



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

**Utilização de peptídeos sintéticos derivados de moléculas
imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico
sorológico da toxoplasmose em ovinos e galinhas caipiras**

VINÍCIUS FERNANDES DE PAIVA

UBERLÂNDIA – MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas

Utilização de peptídeos sintéticos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da toxoplasmose em ovinos e galinhas caipiras

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

Vinícius Fernandes de Paiva

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Uberlândia
2016

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

- P149u
2016 Paiva, Vinícius Fernandes de, 1992
Utilização de peptídeos sintéticos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da toxoplasmose em ovinos e galinhas caipiras / Vinícius Fernandes de Paiva. - 2016.
89 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. Toxoplasmose - Teses. 4. Peptídeos - 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

Vinícius Fernandes de Paiva

“Utilização de peptídeos sintéticos derivados de moléculas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da toxoplasmose em galinhas caipiras e ovinos”

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, 18 de julho de 2016.

Gabriel Antonio Nogueira Nascentes

Prof. Dr. Gabriel Antonio Nogueira Nascentes – IFTM

Carolina Salomão Lopes

Dra. Carolina Salomão Lopes – PÓS-DOC/UFU

[Assinatura]

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

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão,

Ronivaldo, Luciana e Igor.

AGRADECIMENTOS

A Nossa Sr.^a Aparecida, pela graça alcançada.

A minha família, sempre presente.

Aos meus pais, *Luciana* e *Ronivaldo*, que sempre me mostraram que sou capaz. Sempre me conduzindo para o caminho do trabalho, da honestidade, da justiça, da perseverança e da partilha, portanto devo minhas conquistas a vocês.

Ao meu irmão, *Igor*, amigo para a vida toda, no qual posso contar em qualquer circunstância.

Ao meu orientador, Prof. Dr. *José Roberto Mineo*, expoente profissional que abriu as portas do laboratório para um até então desconhecido. Profissional que possuo imensa admiração e respeito pelo trabalho desenvolvido brilhantemente durante esses anos de pesquisa e docência. Agradeço pelos debates que me levaram a um amadurecimento pessoal e da própria dissertação. Agradeço também todos os conhecimentos que pude adquirir no laboratório de Imunoparasitologia.

Aos amigos e colaboradores, *Silas, Heber, Luiz Carlos e Fernando*, pela grande contribuição prestada em todos os momentos de elaboração e execução deste trabalho, desde as primeiras etapas de experimentos. Pelo apoio e experiências transmitidas, além dos bons momentos de descontração.

Aos demais amigos (as) do laboratório de Imunoparasitologia, *Cristina, Patrício, Mariana, Caroline, Tamires, Flávia, Vanessa M., Vanessa R., Mylla, Kleber, Eliezer, Carolina, Maraísa, Murilo e Jaqueline*. Aos técnicos (as) de laboratório, *Marley e Zilda*, pelo apoio na rotina laboratorial e pela gentileza ao atender meus pedidos.

Ao Prof. Dr. *Tiago Wilson Patriarca Mineo* e a Dr.^a. *Ana Cláudia Arantes Marquez Pajuaba*, pelas contribuições intelectuais dadas durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos professores do curso de Imunologia e Parasitologia aplicadas da UFU, que durante as disciplinas foram sempre solícitos e competentes.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, *CNPq, CAPES e FAPEMIG*, pelo apoio financeiro fornecido na aquisição de materiais e reagentes necessários à execução deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Capítulo I – O parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, doença que acomete o ser humano e gera perdas econômicas em animais de produção. Quando a prevenção à doença falha recorre-se ao diagnóstico e posterior tratamento, caso o indivíduo for diagnosticado como positivo. Portanto, o desenvolvimento de novas ferramentas precisas de diagnóstico para detectar a infecção por *T. gondii* é uma necessidade, em especial para determinar a fonte ambiental de infecção, que pode resultar em políticas de saúde públicas mais adequadas contra as diferentes vias de infecção e evitar potenciais danos que a toxoplasmose pode causar quando os animais são infectados. **Capítulo II** – As galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) são consideradas sentinelas epidemiológicas, representando ainda um importante tipo de hospedeiro intermediário por estar envolvido no processo de recombinação genotípica de cepas quando predadas por felinos, uma vez que é comum encontrá-las com múltiplas infecções. Avaliamos o potencial diagnóstico de 6 peptídeos sintéticos (SAG2Y, MIC1, M2AP, GRA10, ROP2 and ROP7) preditos *in silico* a partir de marcadores imunodominantes de taquizoitos de *T. gondii*, em 120 amostras de soros obtidos de galinhas naturalmente expostas ao risco de infecção, comparando os peptídeos sintéticos com o antígeno solúvel total (STAg). Os resultados obtidos demonstraram que as taxas de reatividade e de positividade para estes peptídeos são similares às do STAg, sendo que o peptídeo ROP7, bem como a combinação de peptídeos MIC1+ROP2, apresentam sensibilidade significativa, confirmando-os como potenciais ferramentas para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose em galinhas. **Capítulo III** - Ovelhas (*Ovis aries*) são comumente infectadas com *Toxoplasma gondii* devido ao seu hábito alimentar. A infecção em ovelhas grávidas pode trazer sérias consequências como a morte embrionária, mumificação e morte neonatal. Uma preocupação decorrente da infecção nesses animais é que a carne pode ser uma fonte de contaminação para seres humanos e outros animais carnívoros. Portanto, realizar um diagnóstico preciso nesses animais é de fundamental importância. Assim, no presente estudo avaliamos o potencial de novos peptídeos sintéticos como ferramenta de diagnóstico. Os peptídeos sintéticos (SAG2Y, SRS52A, MIC14, GRA4, GRA10 e GRA15) foram preditos *in silico*, a partir de proteínas imunodominantes de *T. gondii*. Determinamos os níveis de anticorpos IgG, utilizando amostras de soros obtidas a partir de 79 amostras de duas fazendas do município de Uberlândia. Analisando-se os resultados em conjunto, a combinação de peptídeos GRA10+GRA15 (Acurácia = 0,82) apresentou melhores parâmetros diagnósticos quando comparada com as outras combinações. Esta preparação, se analisada melhor, poderia ser uma mistura antigênica com potencial uso no diagnóstico da toxoplasmose em ovinos e outras espécies.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmose; Sorodiagnóstico; ELISA; peptídeos sintéticos; galinhas; ovelhas.

ABSTRACT

Chapter I - The obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* is the causative agent of toxoplasmosis, a disease that affects humans and generates economic losses in farm animals. When prevention fails disease refers to the diagnosis and subsequent treatment if the individual is diagnosed as positive. Therefore, the development of new accurate diagnostic tools for detecting *T. gondii* infection is a need in particular to determine the environmental source of infection which can result in more appropriate public health policies against different routes of infection and prevent potential damage that toxoplasmosis can cause when animals are infected. **Chapter II** - The domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) are considered epidemiological sentinels, still representing a major source of recombinant strains when predated by cats, it is common to find them with multiple infections. We evaluate the diagnostic potential of six synthetic peptides (SAG2Y, MIC1, M2AP, GRA10, ROP2 and ROP7) predicted *in silico* from tachyzoites immunodominant markers of *T. gondii* in samples from naturally infected chickens, comparing synthetic peptides with antigen total soluble (STAg). In general, our results demonstrated that reactivity rates and positivity for these peptides are similar to the STAg, and the ROP7 peptide and the combination of peptides MIC1+ROP2 have significant sensitivity, confirming them as potential diagnostic tools for the diagnosis of toxoplasmosis in chickens. **Chapter III** - Sheep (*Ovis aries*) are commonly infected with *Toxoplasma gondii* due to his eating habits. Infection in pregnant sheep can have serious consequences such as embryonic death, fetal resorption, mummification, and neonatal death. One concern regarding the infection in these animals is that the meat can be a source of contamination to humans and other carnivores. Therefore perform accurate diagnosis in these animals is of fundamental importance. In the present study we evaluated the potential of new synthetic peptides as a diagnostic tool. Synthetic peptides (SAG2Y, SRS52A, MIC14, GRA4, GRA10 and GRA15) were predicted *in silico* from immunodominant proteins of *T. gondii*. We determine the levels of IgG antibodies using sera obtained from two farms in the city of Uberlândia. Analyzing the results together, the peptide combination GRA10+GRA15 (Accuracy = 0,82) showed better characteristics compared with the other mixtures. This preparation could be better analyzed with an antigenic mixture potential use in the diagnosis of toxoplasmosis in sheep and other species.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; toxoplasmosis; Serodiagnosis; ELISA; synthetic peptides; chickens; sheep.

Sumário

<i>Capítulo I – Referencial teórico</i>	9
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.1 <i>Hospedeiros</i>	10
1.2 <i>Estágios Infecciosos</i>	12
1.3 <i>Ciclo biológico e Sintomatologia</i>	16
1.4 <i>Invasão celular</i>	18
1.5 <i>Formas de transmissão</i>	21
1.6 <i>Prevalência de Toxoplasma gondii em animais</i>	23
1.7 <i>Diversidade Genética</i>	25
1.8 <i>Resposta imunológica ao parasito</i>	27
1.9 <i>Diagnóstico</i>	29
1.10 <i>Referências bibliográficas</i>	31
<i>Capítulo II</i>	44
<i>Avaliação de peptídeos sintéticos derivados de marcadores imunodominantes do taquizoíto de Toxoplasma gondii para diagnóstico sorológico da infecção em galinhas.</i>	44
Resumo	45
Summary	46
Introdução	47
Materiais e métodos	49
Resultados	52
Discussão	61
Referências	63
<i>Capítulo III</i>	70
<i>Avaliação de peptídeos sintéticos derivados de marcadores imunodominantes do taquizoíto de Toxoplasma gondii para diagnóstico sorológico da infecção em ovinos.</i>	70
Resumo	71
Summary	72
Introdução	73
Materiais e métodos	74
Resultados	78
Discussão	85
Referências	87

Capítulo I – Referencial teórico

1. *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um parasito intracelular obrigatório que pertence ao Filo Apicomplexa, o qual abriga vários parasitos de relevância médica e veterinária, como *Plasmodium falciparum*, causador da forma mais letal da malária (JACOT et al., 2016), *Neospora caninum*, causador mais comum e frequente de aborto em bovinos (MCALLISTER, 2016), além de parasitos como *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria tenella*, *Babesia bovis* e *Hammondia hammondi* (KISSINGER; DEBARRY, 2011; MUGRIDGE et al., 2000). É um protozoário cosmopolita muito bem-sucedido, apto a infectar, supostamente, todos os animais homeotérmicos, inclusive mamíferos aquáticos (VANWORMER, 2014), sendo que na fase aguda é capaz de se replicar em todas as células nucleadas de seus hospedeiros, até mesmo células do sistema imune (LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008; LEKUTIS et al., 2001).

