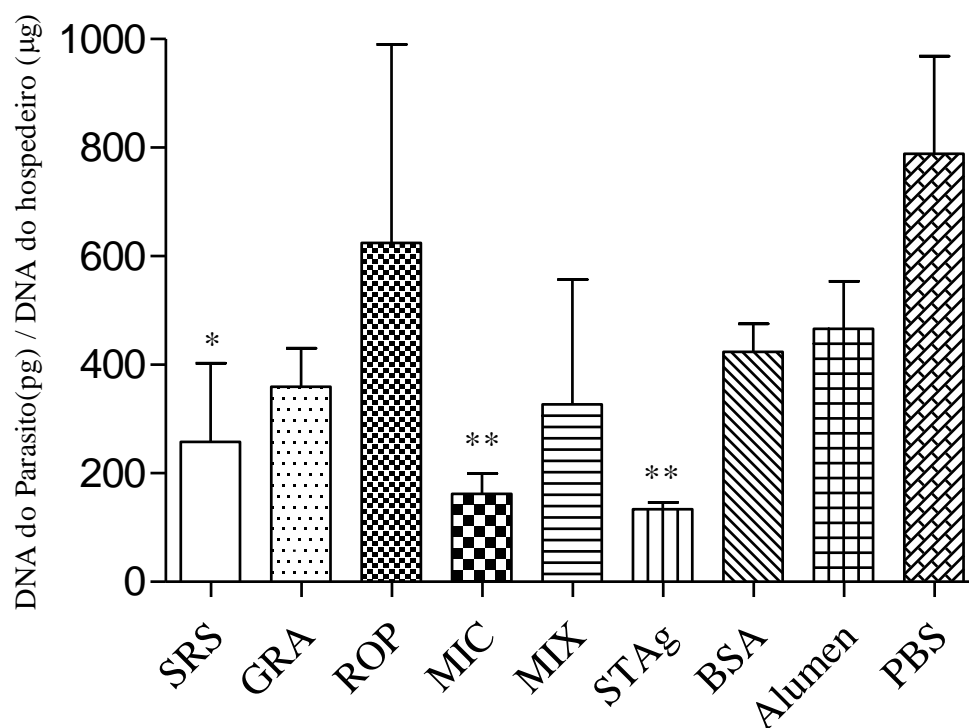


Figura 9: Quantidade de DNA parasitário encontrado no cérebro dos animais imunizados, 30 dias após infecção. Os animais usados no ensaio de morbilidade foram sacrificados 30 dias após a infecção. Seus cérebros foram coletados e o DNA parasitário foi detectado através da técnica de reação em cadeia pela polimerase quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR). Os resultados foram submetidos ao teste t não pareado e os grupos estatisticamente diferentes foram representados com os símbolos *, quando $p < 0,05$, e **, quando $p < 0,001$.

5.7 Desafio letal e curva de sobrevivência

Os 45 animais não utilizados no ensaio de morbilidade foram infectados com 40 cistos/animal da cepa ME49, via oral. Do 45º ao 75º dia pós primeira imunização, esses animais foram observados quanto à proteção induzida pelos peptídeos frente a um desafio letal, sendo que em nenhum momento foram colhidas amostras deles para não comprometer o experimento. Os resultados estão representados na figura 9. O grupo PBS foi o primeiro no qual todos animais morreram, sendo que o primeiro animal morreu no sétimo dia e o último no nono dia pós-infecção. O grupo STAg foi o único no qual houveram sobreviventes, com 40% dos animais sobrevivendo até o fim do experimento (30 dias pós-infecção). Todos os outros grupos, tanto controles como experimentais, não tiveram sobreviventes, variando os dias nos quais os animais morriam. O grupo SRS foi o grupo experimental cuja sobrevivência

foi mais prolongada, com o último óbito ocorrendo no dia 13. Os grupos MIC, GRA, ROP, MIX, BSA e alúmen tiveram óbitos entre os dias 9 e 11 pós-infecção, sendo que nenhum desses grupos teve sobreviventes.

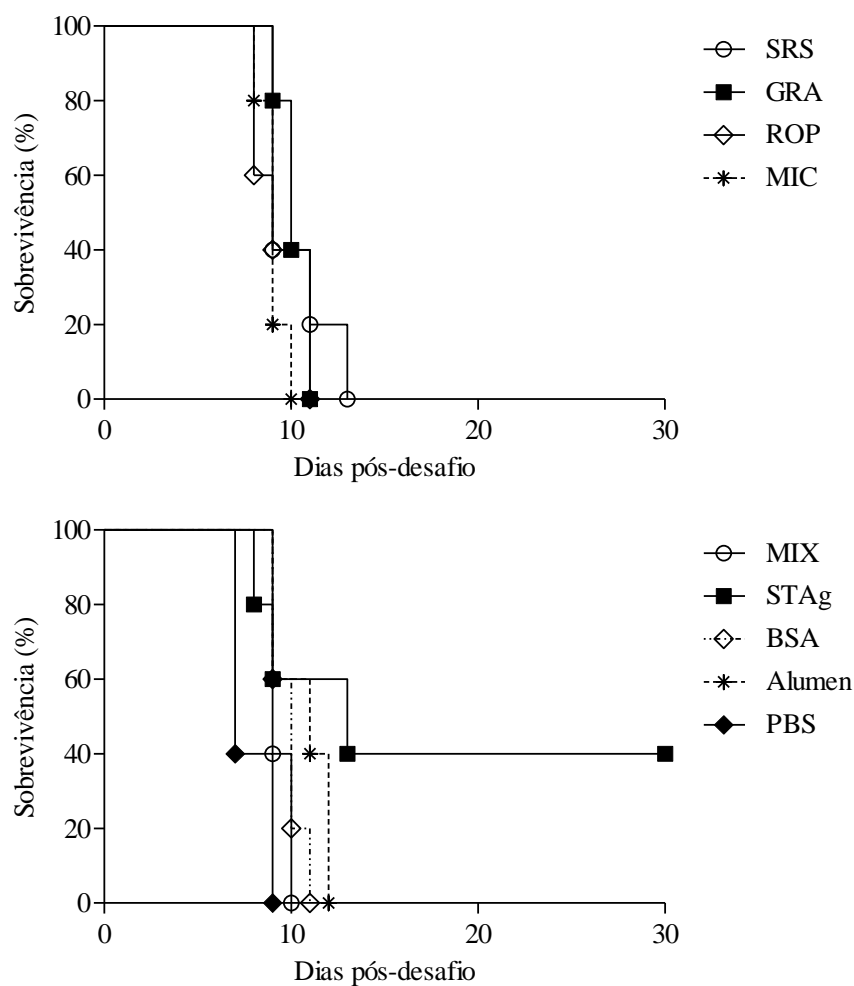


Figura 10: Desafio letal com 40 cistos por animal. Cada animal imunizado foi desafiado com 40 cistos no 45º dia pós primeira imunização. Os grupos eram compostos por 5 animais e ambos gráficos representam um mesmo experimento que, para melhor visualização, foi dividido em duas partes.

6 DISCUSSÃO

Desenvolver uma vacina efetiva contra *T. gondii* tem sido um desafio por um longo tempo e, durante as investigações feitas com este objetivo, várias ferramentas foram utilizadas (JONGERT et al., 2009). Uma das ferramentas mais recentemente empregadas, capaz de alcançar resultados significativos, é a utilização de ferramentas de bioinformática na predição de epítomos imunodominantes (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014; WANG, Y. et al., 2014). Dentre os diversos enfoques que tem sido utilizados, a predição de estruturas, funções proteicas e epítomos imunodominantes tem se destacado (ROMANO; GIUGNO; PULVIRENTI, 2011) e os resultados tem propiciado o esclarecimento de funções biológicas e novos antígenos com potencial vacinal (LU et al., 2015; ZHANG, N. Z. et al., 2014). No presente trabalho, foi realizada a predição *in silico* de 22 peptídeos, levando em conta os *scores* de predição para epítomos de célula B. Neste sentido, 22 peptídeos foram triados, utilizando-se amostras de soros de animais infectados, e os resultados foram utilizados para se analisar o perfil de reconhecimento de cada peptídeo pelos soros dos animais infectados. A partir dos valores obtidos nesta triagem, os peptídeos que apresentaram maiores graus de reatividades foram selecionados para serem utilizados em protocolos de imunização em diferentes grupos de camundongos C57BL/6. A partir desses grupos, foi possível mensurar aspectos da resposta imunológica humoral e celular dos animais, assim como a proteção induzida no experimento de desafio.

A investigação de proteínas, ou fragmentos delas, na busca por antígenos vacinais é uma ferramenta extensivamente utilizada (CUPPARI et al., 2008; EL BISSATI et al., 2014; PETERSEN et al., 1998; TAN et al., 2011). Escolher a proteína alvo é o primeiro passo para a pesquisa de antígenos vacinais. Vários trabalhos publicados até hoje demonstraram que utilizar proteínas imunodominantes (ou porções derivadas delas) do *T. gondii* para imunização resulta em diferentes níveis de proteção. Zhang e colaboradores (2013) investigaram a capacidade de proteínas recombinantes de ROP 5 e SAG (proteína de superfície) 1, verificando que a imunização aumenta significativamente a sobrevivência de animais desafiados. Fang e colaboradores (2012) encontraram resultados ainda mais expressivos usando proteínas recombinantes derivadas de SAG 1 e MIC 3. Observando esses e outros resultados (PENG et al., 2009; PETERSEN et al., 1998), no presente trabalho foi

realizado um processo de predição, baseando-se em *scores* de célula B, tendo sido sintetizado 22 peptídeos derivados de 4 famílias proteicas de diferentes estruturas e organelas importantes no processo de invasão e replicação do *T. gondii* no interior da célula hospedeiras, a saber: SRS, GRA, ROP e MIC.

Os 22 peptídeos foram triados usando-se amostras de soros de animais experimentalmente infectados e os resultados demonstraram que todos foram reconhecidos pelos anticorpos presentes nos soros, apresentando potencial como ferramentas para diagnóstico. Os resultados da triagem foram utilizados ainda para selecionar os peptídeos com melhores reconhecimentos para os grupos de imunização, uma vez que os peptídeos com maiores níveis de reconhecimento teriam uma maior chance de representar região mais imunodominantes das proteínas selecionadas, tornando-se candidatos potenciais para investigações de antígenos vacinais.

Uma vez que os peptídeos para imunização foram selecionados, o protocolo de imunização foi iniciado e, antes e depois da infecção experimental, amostras de sangue foram coletadas dos camundongos com o intuito de verificar a produção de anticorpos específicos aos peptídeos usados na imunização e específicos ao STAg. Foi observado que todos grupos de imunização foram capazes de estimular a produção de anticorpos (IgG) específicos aos peptídeos em níveis significativos a partir do 15º dia pós imunização. Observou-se variações entre os grupos, com pior desempenho para ROP nos dias 15 e 30, mas mesmo esses resultados foram significativamente diferentes dos resultados do dia 0 ou do negativo. Zhang e colaboradores (2015) também investigaram peptídeos preditos *in silico* e quimicamente sintetizados e verificaram que houve um alto reconhecimento de 2 dos 3 peptídeos utilizados. Cuppari e colaboradores (2008) chegaram a resultados similares utilizando-se a proteína inibidora de protease 1 do *T. gondii* (TgPI-1). No presente trabalho, os dados obtidos comprovam que as ferramentas de bioinformática utilizadas foram apropriadas para a predição de epítomos.

No passo seguinte, amostras de sangue coletadas foram verificadas quanto à produção de anticorpos específicos contra STAg. Os resultados indicam que os animais, enquanto somente imunizados, não foram capazes de reconhecer o antígeno total do parasito. Tais resultados foram divergentes de outros disponíveis na literatura. Fang e colaboradores (2012) verificaram que animais imunizados com proteínas recombinantes derivadas de SAG 1 e

MIC 3 são capazes de produzir anticorpos que reconhecem os antígenos do parasito, nas suas formas nativas, antes da infecção. A capacidade de reconhecimento dos animais imunizados pode ter sido afetada pelas diferenças de conformação e tamanho entre os peptídeos usados na imunização e o antígeno total. O STAg é composto por todas estruturas do parasito, submetido a ciclos de sonicação, resfriamento extremo e aquecimento (MINEO et al., 1980). Contrastando com o STAg, os peptídeos possuem apenas 15 resíduos de aminoácidos, cuja epítomos podem ser considerados lineares e não conformacional, sendo, então, provável que as proteínas do parasito assumam conformações distintas das observadas *in vivo*, o que possivelmente resulta na ocultação de epítomos semelhantes aos peptídeos selecionados.