A identificação do parasito *T. gondii* foi feita em 1908 por Charles Jules Henri Nicolle e Louis Manceaux, através de estudos com o roedor *Ctenodactylus gundi* e concomitantemente por Alfonso Splendore, no Brasil, em coelhos de laboratório, sendo que ambos inicialmente pensaram erroneamente se tratar do protozoário *Leishmania* spp. (FERGUSON, D. J.P, 2009). O nome *Toxoplasma gondii*, atribuído por Nicolle e Manceaux, foi proposto baseado na forma característica de meia-lua, banana ou arco (do Grego *toxon*, significa arco, e *plasma*, que significa vida ou forma; *gondii* vem de um equívoco dos autores em identificar o hospedeiro *Ctenodactylus gundi*) que a fase de taquizoíta apresenta, quando visualizado por microscopia (FERGUSON, D. J. P., 2009). Durante 30 anos decorrentes da descoberta, o parasita foi identificado em diversos outros hospedeiros, especialmente em aves (DUBEY, 2002), recebendo diferentes nomes científicos, de acordo com o hospedeiro em que era isolado. Apesar de possuir uma ampla variedade de hospedeiros intermediários e definitivos e ser cosmopolita, há o consenso que somente a espécie *Toxoplasma gondii* está incluída no gênero *Toxoplasma* (DUBEY, 2008).

1.1 Hospedeiros

O roedor gundi (*Ctenodactylus gundi*) e o coelho foram apenas os primeiros hospedeiros identificados, sendo que nas décadas seguintes uma enorme variedade de hospedeiros intermediários foi reportada. Inicialmente, com o entusiasmo da descoberta do parasito e na ausência de técnicas apuradas para diferenciar particularidades entre os isolados encontrados nas variadas espécies de aves, o parasito recebeu diversos nomes, como: *T. avium*, *T. francae*, *T. fulicae* e *T. columbae*, como resumiu Dubey (DUBEY, 2002), mas em 1977, Levine uniformizou todas essas espécies de aves como apenas *Toxoplasma gondii* (LEVINE, 1977). Em 1910, Mello evidenciou pela primeira vez a toxoplasmose em cães domésticos. Já em 1957, Hartley & Marshall reconheceram uma epidemia de abortos causados pela toxoplasmose em ovinos, mostrando pela primeira vez essa causa de morte em fetos por consequência da infecção (DUBEY, 2008). Até então se sabia que o parasito era amplamente distribuído, mas que se restringia ao continente. Até que Cole e colaboradores mostraram pela primeira vez que lontras-marinhas estavam infectadas com o parasito (COLE et al., 2000), levantando a questão sobre a transmissão também em ambientes aquáticos.

Das muitas espécies de animais infectados experimentalmente com *T. gondii*, apenas felinos liberam oocistos nas fezes. Dubey (2009) revisou os estudos feitos com felinos e mostrou que dos 16 felinos selvagens estudados (*Felis lybica*, *Felis euphilurus*, *Felis bengalensis*, *Lynx rufus*, *Acinonyx jubatus*, *Felis concolor*, *Felis concolor vancouverensis*, *Oncifelis geoffroyi*, *Felis iriomotensis*, *Felis yagouaroundi*, *Panthera leo*, *Felis pardalis*, *Felis manul*, *Oncifelis colocolo*, *Panthera tigris altaica*, *Felis silvestres*) todos liberaram oocistos após infecção experimental ou natural, confirmado por bioensaio ou por biopsia de tecido (DUBEY, 2009). Portanto, é consenso que os hospedeiros definitivos são os felídeos (espécies da família *Felidae*) principalmente o gato doméstico (*Felis catus*), onde ocorre o ciclo sexuado do parasita. Sumariamente, *T. gondii* possui como hospedeiro intermediário teoricamente todos os animais homeotérmicos, incluindo aves e mamíferos domésticos, selvagens ou aquáticos, no qual ocorre a fase assexuada do ciclo reprodutivo (DUBEY, 2002; VANWORMER, 2014). Portanto, possui ciclo heteroxeno e cada forma infecciosa promove, predominantemente, uma fase do ciclo biológico do parasito (DUBEY; FRENKEL, 1972).

Há atualmente um número considerável de estudos que tem focado diversos aspectos relacionados aos hospedeiros desse parasito, como a patogênese, a resposta imunológica, o ciclo de vida nos hospedeiros definitivos e intermediários, as formas de

contaminação, as diferenças na virulência entre cepas, o diagnóstico, o tratamento, a prevenção e o controle. Porém, todos esses aspectos ainda apresentam lacunas e não foram respondidos por completo.

1.2 Estágios Infecciosos

O parasito apresenta dois sistemas de membrana, uma simples externa e uma dupla interna formada pelo acoplamento de duas membranas unitárias. A membrana externa é contínua, enquanto a interna é fenestrada e incompleta, principalmente no polo anterior do parasito (HARDING; MEISSNER, 2014). Possui um ciclo biológico complexo apresentando três formas principais – taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (oocisto) e cada forma promove, predominantemente, uma fase do ciclo biológico do parasito (TENTER et al., 2000). Essas formas apresentam organelas citoplasmáticas características do filo Apicomplexa (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

O taquizoíto foi a primeira forma descrita do parasito dando nome ao gênero *Toxoplasma*. Possui forma aparente de arco ou meia-lua, são móveis e de multiplicação rápida (endodiogenia). Invadem qualquer célula nucleada do hospedeiro e após tal processo residem em vacúolos parasitóforos impedindo sua degradação pelos lisossomos (TAHARA et al., 2016). Ultraestruturalmente, o taquizoíto (Figura 1) consiste em várias organelas e corpúsculos de inclusão, incluindo uma película (revestimento externo), anéis apicais, anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, microporo, mitocôndria, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, ribossomo, núcleo, grânulos densos, grânulos de amilopectina (que pode estar ausente) e uma organela plastidial - apicoplasto (DUBEY et al., 1998). São capazes de atravessar a barreira transplacentária, sendo responsáveis pela infecção de fetos em grávidas, causando a toxoplasmose congênita (VARGAS-VILLAVICENCIO et al., 2016). Essa forma provoca uma potente resposta inflamatória e consequente destruição de tecido, portanto, evidencia as manifestações clínicas da doença (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

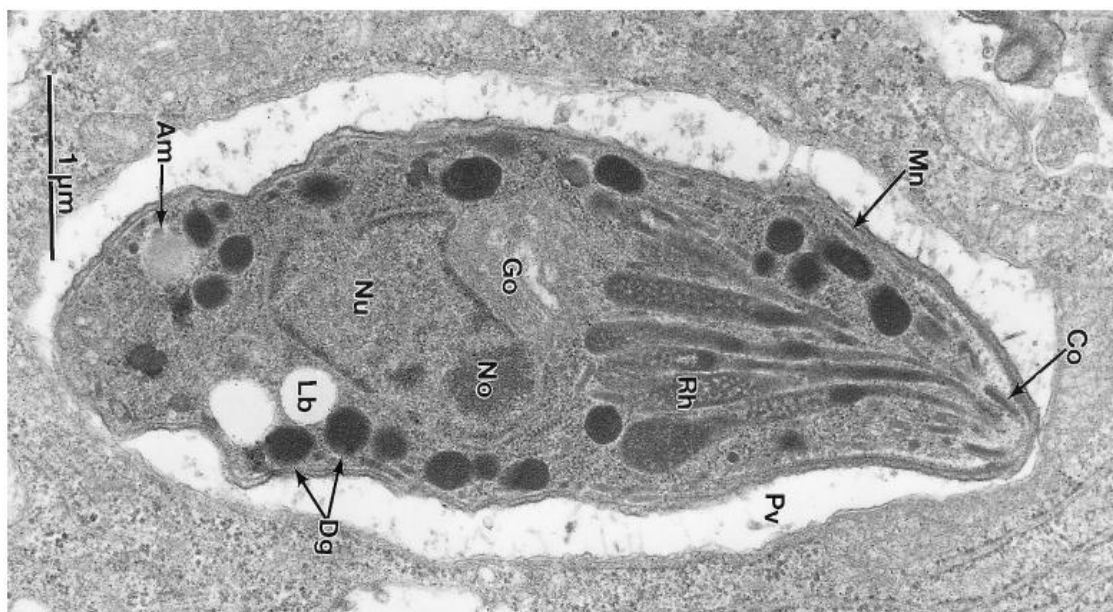


Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de taquizoítos da cepa VEG em células de exsudato peritoneal. Am, grânulo de amilopectina; Co, conóide; Dg, grânulo denso; Go, complexo de Golgi; Mn, micronema; No, nucléolo, Nu, núcleo; Pv, vacúolo parasitóforo; Rh, roptria. Fonte: adaptado de J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY e C. A. SPEER (1998).

Os bradizoítos tiveram sua terminologia cunhada por Frenkel, no início da década de 70, quando descreveu esse estágio encistado em tecido (FRENKEL, 1973). Apresentam uma taxa de divisão mais lenta (em grego, *brad* = lento), sendo ideal para sobrevivência tecidual por longos períodos. Cistos teciduais crescem e permanecem intracelulares com os bradizoítos dividindo-se por endodiogenia e variam em tamanho de acordo com o número de bradizoítos em seu interior. Cistos jovens podem apresentar 5 mm de diâmetro e conter apenas dois bradizoítos, enquanto cistos mais velhos podem conter centenas de bradizoítos (DUBEY et al., 1998). A parede do cisto é altamente glicosilada, levantando a hipótese de que essas modificações nos carboidratos são para mascarar/evadir da resposta imune do hospedeiro e para proporcionar resistência estrutural e química contra o estresse ambiental, facilitando a transmissão do patógeno (WEISS; KIM, 2000). Os bradizoítos (Figura 2) se assemelham ultraestruturalmente aos taquizoítos, diferindo apenas na localização do núcleo, no número de micronemas e de grânulos densos e na expressão de algumas moléculas estágio-específicas como a CST-1, fundamental para a integridade do cisto, promovendo a resistência ao estresse físico do mesmo (TOMITA et al., 2013). Havendo a morte da célula hospedeira os cistos podem se romper culminando na liberação dos bradizoítos que se converterão em taquizoítos, perpetuando a invasão de outras células.

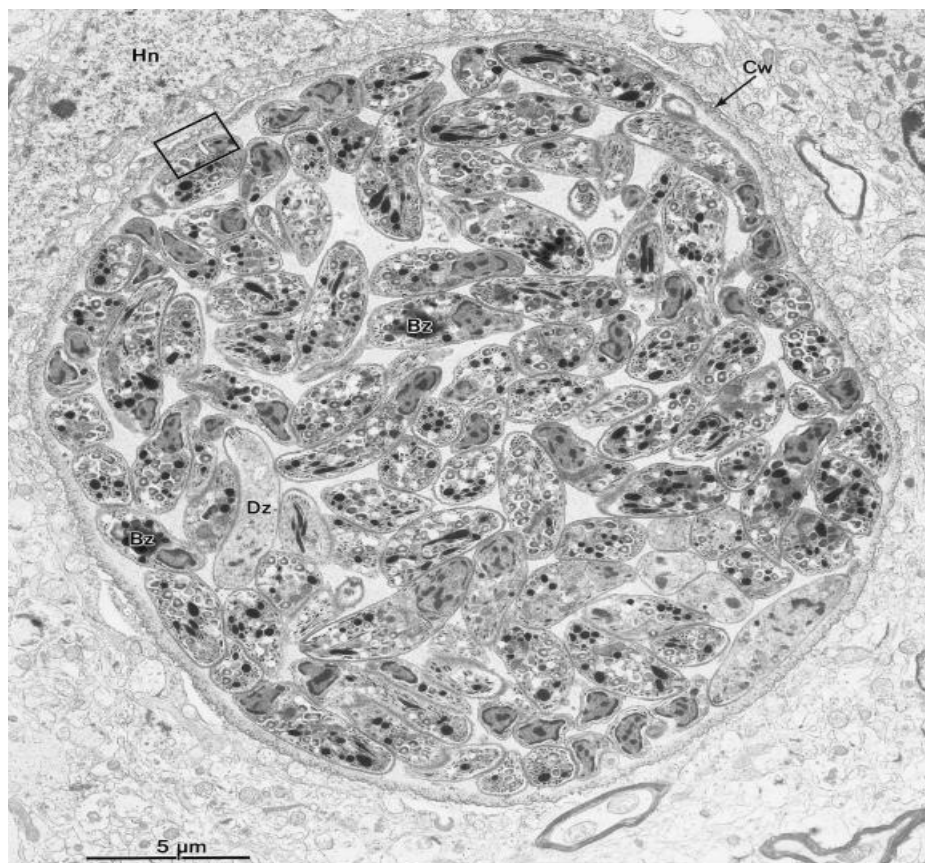


Figura 2. Cisto cerebral em camundongo inoculado com a cepa VEG. O cisto contém aproximadamente 110 bradizoítos (BZ). O cisto é cercado por uma parede relativamente fina (CW) e está situado dentro do citoplasma da célula hospedeira, perto do núcleo (Hn). Alguns dos bradizoítos parecem estar se degenerando (Dz). Fonte: adaptado de J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY e C. A. SPEER (1998).

Os taquizoítos e bradizoítos são as duas formas parasitárias predominantemente encontradas nos hospedeiros intermediários (HOTOP et al., 2014), sendo que os taquizoítos são encontrados em alta quantidade na fase aguda de infecção, e com a evolução da infecção em função da resposta imune os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos formando cistos teciduais principalmente na musculatura e no sistema nervoso central (TENTER et al., 2000).

Os esporozoítos se caracterizam como resultado da fase sexuada nos enterócitos dos hospedeiros definitivos, sendo encontrados em oocistos (LEKUTIS et al., 2001). Os esporozoítos se desenvolvem ao longo de vários dias no interior dos oocistos que são eliminados não esporulados por felinos no ambiente externo. Oocistos excretados esporulam de forma aeróbica dentro 48-72 h no ambiente tornando-se infecciosos. Um oocisto esporulado contém dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos (GONDIM et al., 2016). Ao contrário da forma bem caracterizada de invasão dos

taquizoítos, pouco se sabia sobre o mecanismo de como os esporozoítos (Figura 3D) de *T. gondii* invadiam as células hospedeiras, até que Poukchanski e colaboradores demonstraram que a invasão celular dos esporozoítos depende da interação de duas proteínas anteriormente descaracterizadas, denominadas sporoRON2 e sporoAMA1 (POUKCHANSKI et al., 2013), mostrando que após a ingestão do oocisto por um hospedeiro intermediário, os esporozoítos desencistam e invadem, por intermédio dessas proteínas, as células do intestino delgado distal do hospedeiro e, em algum momento logo após a invasão inicial, esporozoítos convertem-se em taquizoítos, que, em seguida, disseminam-se por todo o hospedeiro. Acredita-se que a robustez do oocisto e do esporocisto é devida, principalmente, à resistência de suas paredes dispostas em bicamada. A parede do oocisto é composta por mais de 90% de proteínas, tendo vários domínios estruturais ricos em tirosina e cisteína identificados na camada exterior e na parede do oocisto (DUMETRE et al., 2013). Oocistos (Figura 3 A, B e C) podem sobreviver por mais de um ano, podendo contaminar solo, água e vegetais, constituindo a forma responsável pela contaminação ambiental (SANTANA et al., 2015).

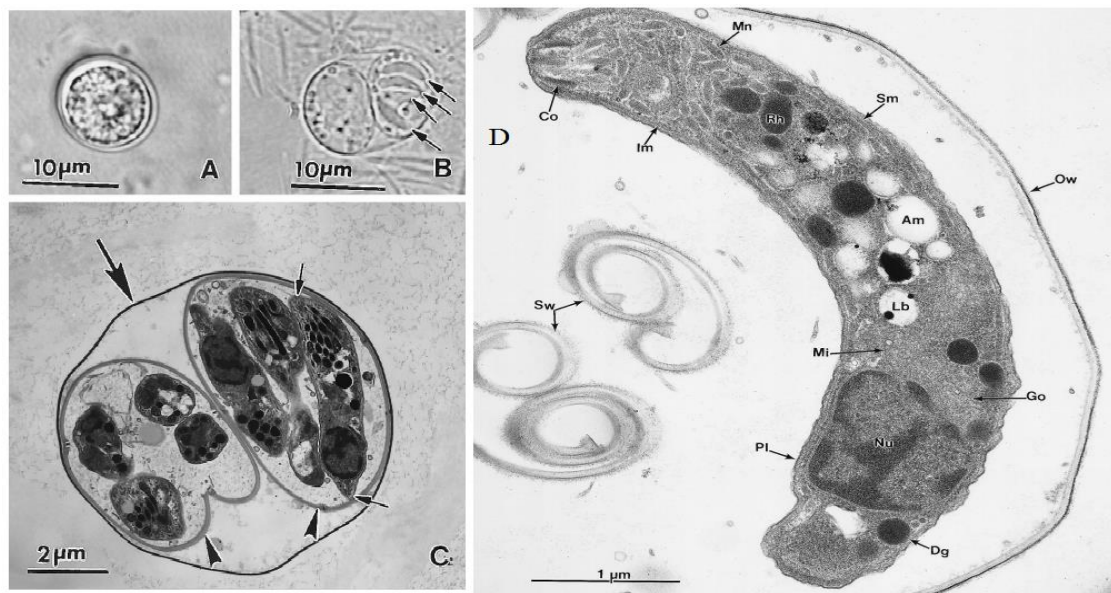


Figura 3. A) Oocisto não esporulado. B) e C) Oocistos esporulados, evidenciando dois esporocistos com quatro esporozoítos. D) Esporozoíto recém excistado ainda dentro de um oocisto. Am, amilopectina; Co, conoide; DG, grânulo denso; Go, complexo de Golgi; Im, complexo de membrana interna; Lb, corpo de lipídios; Mi, mitocôndria; Mn, micronema; Ow, parede do oocisto; PI, plasmalema; Rh, roptria; Sm, microtúbulos subpelículaes; Sw, parede do esporocisto. Fonte: adaptado de J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY e C. A. SPEER (1998).

1.3 Ciclo biológico e Sintomatologia

O conhecimento sobre o ciclo de vida (Figura 4) de *T. gondii* foi concluído mais de 60 anos após a primeira descrição de suas fases assexuadas em hospedeiros intermediários (TENTER et al., 2000). A infecção dos hospedeiros definitivos se dá por meio da predação de hospedeiros intermediários contaminados com cistos teciduais ou por contaminação com oocistos maduros. Os hospedeiros intermediários além de se infectarem pelas formas citadas acima, acrescenta-se a contaminação de forma congênita. O ser humano, ainda, de forma especial, se contamina também por taquizoítos, através de transfusão sanguínea ou doação de órgãos sólidos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Após a ingestão de determinada forma infecciosa, no interior do epitélio intestinal de felídeos, ocorre a reprodução sexuada do parasita onde a parede do cisto é desintegrada pela ação das enzimas gástricas e os bradizoítos são liberados, invadindo ativamente as células epiteliais intestinais e multiplicando-se algumas vezes de forma assexuada por um processo de esquizogonia (FRANCIA; STRIEPEN, 2014), que leva à formação de merozoítos, processo necessário para aumentar a densidade de parasitas antes do desenvolvimento sexuada. Tais merozoítos rompem as células onde foram formados e invadem novas células, onde se diferenciam em gametas masculino e feminino pelo processo de gametogonia. Após fertilização dos gametas forma-se o oocisto. Os oocistos se tornam esporulados por meio do processo de esporogonia, que leva à formação de um oocisto esporulado contendo dois esporocistos, cada um destes com quatro esporozoítos haplóides em seu interior. Os oocistos imaturos eliminados nas fezes contaminam o ambiente onde se tornam infectantes e em condições adequadas podem ficar viáveis por um longo período (TENTER et al., 2000). A resistência à degradação física e química é essencial para a perpetuação do ciclo de vida desses patógenos expostos ao ambiente, e esta função é mantida pelo oocisto, a única fase estruturalmente adaptada para sobreviver em ambientes hostis (DUMETRE et al., 2013).

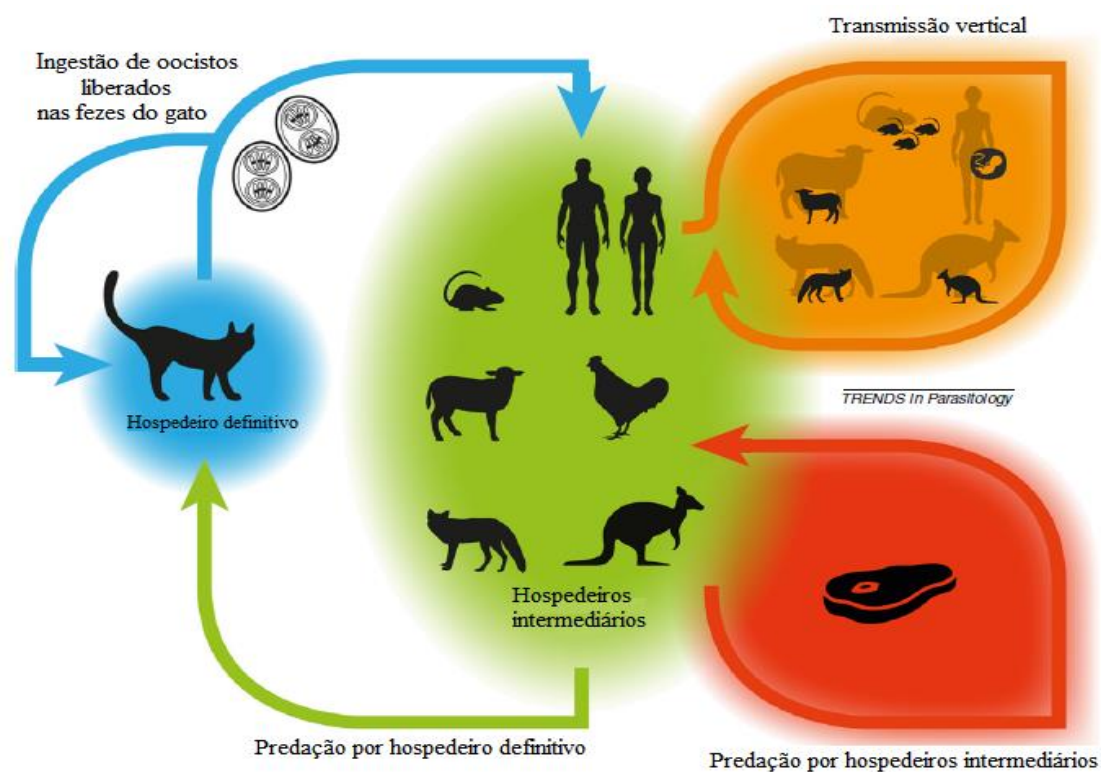


Figura 4. Ciclo de vida do *Toxoplasma gondii*. Fonte: WORTH, A.R. *et al* (2013).