Durante a infecção pelo *T. gondii*, há vários fatores que são importantes para que o animal infectado sobreviva à fase aguda e que servem como indicadores para o prognóstico da infecção. Um deles é a produção de citocinas pró-inflamatórias (perfil T *helper* 1), especialmente IFN- γ e IL-2 (HUNTER; SUBAUSTE; REMINGTON, 1994; TAN et al., 2011; TORRES-MORALES et al., 2014). No presente trabalho, a produção de citocinas foi verificada durante a fase aguda (72 horas após a infecção) e os resultados demonstraram que a imunização, seja com os peptídeos experimentais ou com os elementos dos grupos controle, geraram níveis diversos e significativamente menores quando comparados com os níveis obtidos pelo grupo PBS. Essa diminuição ocorreu tanto em citocinas do perfil Th1 quanto do Th2. Estes resultados se contrapõem aos encontrados por diversos grupos que utilizaram, ao invés de peptídeos sintéticos, proteínas recombinantes. Neste contexto, Tan e colaboradores (2011) observaram que a imunização com proteínas recombinantes derivadas da proteína TgNTPASE-II (*nucleoside triphosphate hydrolase-II*) estimulou o aumento de níveis de citocinas dos perfis Th1 e Th2. MENG et al. (2013) e MIN et al. (2012) encontraram IFN- γ aumentado em animais imunizados com proteínas recombinantes derivadas de GRA 4 e GRA 7, respectivamente, mas não observaram nenhuma alteração nos níveis de IL-4 e IL-10.

A variação mais significativa foi vista na citocina TNF. Ela pertence ao perfil pró-inflamatório Th1 e é uma das responsáveis pela manutenção do estado inflamatório durante a infecção por *T. gondii*, essencial para a redução da parasitemia durante a fase aguda e para manter a pressão imunológica nos cistos, induzindo este processo infeccioso à cronificação. Mas níveis exacerbados dessa citocina estão associados com mau prognóstico da doença: Mordue e colaboradores (2001) realizaram estudos buscando elucidar possíveis mecanismos

da letalidade provocada pela infecção por *T. gondii* em murinos, e chegaram à conclusão que parte significativa das apoptoses celulares (20%) eram provocadas pelo estímulo exacerbado de TNF. Hashimi e colaboradores (2014) verificaram que os níveis de TNF se encontram aumentados na placenta humana durante o aborto causado pela toxoplasmose em humanos. No presente trabalho, foram encontrados níveis mais elevados de TNF nos grupos ROP, MIX e PBS, os quais tiveram as maiores contagens de cistos cerebrais e sobreviveram por menos tempo após o desafio provando que, embora a citocina TNF seja essencial para o controle da infecção do *T. gondii*, o excesso dela está associado ao agravamento da doença.

Apesar das variações significativas observadas entre os grupos, um aspecto foi comum entre o presente trabalho e outros já publicados: a predominância dos níveis de citocinas pró-inflamatórias em relação às anti-inflamatórias. A imunização influenciou a produção de citocinas, diminuindo os níveis em quase todos os casos, mas favorecendo a relação entre pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A diminuição das concentrações séricas de citocinas pode resultar em diminuição dos danos infligidos ao hospedeiro pela resposta imunológica, enquanto a manutenção da proporção entre citocinas pró e anti inflamatórias assegura o combate satisfatório à infecção.

A toxoplasmose é uma doença composta, essencialmente, por duas fases. A primeira fase é a aguda, na qual os parasitos podem ser encontrados no sangue e tecidos do hospedeiro na sua forma móvel. A segunda fase da infecção é a crônica e ocorre após o sistema imunológico do hospedeiro reduzir a parasitemia a taxas mínimas, com parte dos parasitos formando cistos nos tecidos. Uma vez que o sistema imunológico do hospedeiro apresente qualquer deficiência, temporária ou não, a parasitemia pode se elevar novamente com parasitos originados do cisto tecidual (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). A cronicidade da infecção é um aspecto importante da doença, já que a reativação do parasito representa um perigo, especialmente para indivíduos imunossuprimidos (JONES; PARISE; FIORE, 2014). Para verificar se os peptídeos utilizados no presente trabalho seriam capazes de influenciar na carga parasitária durante a infecção crônica, grupos de animais imunizados foram infectados com uma carga subletal de cistos de *T. gondii*. Após 30 dias de infecção, amostras dos cérebros desses animais foram coletadas e o DNA parasitário delas foi quantificado. Os resultados obtidos demonstraram que os grupos de peptídeos SRS e MIC, juntamente com o adjuvante, são capazes de induzir intensa diminuição do DNA parasitário, quando

comparados com o grupo de animais não imunizados. Ao utilizar subunidades de proteínas do parasito, resultados semelhantes também foram observados por outros autores: Zhang e colaboradores (2015) imunizaram animais com peptídeos derivados de proteínas do *T. gondii* e observaram redução 30-40% no número de parasitos. Wang e colaboradores (2013) encontraram também que a imunização com TgPDI (*Protein Disulfide Isomerase*) resultou em redução significativa no número de parasitos no cérebro e fígado dos animais usados. Nenhum desses trabalhos alcançou a redução observada nos grupos SRS e MIC do presente trabalho, com aproximadamente 60% e 80% de redução da quantidade de DNA parasitária. Essa redução pode ter sido causada devido à escolha, para antígenos vacinais, de diferentes peptídeos derivados de proteínas envolvidas no processo de invasão das células do hospedeiro. Proteínas relacionadas ao SAG são importantes nos estágios iniciais da invasão, no reconhecimento da célula do hospedeiro pelo parasito, e as proteínas do MIC exercem sua função logo em seguida, sendo secretadas pelo parasito e promovendo a adesão entre parasito e hospedeiro (SIBLEY, 2011). As reduções observadas nos grupos SRS e MIC podem ser fruto da neutralização dessas proteínas, resultando na prevenção da adesão e invasão das células hospedeiras pelo parasito.

A infecção por *T. gondii* na espécie humana normalmente é assintomática ou não resulta em consequências graves, salvo os casos de indivíduos imunossuprimidos ou gestantes (CONTIERO-TONINATO et al., 2014). Rebanhos bovinos, ovinos e caprinos também podem ser parasitados pelo *T. gondii*, resultando em perdas de gestações, animais adultos e intensificando a transmissão do parasito através de carne malcozida, gerando grande prejuízo social e econômico (INNES et al., 2009; TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). Visto que a imunização foi capaz de alterar a produção de citocinas e alguns grupos tiveram redução na quantidade de cistos, o passo seguinte foi testar se animais imunizados seriam capazes de resistir a infecção com doses letais do parasito. Para isso, os animais imunizados foram desafiados com uma carga letal de cistos de *T. gondii*. Os resultados indicam que nenhum grupo de peptídeos foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais infectados ou de protegê-los até o 30º dia pós-infecção. Resultados semelhantes foram encontrados em diversos outros trabalhos: Chen e colaboradores (2014) imunizaram animais com uma proteína recombinante derivada de TgCDPK1 (*T. gondii* *calcium-dependent protein kinase 1*) e, apesar de encontrar resultados de produção