Em animais de produção, a infecção pelo *T. gondii* provoca alterações clínicas como hipertermia, prostração e corrimento nasal, entretanto, o principal problema é de ordem reprodutiva causando abortos em fêmeas que se infectam pela primeira vez durante a gestação (DUBEY *et al.*, 2005). A toxoplasmose, em humanos, pode manifestar-se sem sintomatologia característica, como linfadenopatia, coriorretinite, encefalite, problemas oculares, nervosos e reprodutivos, caracterizados pelos abortamentos frequentes, sendo que muitas vezes também se apresenta de forma assintomática, sendo considerada de caráter oportunista (KIM; WEISS, 2004). O quadro da doença varia consideravelmente, sobretudo, em função da idade em que ocorreu a contaminação. Por isso são descritas duas formas de toxoplasmose: a congênita ou neonatal e a dos adultos e crianças (aguda). Mulheres que contraem a toxoplasmose durante o período de gestação estão sujeitas a riscos de alta gravidade sendo que quando sintomática a fatalidade é muito grande e, em alguns casos, quando não há falecimento, pode haver uma reativação da infecção muitos anos depois, que pode ser prevenida (CALAMY *et al.*, 2015). Contrastando com a infecção em indivíduos normais, a doença em pessoas imunodeficientes é extremamente grave. A encefalite por *Toxoplasma* é a

causa mais frequente de lesões focais intracerebrais em pacientes com AIDS, por tal fato a ressonância magnética e a tomografia computadorizada tornaram-se indispensáveis para o diagnóstico (HUNG et al., 2005).

1.4 Invasão celular

Muitos protozoários do filo Apicomplexa adotaram durante o processo de evolução o desenvolvimento intracelular obrigatório e, portanto, necessitam do ambiente citoplasmático para realizar seu ciclo lítico. O parasito é auxotrófico e para garantir sua manutenção, *T. gondii* capta nutrientes de seu hospedeiro como o triptofano, arginina, poliaminas, purinas, colesterol, ferro, além de outros nutrientes essenciais. Embora a difusão passiva desses compostos possa ser suficiente para satisfazer o parasito, alguns metabólitos são encontrados em concentrações baixas no citosol, limitando assim a aquisição pela difusão (LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008).

Vírus e bactérias necessitam de vias endocíticas ou fagocíticas do hospedeiro para entrada na célula, diferentemente *T. gondii* não necessita de qualquer função da célula hospedeira para a invasão, já que a força motriz necessária para invasão celular é gerada pela polimerização de actina e miosina do parasito (WILHELM; YAROVINSKY, 2014). O parasito apresenta um complexo de membrana interna (*Inner Membrane Complex* - IMC) que é uma estrutura especializada localizada abaixo da membrana plasmática, importante na estabilidade e na replicação do parasito. Além disso, ela serve como uma âncora para o complexo motor de miosina A (TgMyoA), denominado de glideossomo (HARDING et al., 2016), que torna o parasito capaz de mover-se intensamente, mesmo não possuindo cílios ou flagelos.

A invasão celular é um evento crucial que molda a sobrevivência do parasito, a replicação e manipulação da célula hospedeira. O parasito é recoberto com proteínas de superfície ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), conhecidas como SAGs, além de três organelas conhecidas como micronemas (MIC), roptrias (ROP) e grânulos densos (GRA), envolvidas no reconhecimento, na fixação à célula hospedeira, na penetração e na formação do vacúolo parasitóforo (VP).

O processo de invasão inicia-se com o reconhecimento da célula hospedeira e leva apenas alguns segundos. Já foi demonstrado que a adesão parasitária na célula alvo

foi máxima no meio da fase S do ciclo celular da célula hospedeira (GRIMWOOD et al., 1996), mostrando que o parasito tem certa especificidade ao momento mais oportuno de ingressar no citoplasma celular, sendo que essa fixação inicial pode ser reversível e envolve o reconhecimento de receptores de superfície da célula hospedeira por SAGs (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Atualmente sabe-se que existem mais de 150 genes relativos à SAG ou SRS (*SAG-Related sequences*), portanto poucos são conhecidos sendo expressos em um grau significativo nos taquizoítos e, destes, seis (SAG1-3 e SRS1-3) dominam a superfície do parasito (LEKUTIS et al., 2001). SAG1, por exemplo, é a proteína de superfície mais abundante e tem como função reconhecer proteoglicanas sulfatadas nas células hospedeiras. Seu bloqueio com anticorpo anti-SAG1 é capaz de diminuir significativamente a invasão do parasito na célula hospedeira (MINEO; KASPER, 1994).

Micronemas, roptrias, e grânulos densos fundem alternadamente com a membrana do parasita, descarregando seu conteúdo (proteínas) em uma série bem orquestrada de eventos (LALIBERTE; CARRUTHERS, 2008). As proteínas de micronemas proporcionam o contato firme do parasito com as células hospedeiras e, por consequência, muitas MICs (MICs1–4 e de 6–9) apresentam domínios conservados relacionados à adesão que são conhecidos por mediar interações proteína-proteína ou proteína-carboidrato em outros sistemas (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Tais organelas são as primeiras a excretarem seu conteúdo durante a invasão da célula, liberando uma série de adesinas cálcio-dependentes, as quais reconhecem receptores específicos na superfície celular promovendo a adesão e a reorientação do parasita em relação à superfície da célula hospedeira (LOURIDO; MORENO, 2015; SHARMA; CHITNIS, 2013).

As roptrias participam na biogênese do vacúolo parasitóforo, no estabelecimento da junção de movimento (*moving junction* – MJ; Figura 5) e também são fatores de virulência, o que destaca a versatilidade das roptrias na regulação de diferentes aspectos da sobrevivência intracelular (BRADLEY; SIBLEY, 2007). Já foram comprovadas 29 proteínas dessa classe, das quais 24 estão presentes no bulbo da roptria (proteínas ROP) e 5 estão presentes no pescoço da roptria (proteínas RON), porém o gatilho exato para liberação dessas proteínas é desconhecido, mas depende evidentemente de um reconhecimento direto entre a superfície apical do parasita e o receptor da célula hospedeira (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008). Aparentemente, uma proteína de micronema e três proteínas do pescoço da roptria (AMA1, RON2, RON4 e RON5)

formam o complexo denominado junção de movimento, o qual desempenha papel fundamental na penetração da célula hospedeiro (ALEXANDER et al., 2005).

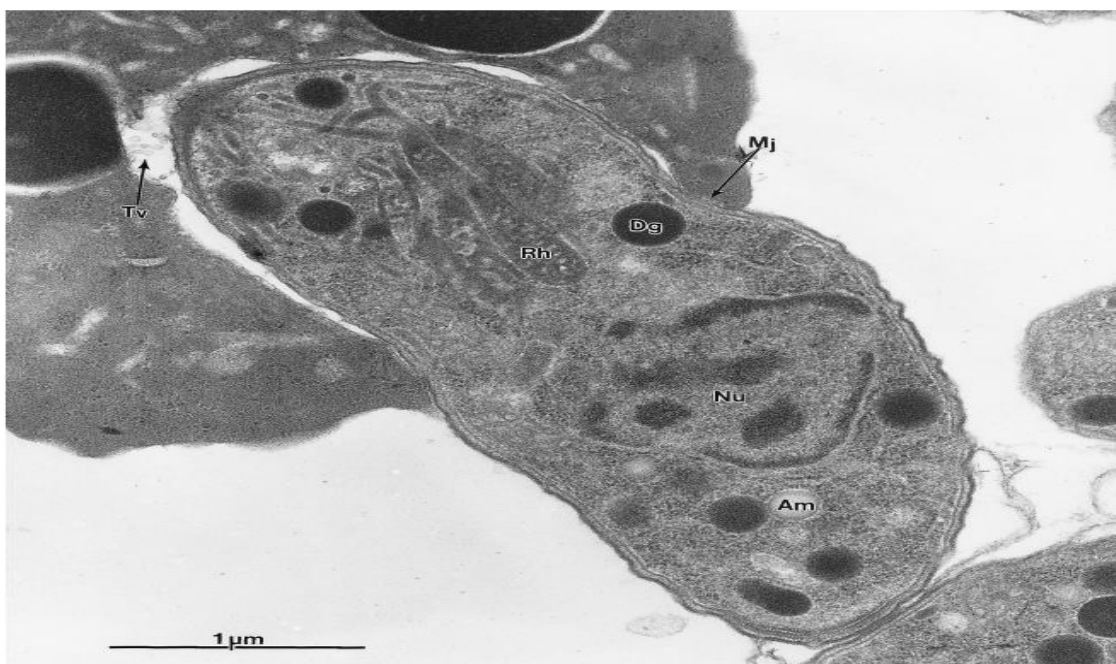


Figura 5. Taquizoito da cepa VEG invadindo um neutrófilo de peritônio de camundongo. Nota-se a junção de movimento (Mj) no sitio de penetração e um desenvolvimento precoce da membrana tubulovesicular (Tv). Am, grânulo de amilopectina; Dg, grânulo denso; Rh, roptria; Nu, núcleo. Fonte: adaptado de J. P. DUBEY, D. S. LINDSAY e C. A. SPEER (1998).

Por um processo denominado de *gliding* proporcionado pelo motor de miosina e actina supracitado (referido como glideossomo), o parasito penetra ativamente na célula do hospedeiro. Após entrada nas células, o parasito reside dentro de um compartimento especializado, chamado vacúolo parasitóforo (VP), sendo que este não se funde com lisossomos (GUBBELS et al., 2005).

As proteínas dos grânulos densos são especiais em modificar o ambiente no interior do VP, funcionando desse modo para a sobrevivência intracelular e replicação do parasito. GRA16, por exemplo, subverte a via de sinalização do oncogene p53, inibindo a apoptose da célula infectada (BOUGDOUR et al., 2014). As proteínas dos grânulos densos podem permanecer de três formas: solúveis no lúmen do VP, associadas com a membrana do vacúolo parasitóforo (MVP) ou exocitadas, contribuindo para a modelação e maturação do VP (NAM, 2009). De forma geral, as proteínas de grânulos densos, conectam o interior do VP com as mitocôndrias e com o citoplasma da célula hospedeira, facilitando a obtenção de nutrientes e o que mais for

necessário para manutenção e replicação do parasito no ambiente intracelular (MERCIER et al., 2005).

No interior do vacúolo parasitóforo ocorre um processo de replicação mitótico (endodiogenia), onde duas células filhas são geradas no interior de cada célula mãe (FRANCIA; STRIEPEN, 2014) e, após uma série de replicações no interior do VP, há a liberação de calpaina 1 e de uma proteína semelhante à perforina (liberada pela micronema), além de outras moléculas, que rompem a membrana da célula hospedeira facilitando o escape do parasita, sendo que posteriormente ocorrerá invasão de novas células do hospedeiro por essas células filhas geradas, recomeçando o ciclo lítico (BLACKMAN; CARRUTHERS, 2013).