diferenciada de citocinas, os animais imunizados também não sobreviveram até o fim do experimento (30º dia). Zheng e colaboradores (2013), Tan e colaboradores (2011), Qu e colaboradores (2013), entre outros grupos, chegaram a resultados semelhantes, nos quais modelos experimentais murinos foram imunizados com diferentes proteínas recombinantes ou peptídeos derivados das proteínas dos parasitos. Após a infecção, apresentaram mudanças na produção de citocinas e, em alguns casos, apresentaram também decréscimo da carga parasitária, mas em nenhum deles o antígeno vacinal foi capaz de garantir a sobrevivência do hospedeiro. Um ponto em comum entre o presente trabalho e os outros listados é que a imunização foi feita de forma invasiva, subcutânea ou intramuscular, o que acabou estimulando de forma ineficiente a imunidade das mucosas. Zhang e colaboradores (2015) trataram dessa temática em seu trabalho: utilizando uma proposta de predição de epítomos semelhante à usada no presente trabalho, gerando peptídeos também com números de aminoácidos reduzidos, observaram um aumento de sobrevida que superou a duração do desafio experimental. A maior diferença metodológica entre ambos trabalhos foi a forma de imunização, sendo que no trabalho de Zhang os animais foram imunizados através da via intranasal e, apesar da redução de carga parasitária não ter sido tão expressiva quanto a obtida no presente trabalho, parte dos animais do grupo experimental foi capaz de sobreviver ao desafio letal. Isso indica que modificações no protocolo de imunização poderiam melhorar a sobrevivência dos animais imunizados com os grupos de peptídeos descritos nesse trabalho, assim como a utilização de outros adjuvantes.

7 CONCLUSÕES

- Os peptídeos sintetizados apresentaram potencial como marcadores de infecção, pois todos os 22 peptídeos foram reconhecidos pelo soro de animais infectados por *T. gondii*.
- A imunização com os peptídeos dos grupos SRS e MIC levou a alterações na produção de citocinas e diminuição da carga parasitária, evidenciando que eles apresentam potencial para serem utilizados como antígenos vacinais.
- Os peptídeos dos grupos SRS e MIC apresentaram resultados mais significativos, indicando claramente que estes peptídeos possuem capacidade de induzir redução de carga parasitária.
- Estudos adicionais são necessários para a definição do mecanismo responsável pela diminuição do número de cistos dos animais imunizados com os peptídeos derivados das proteínas SRS e MIC frente o desafio experimental.

REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, p. 162-170, 2005.
- ANDRADE, W. A. et al. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host & Microbe**, v. 13, p. 42-53, 2013.
- ANGUS, C. W. et al. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 317-324, 2000.
- AZZOUZ, S. et al. *Toxoplasma gondii*: identification and immune response against a group of proteins involved in cellular invasion. **Experimental Parasitology**, v. 130, p. 63-68, 2012.
- BACCI, C. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. **International journal of food microbiology**, v. 202, p. 54-56, 2015.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.
- BICHET, M. et al. The toxoplasma-host cell junction is anchored to the cell cortex to sustain parasite invasive force. **BioMed Central Biology**, v. 12, p. 773, 2014.
- BIRADAR, S. S. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens in India by GRA6 gene sequence analysis. **Acta Parasitologica**, v. 59, p. 666-674, 2014.
- BOJAR, I.; SZYMANSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 17, p. 209-214, 2010.
- BOOTHROYD, J. C. Expansion of host range as a driving force in the evolution of *Toxoplasma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 179-184, 2009.
- BOURDIN, C. et al. PCR-based detection of *Toxoplasma gondii* DNA in blood and ocular samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, p. 3987-3991, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUTLER, N. S.; HARRIS, T. H.; BLADER, I. J. Regulation of immunopathogenesis during Plasmodium and Toxoplasma infections: more parallels than distinctions? **Trends in Parasitology**, v. 29, p. 593-602, 2013.

CAMARA, J. T.; SILVA, M. G.; CASTRO, A. M. Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women in two reference centers in a city in Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 37, p. 64-70, 2015.

CARELLOS, E. V. et al. Adverse socioeconomic conditions and oocyst-related factors are associated with congenital toxoplasmosis in a population-based study in Minas Gerais, Brazil. **PloS One**, v. 9, p. e88588, 2014.

CHEN, J. et al. *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 42-48, 2014.

CIMINO, R. O. et al. Identification of human intestinal parasites affecting an asymptomatic peri-urban Argentinian population using multi-parallel quantitative real-time polymerase chain reaction. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 380, 2015.

COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al. Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1194-1198, 2002.

CONTIERO-TONINATO, A. P. et al. Toxoplasmosis: an examination of knowledge among health professionals and pregnant women in a municipality of the State of Parana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 198-203, 2014.

COOK, A. J. et al. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. **British Medicine Journal**, v. 321, p. 142-147, 2000.

CORREA, D. et al. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 651-660, 2007.

CORREIA, E. L. et al. Prevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* in sheep in the State of Paraíba, Northeastern Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 24, p. 383-386, 2015.

CUPPARI, A. F. et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. **Vaccine**, v. 26, p. 5040-5045, 2008.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 22, 2014.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 1129-1137, 2007.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 569-588, 1998.

DLUGONSKA, H. Toxoplasma rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, v. 2008, p. 632424, 2008.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, p. 467-475, 2008.

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**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUNAY, I. R.; SIBLEY, L. D. Monocytes mediate mucosal immunity to *Toxoplasma gondii*. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 461-466, 2010.

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, p. 793-813, 2012.

DUPONT, C. D. et al. Parasite fate and involvement of infected cells in the induction of CD4+ and CD8+ T cell responses to *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. e1004047, 2014.

EGAN, C. E.; COHEN, S. B.; DENKERS, E. Y. Insights into inflammatory bowel disease using *Toxoplasma gondii* as an infectious trigger. **Immunology and Cell Biology**, v. 90, p. 668-675, 2012.

EL-HASHIMI, W. K. et al. The role of cytokines, TNF- α , IL-6 and pregnancy associated hormones in *Toxoplasma gondii* induced abortion. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, p. 7, 2014.

EL BISSATI, K. et al. Effectiveness of a novel immunogenic nanoparticle platform for Toxoplasma peptide vaccine in HLA transgenic mice. **Vaccine**, v. 32, p. 3243-3248, 2014.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 58-85, 2013.

FANG, R. et al. Evaluation of immune responses induced by SAG1 and MIC3 vaccine cocktails against *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 187, p. 140-146, 2012.

FEITOSA, T. F. et al. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in slaughtered pigs from Northeast, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 202, p. 305-309, 2014.

FERNANDEZ-SABE, N. et al. Risk factors, clinical features, and outcomes of toxoplasmosis in solid-organ transplant recipients: a matched case-control study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, p. 355-361, 2012.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host & Microbe**, v. 15, p. 132-138, 2014.

GEBREMEDHIN, E. Z. et al. First report on seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* infection in pigs in Central Ethiopia. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 59, 2015.

GOODSWEN, S. J.; KENNEDY, P. J.; ELLIS, J. T. Enhancing in silico protein-based vaccine discovery for eukaryotic pathogens using predicted peptide-MHC binding and peptide conservation scores. **PloS One**, v. 9, p. e115745, 2014.

GRAS, L. et al. Duration of the IgM response in women acquiring *Toxoplasma gondii* during pregnancy: implications for clinical practice and cross-sectional incidence studies. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 541-548, 2004.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, p. 84-105, 2003.

HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, p. 659-688, table of contents, 2001.

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

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; REMINGTON, J. S. The role of cytokines in toxoplasmosis. **Biotherapy**, v. 7, p. 237-247, 1994.

INNES, E. A. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, p. 1-7, 2010.

INNES, E. A. et al. Veterinary vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 246-251, 2009.

JACOB, J.; LORBER, B. Diseases Transmitted by Man's Best Friend: The Dog. **Microbiology Spectrum**, v. 3, 2015.

JONES, J. L.; DUBEY, J. P. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical infectious diseases**, v. 55, p. 845-851, 2012.

JONES, J. L.; PARISE, M. E.; FIORE, A. E. Neglected parasitic infections in the United States: toxoplasmosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 794-799, 2014.

JONGERT, E. et al. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 252-266, 2009.

KUMAR, H. et al. In silico identification of genetically attenuated vaccine candidate genes for *Plasmodium* liver stage. **Infection, Genetics and Evolution**, 2015.

LARSEN, J. E.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, v. 2, p. 2, 2006.

LIU, K. Y. et al. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, p. 2363-2368, 2006.

LU, G. et al. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 146, p. 66-72, 2015.

MARCOLINO, P. T. et al. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 384-389, 2000.

MCLEOD, R. et al. Why prevent, diagnose and treat congenital toxoplasmosis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 320-344, 2009.

MENG, M. et al. DNA prime and peptide boost immunization protocol encoding the *Toxoplasma gondii* GRA4 induces strong protective immunity in BALB/c mice. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 13, p. 494, 2013.

MILLER, C. M. et al. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, p. 23-39, 2009.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A Simple Salting out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215-1215, 1988.

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, p. 5631-5636, 2012.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 27, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R. et al. **Pesquisa na área biomédia: do planejamento à publicação**. Uberlândia: EDUFU, 2005. 273

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MORDUE, D. G. et al. Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines. **Journal of Immunology**, v. 167, p. 4574-4584, 2001.

MOTA, C. M. et al. Fluorescent ester dye-based assays for the in vitro measurement of *Neospora caninum* proliferation. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 14-19, 2014.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M. M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 269-285, 2011.

OKADA, T. et al. A novel dense granule protein, GRA22, is involved in regulating parasite egress in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 189, p. 5-13, 2013.

PALMEIRA, P. et al. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. **Clinical & Developmental Immunology**, v. 2012, p. 985646, 2012.

PENG, G. H. et al. *Toxoplasma gondii* microneme protein 6 (MIC6) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 6570-6574, 2009.

PETERSEN, E. et al. Immunization with E. coli produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 16, p. 1283-1289, 1998.

RAVINDRAN, S.; BOOTHROYD, J. C. Secretion of proteins into host cells by Apicomplexan parasites. **Traffic**, v. 9, p. 647-656, 2008.

REMINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 941-945, 2004.

ROBERT-GANGNEUX, F. It is not only the cat that did it: how to prevent and treat congenital toxoplasmosis. **The Journal of Infection**, v. 68 Suppl 1, p. S125-133, 2014.

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

ROMANO, P.; GIUGNO, R.; PULVIRENTI, A. Tools and collaborative environments for bioinformatics research. **Briefings in Bioinformatics**, v. 12, p. 549-561, 2011.

SANECKA, A.; FRICKEL, E. M. Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*. **Virulence**, v. 3, p. 678-689, 2012.

SANTANA, S. S. et al. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v. 143, p. 193-201, 2012.

SCHLUTER, D. et al. Animals are key to human toxoplasmosis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, p. 917-929, 2014.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, p. 504-512, 2006.

SIBLEY, L. D. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 72-91, 2011.

SIEGEL, S. E. et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. **Blood**, v. 37, p. 388-394, 1971.

SROKA, S. et al. Prevalence and risk factors of toxoplasmosis among pregnant women in Fortaleza, Northeastern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 528-533, 2010.

STURGE, C. R.; YAROVINSKY, F. Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 3090-3097, 2014.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 137-142, 2006.

SWITAJ, K. et al. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 170-176, 2005.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.

TAN, F. et al. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, v. 29, p. 2742-2748, 2011.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 364-369, 2009.

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

TORGERSON, P. R.; MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 91, p. 501-508, 2013.

TORRES-MORALES, E. et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, p. 315-322, 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, p. 410-420, 2011.

VERMA, R.; KHANNA, P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: A global challenge. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, p. 291-293, 2013.

WANG, H. L. et al. *Toxoplasma gondii* protein disulfide isomerase (TgPDI) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. **PloS One**, v. 8, p. e70884, 2013.

WANG, Y. et al. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 474, 2014.

XU, Y. et al. Evaluation of immuno-efficacy of a novel DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 38 (TgROP38) against chronic toxoplasmosis in a murine model. **BioMed Central Infectious Diseases**, v. 14, p. 525, 2014.

YUAN, Z. G. et al. Protective immunity induced by *Toxoplasma gondii* rhoptry protein 16 against toxoplasmosis in mice. **Clinical and Vaccine Immunology : CVI**, v. 18, p. 119-124, 2011.

ZHANG, N. Z. et al. Identification and bioinformatic analysis of a putative calcium-dependent protein kinase (CDPK6) from *Toxoplasma gondii*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 10669-10677, 2014.