1.5 Formas de transmissão

De acordo com a hipótese de manipulação, *T. gondii* pode alterar o comportamento de seu hospedeiro intermediário em benefício próprio (BERDOY et al., 2000) bloqueando a aversão natural de ratos a urina de gatos, aumentando a predação do rato pelo gato (VYAS et al., 2007). Tais alterações comportamentais parecem ser o produto de uma forte pressão seletiva para o parasita aumentar a transmissão a partir do seu reservatório, principalmente roedores, para o gato, em que pode ocorrer a reprodução sexuada e o ciclo de vida completo (WEBSTER, 2007). Recentemente foi descrito que os chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) infectados por *T. gondii* têm seu comportamento manipulado pelo parasito, perdendo sua aversão pela urina de leopardos (*Panthera pardus*), seu predador natural e também hospedeiro definitivo (POIROTTE et al., 2016). Por outro lado, há controvérsias, uma vez que mudanças de comportamento relatadas variam entre os estudos e não existe evidência de que a manipulação comportamental aumente a transmissão para os gatos (WORTH et al., 2013).

A capacidade do parasita em dispersar-se está intrinsecamente relacionada às várias formas de transmissão, como, por exemplo, o contato acidental com oocistos esporulados através da ingestão e/ou manipulação de terra contaminada, ou pela passagem transplacentária de taquizoítos (RANDALL; HUNTER, 2011); A ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada com cistos está relacionado a uma maior taxa de transmissão por meio da ingestão de bradizoítas presentes em cistos teciduais (THOMAS et al., 2013); A veiculação hídrica de oocistos também consiste em um meio

de contaminação de hospedeiros (KIM; WEISS, 2004). Assim, as principais formas de transmissão deste parasita são listadas abaixo:

- 1) Ingestão de carne crua ou malcozida contendo cistos teciduais com bradizoítos;
- 2) Ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos excretados nas fezes de felídeos infectados;
- 3) Transmissão por meio da passagem de taquizoítos da mãe para o feto através da placenta (transmissão vertical), causando toxoplasmose congênita;
- 4) No caso de seres humanos, pode acontecer por meio de transfusão sanguínea, por meio de transplante de órgãos sólidos contendo cistos teciduais de um doador infectado para um receptor não infectado e, em casos menos relatados, por contaminação entre profissionais da área da saúde com objetos perfurocortantes contaminados com taquizoítos viáveis presentes em sangue ou secreções.

Entre as espécies relevantes na transmissão de *T. gondii* encontram-se os gatos domésticos, já que o tamanho da população de gatos tem aumentado nos últimos anos, devido à melhoria do estilo de vida e à consciência de bem-estar animal. Gatos que vivem livremente nas cidades rondam os domicílios e se alimentam de lixo descartado em torno das casas, este fato pode colocar crianças em risco, pois as mesmas possuem o hábito de brincar junto ao solo que pode estar contaminado com oocistos (TEHRANI-SHARIF et al., 2015). Portanto, o estudo da infecção em gatos desempenha um papel importante, pois o gato é o único animal que libera oocistos no ambiente proporcionando a propagação da toxoplasmose. Nesse sentido, as galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) criadas de forma extensiva podem ser contaminadas por oocistos e também por cistos teciduais, sendo ótimas indicadoras de contaminação ambiental por oocistos, dado seus hábitos alimentares de forrageamento (DUBEY et al., 2003). Por outro lado, os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) além de serem importantes hospedeiros intermediários da toxoplasmose, são também hospedeiros definitivos da neosporose (*Neospora caninum*). Além disso, cães vadios são considerados como altamente predispostos à infecção pela toxoplasmose devido ao contato estreito com gatos, ao seu hábito alimentar onívoro e ao contato direto com o solo contaminado (LANGONI et al., 2013; LANGONI et al., 2006). As ovelhas são animais herbívoros forrageadores que necessitam de solo para obter alimento, principalmente quando criadas de forma extensiva. A toxoplasmose em ovelhas apresenta importante causa de perdas no setor produtivo em todo o mundo devido a

abortos após a primo-infecção em ovelhas grávidas, caracterizada pela presença de focos necróticos multifocais na placenta e vários órgãos do feto, principalmente no fígado e no cérebro, com infiltração de células inflamatórias (BUXTON; FINLAYSON, 1986; CASTANO et al., 2016). Em uma meta-análise realizada em animais de produção nos Estados Unidos, destacou-se, a importância da criação extensiva e intensiva de vários animais na distribuição do *T. gondii*, resultando em uma diferença na prevalência nesses dois tipos de criação. Os animais criados de maneira extensiva apresentaram uma alta prevalência quando comparado com animais criados de forma intensiva. Esses dados demonstram que a criação de animais de forma extensiva representa uma grande fonte na transmissão do parasito (GUO et al., 2016).

1.6 Prevalência de Toxoplasma gondii em animais

Parasitas e suas doenças associadas podem ter impactos negativos significativos sobre populações de animais, causando uma redução na abundância, redução na distribuição espacial ou mesmo levar uma população à extinção. Podem também diminuir a fecundidade, as taxas de crescimento e o tamanho da população, aumentando assim a vulnerabilidade à extinção (FANCOURT et al., 2014). A toxoplasmose para algumas espécies de animais pode ser muito grave apresentando uma alta capacidade de causar morte (HOWE, L. et al., 2014). Portanto, conhecer a prevalência de determinada doença em uma população de animais selvagens ou até mesmo em animais de criação é de principal importância para preservação e manutenção de espécies acometidas. Com o advento de novos testes sorológicos foi possível investigar a soroprevalência desta infecção nas diversas espécies de hospedeiros. O teste conhecido como corante Sabin-Feldman no diagnóstico da toxoplasmose (SABIN; FELDMAN, 1948), foi o primeiro a ser utilizado com esse propósito, sendo posteriormente conduzido em vários estudos soroepidemiológicos.

As taxas de soroprevalência de *T. gondii* são diferentes em cada região e nos diferentes hospedeiros e diversos fatores estão relacionados a essas diferenças. Dentre estes fatores, destacam-se as condições climáticas diferentes em cada região, as quais afetam diretamente a viabilidade de oocistos no ambiente. Porém, vários outros fatores intrínsecos interespecíficos podem estar relacionados às variações na prevalência da

infecção, tais como a idade do animal, os hábitos sociais e alimentares (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; TENTER et al., 2000).

Em muitos hospedeiros, incluindo gatos domésticos, a soropositividade ao parasito aumenta com a idade. Os fatores de risco associados à infecção felina incluem o acesso ao exterior das residências e a caça por alimento (OPSTEEGH et al., 2012). A soroprevalência da toxoplasmose nos gatos domésticos varia muito entre países. Na Estônia, a soroprevalência foi de 60,8% (MUST et al., 2015); em Tóquio no Japão, foi de 5,6 (1999-2001) e 6,7% (2009-2011) (OI et al., 2015); em Lima no Peru, foi de 11,0% (CERRO et al., 2014); na província de Guizhou na China, foi de 63,2% (LI et al., 2015); em Garmsar no Iran, foi de 64,5% (TEHRANI-SHARIF et al., 2015); e no Paquistão foi de 26,4% (AHMAD et al., 2014), mostrando, então, uma variação significativa na prevalência nesses hospedeiros definitivos em várias partes do mundo.

A Organização Mundial da Saúde, estima que cerca de 22% das infecções humanas foram transmitidas por carne contaminada. Uma meta-análise realizada nos Estados Unidos estimou que a prevalência de *T. gondii* em suínos não confinados é a mais expressiva (31,0%), seguida por cabras (30,7%), galinhas criadas livres (24,1%), cordeiros (22,0%) e porcos de confinamento (16,7%), sendo que a prevalência estimada por meta análise pode ser usada como um contributo importante em modelos de avaliação de risco para prever problema de saúde pública (GUO et al., 2016).

Galinhas (*Gallus gallus domesticus*) criadas de forma extensiva (obtendo alimento do chão) são reconhecidamente importantes na transmissão da toxoplasmose, por ser fonte alimentícia, além de serem sentinelas epidemiológicas, constituindo-se em relevantes indicadoras de contaminação ambiental com oocistos. A prevalência de toxoplasmose em galinhas tem sido verificada em diversas localidades: 38,4% em Addis Ababa, Etiópia (TILAHUN et al., 2013); 18% na Irlanda (HALOVA et al., 2013); 25,5% no grupo de maior prevalência em Durango, México (ALVARADO-ESQUIVEL et al., 2012); 38,8% no estado do Espírito Santo, Brasil (BELTRAME et al., 2012) e 31,5% no estado da Paraíba, Brasil (FEITOSA et al., 2016).

Com relação às ovelhas, animais susceptíveis à infecção, uma preocupação frequente é que a infecção pode causar aborto gerando graves perdas para a indústria da carne, leite e lã. Por exemplo, na Pomerania, norte da Polônia foi encontrado 55,9% de prevalência do parasito (HOLEC-GASIOR et al., 2015), indicando um alto índice de contaminação, reforçando a preocupação com a infecção nesses animais. Sabe-se que os altos níveis de prevalência podem ser diminuídos se tomadas medidas profiláticas

simples, como: adoção de medidas sanitárias adequadas na produção de carne, alimentação de gatos e animais de produção com comida e água não contaminada e impedir o carnivorismo (DUBEY, 2008).

1.7 Diversidade Genética

A genética de populações em *Toxoplasma gondii* começou a ser estudada baseada na técnica de RFLP (“Polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição”, traduzido), nas análises filogenéticas e por estatísticas. Os estudos indicaram uma estrutura populacional altamente incomum composta por três linhagens clonais, encontradas predominantemente na América do Norte, África e Europa, diferindo substancialmente em virulência, padrão de ocorrência, patologia e epidemiologia (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992). Nesse contexto em 1995, pela primeira vez, Howe e Sibley classificaram o *T. gondii* em três linhagens clonais distintas, estabelecidas e designadas do tipo I (RH), tipo II (ME49) e tipo III (VEG) (HOWE, D. K.; SIBLEY, 1995). As cepas do tipo I e III têm sido descritas em pacientes com doença congênita. A cepa do tipo I é mais comum em humanos que em animais, sendo extremamente virulenta para camundongos. A cepa do tipo II é responsável pela maioria das infecções em pacientes com AIDS; em camundongos essa cepa é responsável por alta taxa de formação de cistos teciduais (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Evidências apontam para um modelo de recombinação sexual pouco frequente, seguido por fortes pressões seletivas. A genotipagem de cepas em comparação à linhagem clonal determinou que o antepassado do tipo II cruzou com cepas ancestrais α e β (há milhares de anos) gerando os tipos I e III, respectivamente (MINOT et al., 2012). Não está claro por que os tipos I e III foram tão prolíficos, mas uma explicação provável é que a recombinação reuniu uma combinação específica de alelos que os forneceu uma vantagem seletiva (GRIGG et al., 2001). Em 2011, Khan descobriu na América do Norte uma quarta cepa clonal. Esse novo grupo, conhecido como haplogrupo 12, contém genótipos divergentes anteriormente referidos como A e X, isolados de lontras marinhas. Consistente com isto, o grupo 12 foi encontrado principalmente em animais selvagens e, ocasionalmente em seres humanos (KHAN et al., 2011).