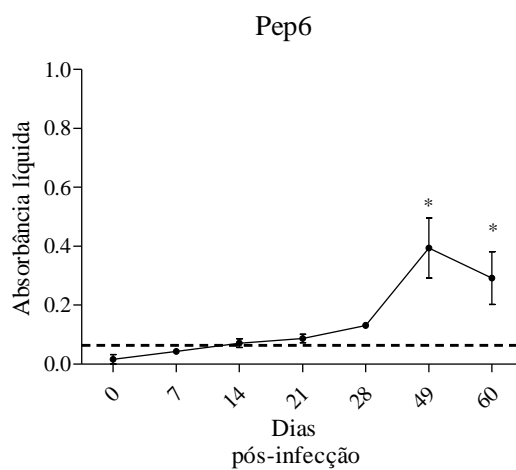
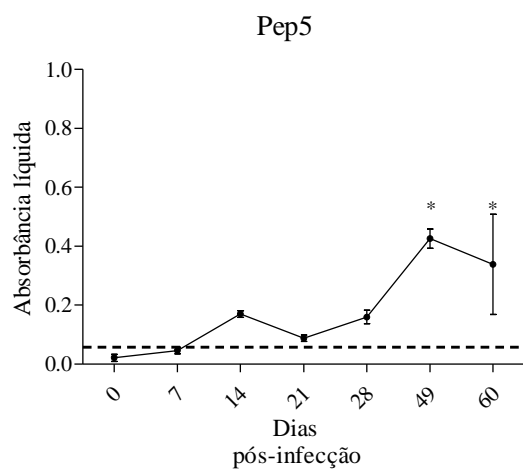
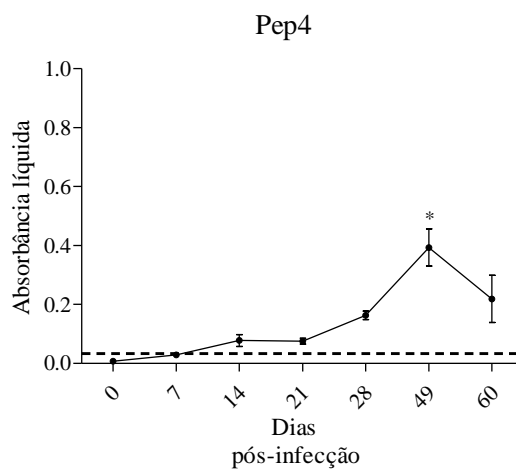
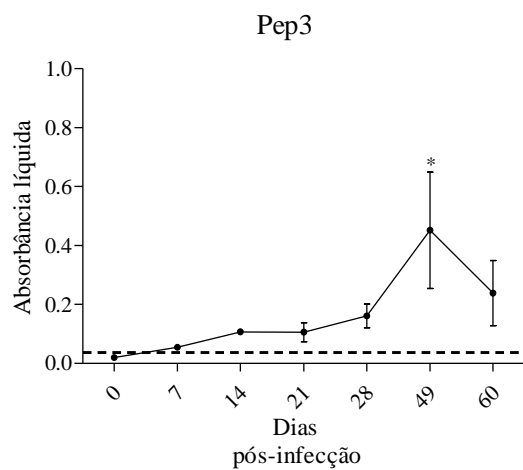
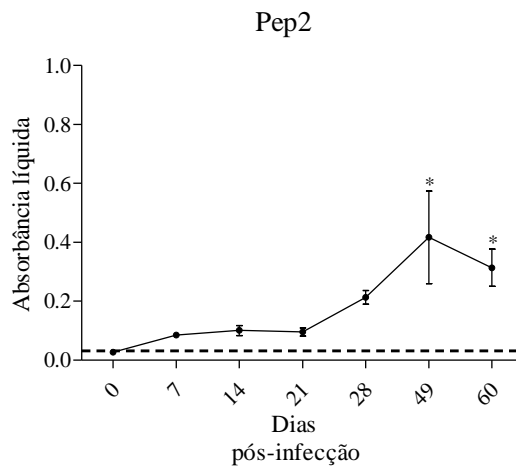
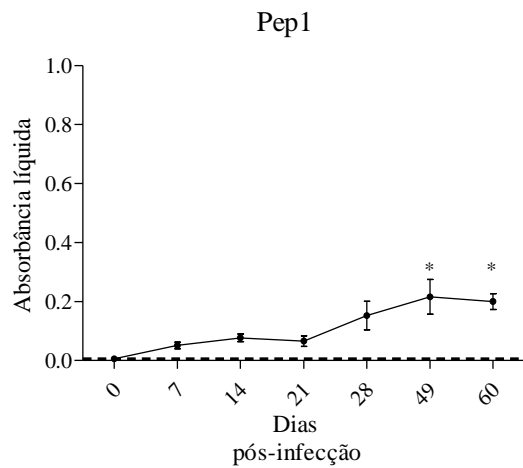
ZHANG, T. E. et al. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 15, 2015a.

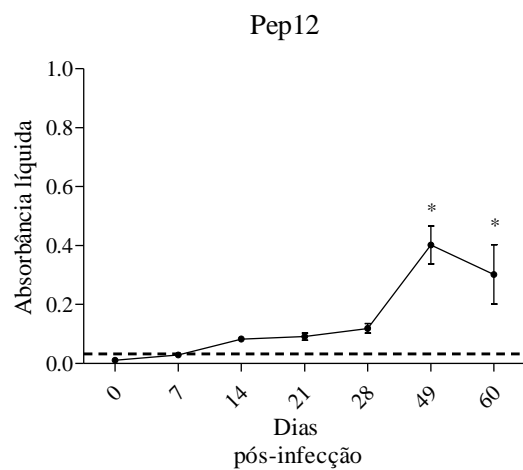
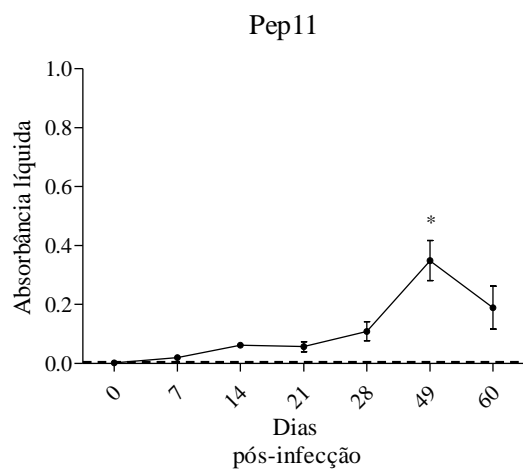
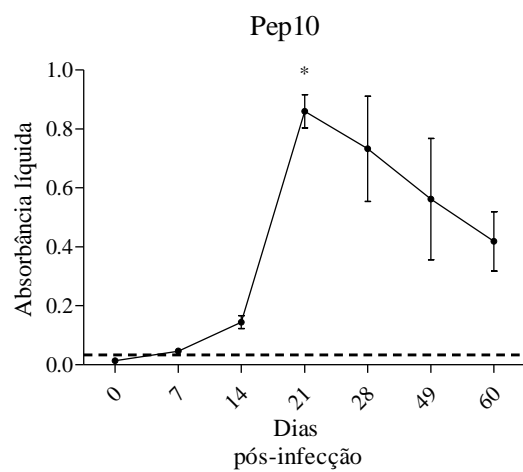
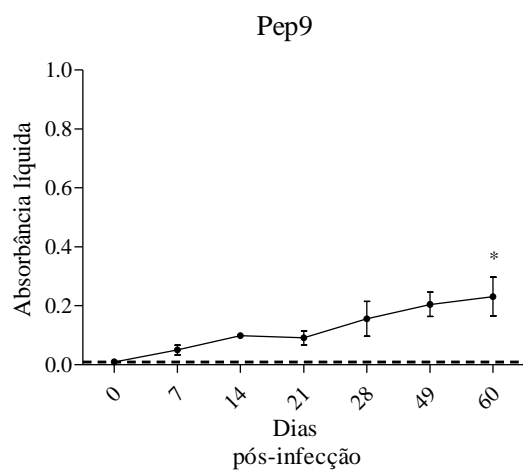
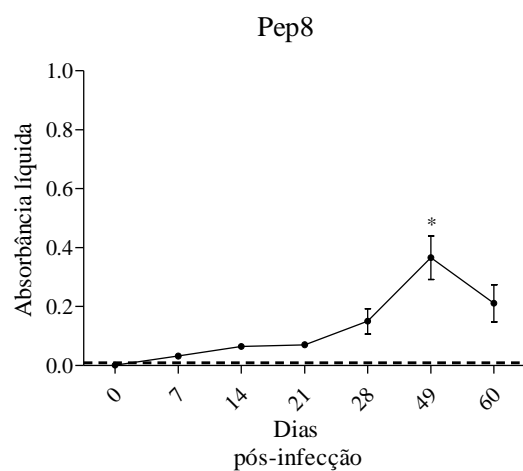
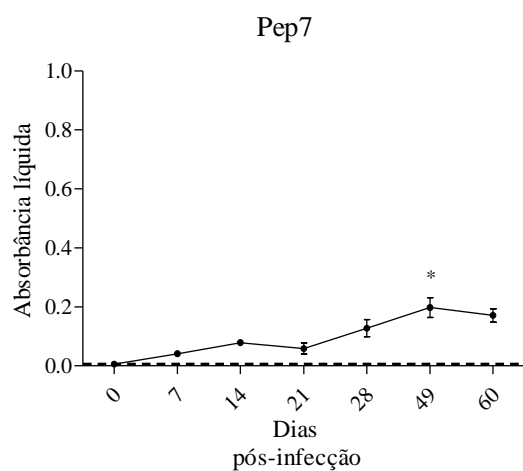
ZHENG, B. et al. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, v. 31, p. 4578-4584, 2013.

ZIMMERMANN, S. et al. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 1840-1847, 2006.

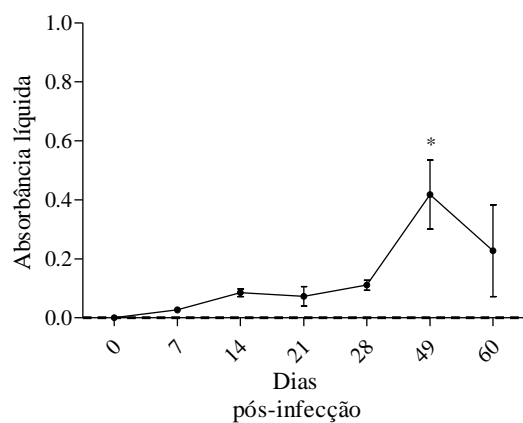
ZORGI, N. E. et al. Humoral responses and immune protection in mice immunized with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. **Immunology Letters**, v. 138, p. 187-196, 2011.