Sabe-se que além das cepas clonais existem as cepas recombinantes ou atípicas, existindo ainda uma dualidade que modula se haverá ou não recombinação entre cepas. Primeiro, se a transmissão for entre hospedeiros intermediários, o parasito se multiplicará por mitose centenas de vezes e se disseminará na natureza, sem recombinação genética. Por outro lado, a passagem por hospedeiros definitivos pode gerar recombinações por meiose, proporcionando rearranjos na estrutura populacional, viabilizando a ocupação de diversos nichos (BOOTHROYD; GRIGG, 2002). Portanto, múltiplas infecções com diferentes cepas resultam na produção de um grande número de formas recombinantes e atípicas, que são muito prevalentes na América do Sul (LINDSTROM et al., 2008). Atualmente, estudos moleculares mais abrangentes demonstraram uma estrutura populacional muito complexa e com uma diversidade genética muito maior, mesmo em lugares considerados com baixa taxa de recombinação entre cepas. Procedendo à genotipagem de *T. gondii* que infectaram animais silvestres, no Brasil, Vitaliano e colaboradores identificaram 17 genótipos, sendo que 13 foram isolados pela primeira vez e 4 já constavam na literatura, provenientes de 9 espécies diferentes de animais - *Dasypus novemcinctus*, *Euphractus sexcinctus*, *Tamandua tetradactyla*, *Tayassu pecari*, *Cuniculus paca*, *Leopardus tigrinus*, *Pseudalopex vetulus*, *Dryocopus lineatus* e *Chrysocyon brachyurus* (VITALIANO et al., 2014). Até a Alpaca (*Vicugna pacos*), animal com pouca amostragem, revelou dois isolados, designados de TgAlpacaUS1 (genótipo #170) e TgAlpacaUS2 (genótipo #3, variante tipo II), mostrando evidências de que há maior diversidade genética entre os isolados circulantes de *T. gondii* do que se pensava anteriormente (DUBEY et al., 2014).

Na cidade de Uberlândia, Brasil, foram isoladas duas cepas, denominadas TgChBrUD1 (genótipo #11) e TgChBrUD2 (genótipo #6), provenientes do tecido cardíaco de galinhas criadas de forma extensiva. Ambos isolados demonstraram alta virulência em modelo murino e o isolado TgChBrUD1 foi capaz de induzir cistos cerebrais (LOPES et al., 2016). Mostrando a aplicabilidade desses estudos sobre isolamento de cepas, Franco e colaboradores, utilizando o modelo *Calomys callosus* demonstraram que essas cepas recombinantes possuem um impacto negativo na saúde de gestantes. No roedor *C. callosus* a transmissão congênita da toxoplasmose acontece somente durante a fase aguda de infecção. Fêmeas grávidas com doença crônica (cepa ME-49) reinfetadas com cepas virulentas (RH) não apresentavam toxoplasmose congênita. Por outro lado, quando possuíam a doença crônica e eram reinfetadas com as cepas atípicas (TgChBrUD2, por exemplo) havia um maior número de animais com

perda fetal, maior taxa de reabsorção, além de níveis mais altos de citocinas pró-inflamatórias e anticorpos IgG2a (FRANCO et al., 2015), demonstrando-se que essas modificações genotípicas derrubam paradigmas e implicam em diferenças na hora de lidar com as manifestações clínicas para posterior tratamento. Em suma, em *T. gondii* já foram identificados 15 haplogrupos, 6 clados principais e aproximadamente 1000 cepas ao redor do mundo (AJZENBERG, 2015; SU et al., 2012).

1.8 Resposta imunológica ao parasito

O parasito é relatado como um potente manipulador da resposta do hospedeiro para evitar a sua eliminação. É muito bem-sucedido, sendo capaz de infectar todas as células nucleadas, incluindo células da resposta imune. Hospedeiros que estão infectados com *T. gondii* devem apresentar uma resposta imune potente para conter a disseminação prevenindo a mortalidade (ALIBERTI, 2005). Várias pesquisas utilizam o modelo murino como uma ferramenta poderosa para decifrar os mecanismos de resistência do hospedeiro ao parasito.

Macrófagos e células natural killer (NK) são a primeira linha de defesa durante a fase aguda da infecção. Estudos revelaram também um papel crucial das células TCD4+ nesse processo de resistência ao parasito (GAZZINELLI, R. et al., 1992). A relevância das células TCD4+ para os seres humanos foi esclarecida com a observação da toxoplasmose sendo reativada em decorrência da imunossupressão pelo vírus HIV (KODYM et al., 2015). Posteriormente à descoberta da relevância das células TCD4+, tornou-se claro que o interferon- γ (IFN- γ) é crítico para o controle da infecção no hospedeiro e que a sua produção em linfócitos T auxiliares (Th1) e células NK é dependente da citocina interleucina-12 (IL-12) (GAZZINELLI, R. T. et al., 1994). Portanto, infecções causadas pelo *T. gondii* desencadeiam uma resposta imune Th1 dependente de MyD88 caracterizada pela produção de IFN-gama e IL-12. Adicionalmente, demonstrou-se que a resposta de IL-12p40 foi mediada seletivamente por células dendríticas (DCs) que pertencem ao subconjunto de CD8 α +. A importância desta população de DC foi mais tarde confirmada em estudos em camundongos BATF3-/- que carecem de CD8 α +DCs funcionais, mostrando não desenvolver imunidade dependente de IL-12 contra o parasita (MASHAYEKHI et al., 2011). Um segundo tipo de célula inata cujo papel na resistência do hospedeiro é importante são os

monócitos inflamatórios. Estas células que possuem um fenótipo GR-1+Ly6C+ produzem óxido nítrico (NO) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e são recrutadas a partir da medula óssea de um modo dependente de CCR2 em resposta a *Toxoplasma* (DUNAY et al., 2010).

Receptores do sistema imune inato como os receptores tipo-Toll (TLRs 2, 4, 9 e 11) têm um importante papel no reconhecimento do parasito pelo hospedeiro. TLR 11 responde a moléculas tipo profilinas que são conservadas entre parasitos protozoários, enquanto TLRs 2 e 4 reconhecem glicosilfosfatidilinositóis na superfície do parasito (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2007). Estudos revelaram ainda especificidade notável aos receptores Toll-like (TLR). TLR11, TLR12 e as proteínas IRG (immunity-related GTPase) são elementos essenciais para a detecção e controle imunitário em camundongos, mas não em humanos (GAZZINELLI, R. T. et al., 2014).

Inflamassomas são complexos multiméricos de proteínas que se agrupam no citoplasma da célula hospedeira em resposta a sinais específicos de stress ou a contaminação do citoplasma por agentes patogênicos. NLRP1 é importante para a restrição da carga parasitária e aumenta a sobrevivência de camundongo em resposta a infecção. A resistência por NLRP3 é explicada através da produção de IL-18, que respondeu restringindo a replicação do parasito e reduzindo a mortalidade em resposta à infecção. Coletivamente, estes estudos suportam um papel importante de NLRP1 e NLRP3 na mediação de resistência do hospedeiro (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015).

Além de todo o aparato celular também precisamos da imunidade humoral para eliminar as formas que regressam do interior celular. Os linfócitos B (plasmócitos) produzem anticorpos que são fundamentais na neutralização e opsonização de variados antígenos. Anticorpos são capazes também de ativar a via clássica do complemento, que geralmente é iniciada por anticorpos da classe IgG ou IgM formando complexos com o antígeno. A resposta imune humoral resulta no aumento dos níveis das imunoglobulinas circulantes IgA, IgM, IgG e IgE (DARD et al., 2016). Com exceção da toxoplasmose congênita, a infecção natural ocorre pela rota oral. Muitos estudos já avaliaram a presença de anticorpos na saliva, fluidos intestinais, lágrimas e leite (CORREA et al., 2007). Interessantemente, o anticorpo IgA foi encontrado 18 vezes mais frequente em pacientes com uveíte em relação aos pacientes saudáveis e, em alguns casos, os pacientes que possuíam IgA secretória nas lágrimas eram soronegativas para IgA, sugerindo uma produção local de tal anticorpo (LYNCH et al., 2004).

1.9 Diagnóstico

Geralmente a toxoplasmose apresenta sintomas inespecíficos ou é assintomática, mostrando que utilizar somente o diagnóstico clínico seria muito subjetivo. Deste modo, ter um diagnóstico preciso da toxoplasmose é de fundamental importância. Sendo assim, vários métodos são utilizados frequentemente para diagnosticar a toxoplasmose.

Atualmente existem os métodos diretos de diagnóstico, que consistem no isolamento do parasito nos tecidos, na análise histológica ou através da detecção de DNA de *T. gondii*. Existem também os métodos indiretos, que são realizados por meio de análises sorológicas dos indivíduos, detectando anticorpos específicos (IgG, IgM, IgE e IgA) anti-*T. gondii*. Portanto, para diagnosticar a infecção em seres humanos e animais frequentemente recorre-se à detecção de anticorpos séricos contra o parasito, uma vez que os mesmos podem durar por anos, e eventualmente, durante toda a vida do hospedeiro (SADRAIE et al., 2013), além de apresentar uma forma menos invasiva e de rápida detecção.

Uma variedade de testes é utilizada no diagnóstico da toxoplasmose. Em geral, os principais testes empregados são: Imunofluorescência indireta (IFI), Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay), teste do corante Sabin-Feldman (Sabin-Feldman dye test), reação em cadeia da polimerase (PCR), imuno-histoquímica (IHC), testes de aglutinação (teste de aglutinação modificado – MAT; teste de aglutinação em látex – LAT; teste de hemaglutinação indireta – IHAT; teste de aglutinação por imunoabsorção - ISAGA- *Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay*) e o *Immunoblotting*. Sendo que os métodos sorológicos apresentam aplicabilidade distinta quanto ao isotipo de anticorpo que detecta.

O teste do corante Sabin-Feldman (SABIN; FELDMAN, 1948), foi o primeiro teste proposto a fim de diagnosticar a toxoplasmose. É um teste de referência que contém como princípio a lise dos parasitos vivos (taquizoítos) mediada pelo sistema complemento e anticorpos. O corante utilizado é o azul de metileno que cora apenas parasitos vivos. Portanto se no soro existem anticorpos anti-*Toxoplasma* o parasito é lisado por uma cascata mediada pela via clássica do complemento, deixando os parasitos sem coloração. O resultado do teste é a soma de 50% ou mais dos parasitos lisados.

O teste de ELISA (Figura 6) é um método quantitativo, em que a reação antígeno-anticorpo é monitorada por medida da atividade enzimática. A técnica foi utilizada pela primeira vez por Voller e colaboradores, onde na época já destacaram o potencial do teste no diagnóstico da toxoplasmose. A técnica se baseia na inicial fixação do antígeno à placa, com posterior adição do soro contendo anticorpos anti-Antígeno. Logo após se adiciona o anticorpo conjugado com uma enzima (peroxidase, por exemplo) e revela-se a reação com um substrato enzimático e um cromógeno (VOLLER et al., 1976).