ANEXOS

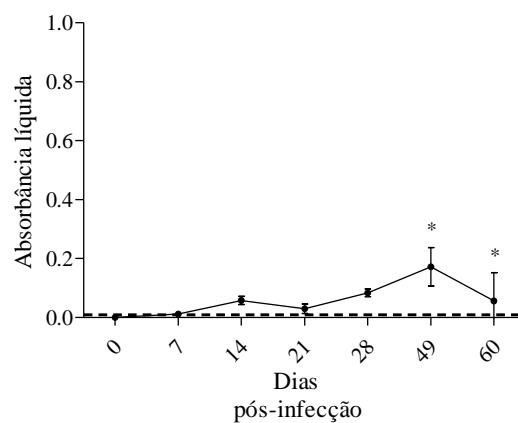




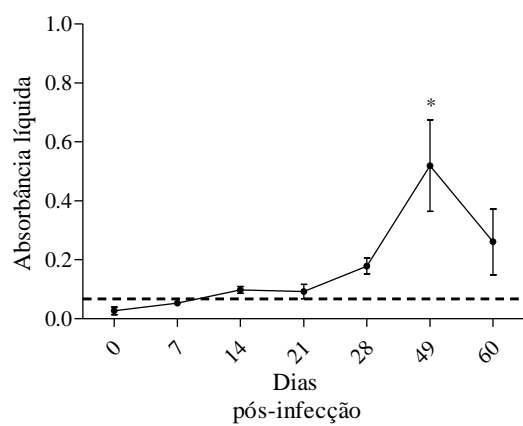
Pep13



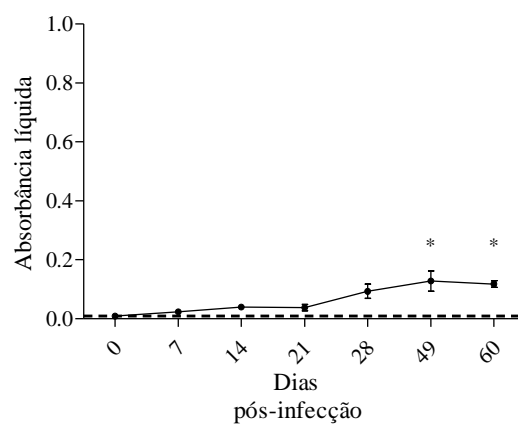
Pep14



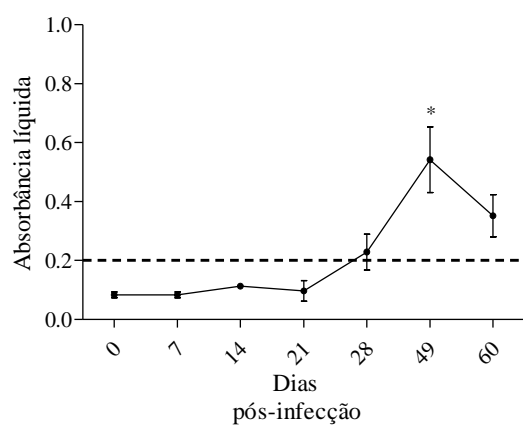
Pep15



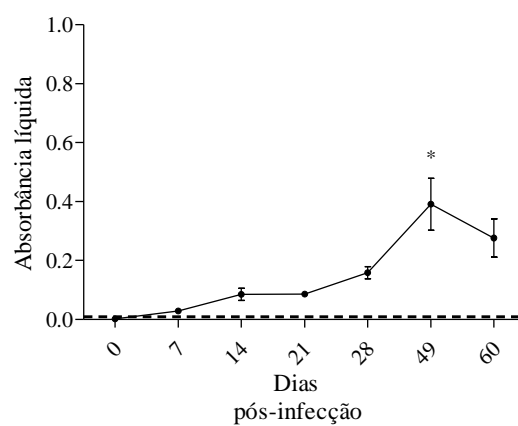
Pep16

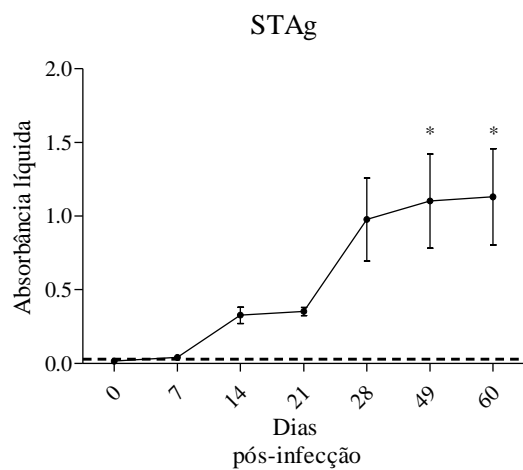
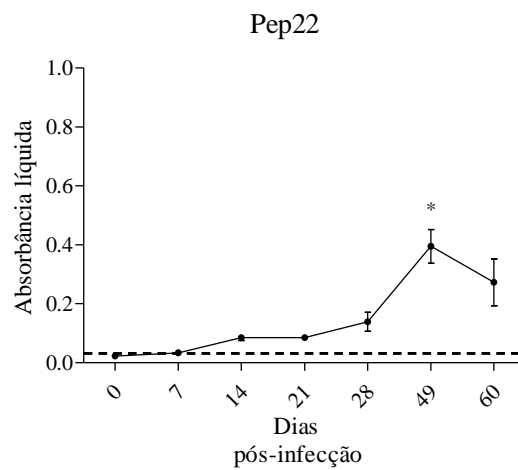
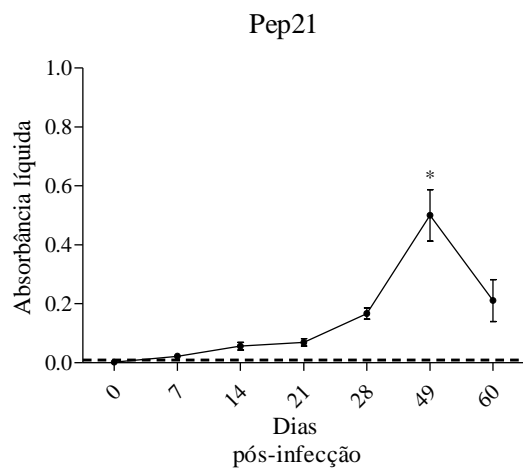
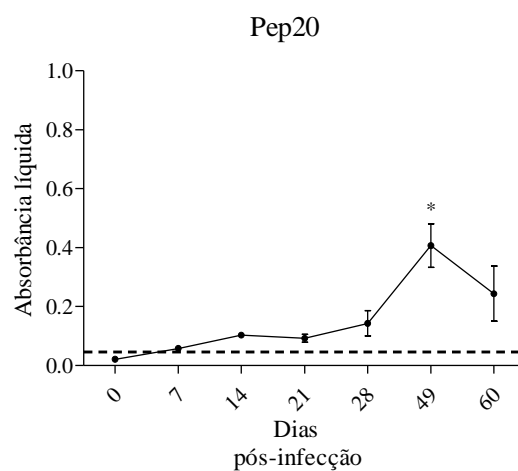
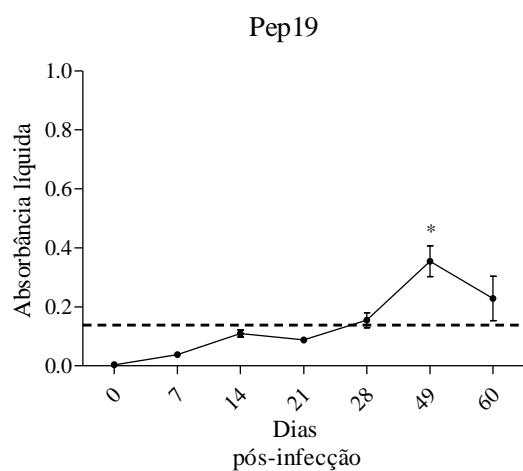


Pep17



Pep18





Anexo 1: Sororreatividade de todos peptídeos com soros de animais experimentalmente infectados. Animais BALB/c foram infectados com cistos da cepa ME49 de *T. gondii* e amostras de sangue coletados 7 vezes no intervalo de 60 dias. O soro desses animais foi utilizado para triar a produção de IgG específica a cada peptídeo. STAg representa um controle para comparação, pois é o antígeno padrão para esse tipo de reação. Absorbância líquida se refere aos valores das amostras obtidos após subtrair deles os valores dos controles negativos. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão, sendo que o símbolo * representa os grupos que apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando submetidos ao teste *one-way annova*. As linhas tracejadas são os *cutoffs* das reações.



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 005/14, sobre o projeto de pesquisa intitulado “Análise do perfil de produção de citocinas em resposta à imunização com peptídeos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii*”, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Roberto Mineo** está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **13 de Junho de 2014**.

(We certify that the protocol nº 005/14, about “Análise do perfil de produção de citocinas em resposta à imunização com peptídeos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii*”, agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 13/06/2014).

Uberlândia, 16 de Junho de 2014.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 2: Aprovação do presente trabalho na comissão de ética na utilização de animais