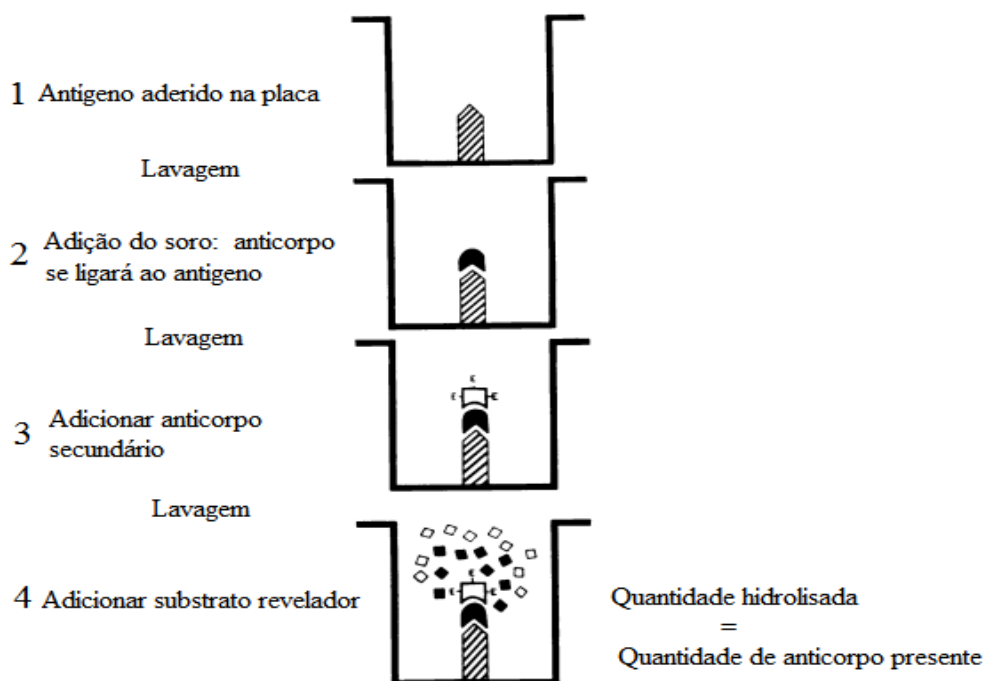


Figura 6. Princípio da técnica de ELISA. Fonte: Adaptado de Voller *et al*, 1976.

Os testes de aglutinação (MAT, LAT, IHAT e ISAGA) foram propostos para suprir demandas específicas dos pesquisadores, como por exemplo, fazer o diagnóstico da fase aguda da infecção ou diagnosticar toxoplasmose congênita e, possuíam como princípio aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes (DESMONTS et al., 1981; DESMONTS; REMINGTON, 1980; JACOBS; LUNDE, 1957).

Para o *Immunoblotting* a preparação do antígeno é executada em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em condições redutoras que, em seguida é transferido para uma folha de nitrocelulose. Com o antígeno fixado na nitrocelulose adiciona-se o soro e posteriormente o anticorpo secundário e a reação é

revelada com a adição do substrato enzimático e um cromógeno. A imunofluorescência indireta consiste na utilização de taquizoítos intactos fixados e imobilizados em lâminas de vidro para microscopia. Primeiramente aplica-se o soro contendo os anticorpos primários e depois um anticorpo anti-imunoglobulina marcado com um fluorocromo (anticorpo secundário), os quais após incubação revelam uma fluorescência em toda superfície do parasito que pode ser visualizada no microscópio de fluorescência. Os principais fluorocromos são a rodamina (TRICT) e o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Outra técnica muito utilizada é a PCR. Depois de extraído o DNA do parasito, este é adicionado em uma solução tampão de dNTPs, *Primers* e Taq-polimerase (polimerase de *Thermus aquaticus*, altamente estável à altas temperaturas), cuja mistura é colocada em um termociclador, onde ocorrerá a amplificação do DNA do parasito, o produto da amplificação é visualizado em gel de poliacrilamida (SAIKI et al., 1988), ou diretamente visualizado por meio da PCR em tempo real (*real time PCR*).

A maioria dos testes disponíveis no mercado utilizam os antígenos nativos de *T. gondii* derivados dos taquizoítos, o que pode resultar em variações na precisão da detecção (BEGHETTO et al., 2003). O ciclo do parasito e o perfil imunológico do hospedeiro devem ser considerados, já que taquizoítos e bradizoítos (formas infectantes) possuem diferentes perfis antigênicos (SUN et al., 2013). Assim, é fundamental selecionar antígenos mais bem definidos para serem aplicados com finalidades diagnóstica e epidemiológica.

1.10 Referências

AHMAD, N. et al. Seroprevalence of IgG and IgM antibodies and associated risk factors for toxoplasmosis in cats and dogs from sub-tropical arid parts of Pakistan. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 4, p. 777-84, 2014.

AJZENBERG, D. 1995-2015: it is time to celebrate 20 years of (intensive) genotyping of *Toxoplasma gondii* strains. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 689-91, 2015.

ALEXANDER, D. L. et al. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v. 1, n. 2, p. e17, 2005.

ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 2, p. 162-70, 2005.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in chickens in Durango State, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 431-2, 2012.

BEGHETTO, E. et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5414-8, 2003.

BELTRAME, M. A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espirito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 225-30, 2012.

BERDOY, M.; WEBSTER, J. P.; MACDONALD, D. W. Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. **Proceedings of Royal Society B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1452, p. 1591-4, 2000.

BLACKMAN, M. J.; CARRUTHERS, V. B. Recent insights into apicomplexan parasite egress provide new views to a kill. **Current Opinion Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 459-64, 2013.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79-88, 2008.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 438-42, 2002.

BOUGDOUR, A.; TARDIEUX, I.; HAKIMI, M. A. Toxoplasma exports dense granule proteins beyond the vacuole to the host cell nucleus and rewires the host genome expression. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 334-43, 2014.

BRADLEY, P. J.; SIBLEY, L. D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 582-7, 2007.

BUXTON, D.; FINLAYSON, J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 96, n. 3, p. 319-33, 1986.

CALAMY, L. et al. Severe congenital toxoplasmosis secondary to toxoplasma reactivation in an HIV-infected mother. **Archives of Pediatric**, v. 22, n. 2, p. 181-4, 2015.

CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of Toxoplasma cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83-9, 2007.

CASTANO, P. et al. Experimental ovine toxoplasmosis: influence of the gestational stage on the clinical course, lesion development and parasite distribution. **Veterinary Research**, v. 47, p. 43, 2016.

CERRO, L. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in cats (*Felis catus*, Linnaeus 1758) living in Lima, Peru. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 90-3, 2014.

COLE, R. A. et al. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-30, 2000.

CORREA, D. et al. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 651-60, 2007.

DARD, C. et al. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 6, p. 492-506, 2016.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. et al. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1129-37, 15 2007.

DESMONTS, G.; NAOT, Y.; REMINGTON, J. S. Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: diagnosis of acute congenital and acquired *Toxoplasma* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 486-91, 1981.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J. S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 562-8, 1980.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, 2002.

_____. The History of *Toxoplasma gondii*-The First 100 Years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008.

_____. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 877-82, 2009.

DUBEY, J. P. et al. Isolation and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from alpaca (*Vicugna pacos*) and sheep (*Ovis aries*). **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 8, p. 1503-7, 2014.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. **Journal of Protozoology**, v. 19, n. 1, p. 155-77, 1972.

DUBEY, J. P. et al. Prevalence of viable *Toxoplasma gondii* in beef, chicken, and pork from retail meat stores in the United States: risk assessment to consumers. **Jornal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1082-93, 2005.

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, n. 2, p. 267-99, 1998.

DUBEY, J. P. et al. Characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from free range chickens from Parana, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 229-34, 2003.

DUMETRE, A. et al. Mechanics of the *Toxoplasma gondii* oocyst wall. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 110, n. 28, p. 11535-40, 2013.

DUNAY, I. R.; FUCHS, A.; SIBLEY, L. D. Inflammatory monocytes but not neutrophils are necessary to control infection with *Toxoplasma gondii* in mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 4, p. 1564-70, 2010.

FANCOURT, B. A. et al. Beyond the disease: Is *Toxoplasma gondii* infection causing population declines in the eastern quoll (*Dasyurus viverrinus*)? **International Journal for Parasitology: Parasites & Wildlife**, v. 3, n. 2, p. 102-12, 2014.

FEITOSA, T. F. et al. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraiba state, Brazil. **Parasitology Research**, 2016.

FERGUSON, D. J. P. Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: Small science, large characters. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 871-5, 2009.

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

FRANCIA, M. E.; STRIEPEN, B. Cell division in apicomplexan parasites. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 125-36, 2014.

FRANCO, P. S. et al. *Calomys callosus* chronically infected by *Toxoplasma gondii* clonal type II strain and reinfected by Brazilian strains is not able to prevent vertical transmission. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 181, 2015.

FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis: parasite, life cycle, pathology and immunology. In: HAMMOND, D. M. L., P. L. (Ed.). **The Coccidia**. Baltimore, Maryland.: Univ. Park Press., 1973. p.343 - 410. ISBN 0-8391-0732-3.

GAZZINELLI, R. et al. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 1, p. 175-80, 1992.

GAZZINELLI, R. T. et al. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 2, p. 132-8, 2014.

GAZZINELLI, R. T. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 6, p. 2533-43, 1994.

GONDIM, L. F. P. et al. Characterization of an IgG monoclonal antibody targeted to both tissue cyst and sporocyst walls of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 163, p. 46-56, 2016.

GRIGG, M. E. et al. Success and virulence in *Toxoplasma* as the result of sexual recombination between two distinct ancestries. **Science**, v. 294, n. 5540, p. 161-5, 2001.

GRIMWOOD, J.; MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells is host cell cycle dependent. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 10, p. 4099-104, 1996.

GUBBELS, M. J. et al. Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 703-711, 2005.

GUO, M. et al. A Systematic meta-analysis of *Toxoplasma gondii* prevalence in food animals in the United States. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 13, n. 3, p. 109-18, 2016.

HALOVA, D. et al. *Toxoplasma gondii* in Ireland: seroprevalence and novel molecular detection method in sheep, pigs, deer and chickens. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, n. 2, p. 168-73, 2013.

HARDING, C. R. et al. Gliding associated proteins play essential roles during the formation of the inner membrane complex of *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 2, p. e1005403, 2016.

HARDING, C. R.; MEISSNER, M. The inner membrane complex through development of *Toxoplasma gondii* and Plasmodium. **Cell Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 632-41, 2014.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, n. 2, p. 84-105, 2003.

HOLEC-GASIOR, L.; DOMINIAK-GORSKI, B.; KUR, J. First report of seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in sheep in Pomerania, northern Poland. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 4, p. 604-7, 2015.

HOTOP, A. et al. Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1473-80, 2014.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, n. 6, p. 1561-6, 1995.

HOWE, L. et al. Four cases of fatal toxoplasmosis in three species of endemic New Zealand birds. **Avian Diseases**, v. 58, n. 1, p. 171-5, 2014.

HUNG, C. C. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection and incidence of toxoplasma encephalitis in non-haemophilic HIV-1-infected adults in Taiwan. **International Journal of STD & AIDS**, v. 16, n. 4, p. 302-6, 2005.

JACOBS, L.; LUNDE, M. N. Hemagglutination test for toxoplasmosis. **Science**, v. 125, n. 3256, p. 1035, 1957.

JACOT, D. et al. Apicomplexan energy metabolism: carbon source promiscuity and the quiescence hyperbole. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 1, p. 56-70, 2016.

KHAN, A. et al. Genetic analyses of atypical *Toxoplasma gondii* strains reveal a fourth clonal lineage in North America. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 6, p. 645-55, 2011.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-32, 2004.

KISSINGER, J. C.; DEBARRY, J. Genome cartography: charting the apicomplexan genome. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 8, p. 345-54, 2011.

KODYM, P. et al. Incidence, immunological and clinical characteristics of reactivation of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 3, p. 600-7, 2015.

LALIBERTE, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 12, p. 1900-15, 2008.

LANGONI, H. et al. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1327-30, 2013.

LANGONI, H. et al. Serological profile of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in apparently healthy dogs of the city of Botucatu, Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 142-148, 2006.

LEKUTIS, C. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-92, 2001.

LEVINE, N. D. Taxonomy of *Toxoplasma*. **Journal of Protozoology**, v. 24, n. 1, p. 36-41, 1977.

LI, Y. N. et al. Seroprevalence and genotype of *Toxoplasma gondii* in pigs, dogs and cats from Guizhou province, Southwest China. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 214, 2015.

LINDSTROM, I. et al. Isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from Ugandan chickens reveals frequent multiple infections. **Parasitology**, v. 135, n. Pt 1, p. 39-45, 2008.

LOPES, C. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlandia, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865-75, 2016.

LOURIDO, S.; MORENO, S. N. The calcium signaling toolkit of the Apicomplexan parasites *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium* spp. **Cell Calcium**, v. 57, n. 3, p. 186-93, 2015.

LYNCH, M. I. et al. Lacrimal secretory IgA in active posterior uveitis induced by *Toxoplasma gondii*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 861-4, 2004.

MASHAYEKHI, M. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Immunity**, v. 35, n. 2, p. 249-59, 2011.

MCALLISTER, M. M. Diagnosis and control of bovine neosporosis. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, 2016.

MERCIER, C. et al. Dense granules: are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 8, p. 829-49, 2005.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, n. 1, p. 11-20, 1994.

MINOT, S. et al. Admixture and recombination among *Toxoplasma gondii* lineages explain global genome diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 33, p. 13458-13463, 2012.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, n. 9425, p. 1965-76, 2004.

MUGRIDGE, N. B. et al. Effects of sequence alignment and structural domains of ribosomal DNA on phylogeny reconstruction for the protozoan family sarcocystidae. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 12, p. 1842-53, 2000.

MUST, K.; LASSEN, B.; JOKELAINEN, P. Seroprevalence of and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in cats in Estonia. **Vector Borne and Zoonotic Disease**, v. 15, n. 10, p. 597-601, 2015.

NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal of Parasitology**, v. 47 Suppl, p. S29-37, 2009.

OI, M. et al. Comparison of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in shelter cats and Dogs during 1999-2001 and 2009-2011 in Tokyo, Japan. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135956, 2015.

OPSTEEGH, M. et al. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in domestic cats in The Netherlands. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, n. 3-4, p. 317-26, 2012.

POIROTTE, C. et al. Morbid attraction to leopard urine in *Toxoplasma*-infected chimpanzees. **Current Biology**, v. 26, n. 3, p. R98-9, 2016.

POUKCHANSKI, A. et al. *Toxoplasma gondii* sporozoites invade host cells using Two novel paralogues of RON2 and AMA1. **Plos One**, v. 8, n. 8, 2013.

RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2011.

SABIN, A. B.; FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (*Toxoplasma*). **Science**, v. 108, n. 2815, p. 660-3, 1948.

SADRAIE, J.; BAHADORY, E. S.; MARSUSI, V. The merits of designed ELISA avidity kit in detection of *Toxoplasma gondii* IgG antibody in laboratory conditions. **Tropical Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 40-3, 2013.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-91, 1988.

SANTANA, S. S. et al. CCp5A Protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1305, 2015.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. E. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 432-7, 2013.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82-5, 1992.

SU, C. et al. Globally diverse *Toxoplasma gondii* isolates comprise six major clades originating from a small number of distinct ancestral lineages. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 109, n. 15, p. 5844-9, 2012.

SUN, X. J. et al. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. **Parasites & Vectors**, v. 6, 2013.

TAHARA, M. et al. A host cell membrane microdomain is a critical factor for organelle discharge by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 65, n. 5 Pt A, p. 378-388, 2016.

TEHRANI-SHARIF, M. et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies of stray cats in Garmsar, Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p. 306-8, 2015.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, 2000.

THOMAS, L. F. et al. The spatial ecology of free-ranging domestic pigs (*Sus scrofa*) in Western Kenya. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 46, 2013.

TILAHUN, G. et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens (*Gallus domesticus*) from Addis Ababa, Ethiopia. **Journal Parasitology**, v. 99, n. 4, p. 740-1, 2013.

TOMITA, T. et al. The *Toxoplasma gondii* cyst wall protein CST1 is critical for cyst wall integrity and promotes bradyzoite persistence. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 12, p. e1003823, 2013.

VANWORMER, E. Using molecular epidemiology to track *Toxoplasma gondii* from terrestrial carnivores to marine hosts: implications for public health and conservation (vol 8, e2852, 2014). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

VARGAS-VILLAVICENCIO, J. A.; BESNE-MERIDA, A.; CORREA, D. Vertical transmission and fetal damage in animal models of congenital toxoplasmosis: A systematic review. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 195-204, 2016.

VITALIANO, S. N. et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from Brazilian wildlife revealed abundant new genotypes. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 276-83, 2014.

VOLLER, A. et al. A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody. **Journal of Clinical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 150-3, 1976.

VYAS, A. et al. Behavioral changes induced by *Toxoplasma* infection of rodents are highly specific to aversion of cat odors. **Proceedings of the National Academy of Science U S A**, v. 104, n. 15, p. 6442-7, 2007.

WEBSTER, J. P. The effect of *Toxoplasma gondii* on animal behavior: playing cat and mouse. **Schizophrenia Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 752-6, 2007.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. D391-405, 2000.

WILHELM, C. L.; YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 9, p. 409-20, 2014.

WORTH, A. R.; LYMBERG, A. J.; THOMPSON, R. C. Adaptive host manipulation by *Toxoplasma gondii*: fact or fiction? **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 4, p. 150-5, 2013.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156-71, 2015.

Capítulo II

Avaliação de peptídeos sintéticos derivados de marcadores imunodominantes do taquizoíto de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da infecção em galinhas.

RESUMO

O desenvolvimento de novas ferramentas capazes de detectar as infecções causadas por *Toxoplasma gondii* é uma necessidade cada vez mais evidente, devido aos danos que a toxoplasmose pode causar quando infectam os seres humanos e outros animais. As galinhas são frequentemente encontradas albergando cepas atípicas do parasito e estão entre as espécies mais relevantes na transmissão do *Toxoplasma gondii*. Sendo que a carne crua ou mal cozida desses animais representa uma fonte importante de infecção para os seres humanos e outros animais, mostrando ser uma necessidade essencial desenvolver estudos no que se refere ao diagnóstico destas infecções, o que pode resultar em uma diminuição da taxa de transmissão do parasito. Portanto, determinar a fonte de infecção ambiental pode resultar em políticas mais adequadas de saúde pública contra diferentes vias de infecção por *T. gondii*. Assim, no presente estudo avaliamos o potencial de novos peptídeos sintéticos como ferramentas de diagnóstico, preditos *in silico* a partir de proteínas imunodominantes de *T. gondii*, determinando-se os níveis de anticorpos IgY específicos contra os peptídeos selecionados, utilizando 120 amostras de soros obtidas a partir de galinhas criadas de forma extensiva naturalmente expostas ao risco de infecção por *T. gondii*. A análise *in silico* foi realizada para identificar epítomos de células B em sequências completas de proteínas da superfície do parasita (SAG2Y), de micronemas (MIC1), de proteínas associadas à micronema (M2AP), de proteína de grânulo denso (GRA10) e de roptrias (ROP2 e ROP7), dentre as quais, seis peptídeos com maiores *scores* de predição foram selecionados para serem quimicamente sintetizados. Nossos resultados demonstraram que a reatividade e positividade dos peptídeos foram semelhantes ao observado com STAg, e o peptídeo ROP7 foi estatisticamente diferente. A combinação de MIC1+ROP2 (Acurácia = 0,87) apresentou resultados particularmente promissores e estudos adicionais deverão ser realizados visando validar a aplicação desta combinação de peptídeos como ferramenta diagnóstica para a infecção por *T. gondii* em galinhas criadas extensivamente.

Palavras-chave: Diagnóstico, *Toxoplasma gondii*, peptídeos sintéticos, ELISA, galinhas.

SUMMARY

The development of new diagnostic tools to detect *Toxoplasma gondii* infections is an increasingly evident necessity, due to the problems that toxoplasmosis can cause when infecting humans and other animals. Chickens are often found sheltering atypical strains of the parasite and are among the most important species in the transmission of *Toxoplasma gondii*. Since the raw or undercooked meat of these animals represents a major source of infection for humans and other animals, shown to be a critical need to develop studies regarding the diagnosis of these infections, which can result in a decrease in the rate of transmission of the parasite. Determining the source of environmental infection could result in more adequate public health policies against different infection routes by *T. gondii*. Thus, in this study we evaluated the potential of novel synthetic peptides, predicted from *T. gondii* proteins, as diagnostic tools, and determined the levels of IgY antibodies specific to the peptides using serum samples obtained from free-range chickens naturally infected by *T. gondii*, due to feed habits. The *in silico* analysis were performed to identify B cell epitopes in complete amino acid sequences of parasite proteins surface antigen (SAG2Y), microneme 1, microneme 2 associated protein (MIC1 and M2AP), dense granule protein 10 (GRA10), rhoptries 2 and 7 (ROP2 and ROP7), and six peptides with highest prediction score were selected for subsequent chemical synthesis. Our results showed that reactivity and positivity were similar to the observed with STAg, while the reactivity to ROP7 was even statistically different. The combination of MIC1 and ROP2 (Accuracy = 0,87) had results particularly interesting and further studies should be carried out to confirm the application of this combination of synthetic peptides as diagnostic tool for diagnosis of *T. gondii* infection in chickens.

Key words: Diagnosis, *Toxoplasma gondii*, Synthetic peptides, ELISA, Chickens.

INTRODUÇÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que pertence ao filo Apicomplexa, o qual contém vários parasitos de relevância médica e veterinária (LIU, Q. et al., 2015). É um protozoário cosmopolita muito bem-sucedido, apto a infectar, supostamente, todos os animais homeotérmicos (COLE et al., 2000; DUBEY, 2002; FERGUSON, 2009), sendo que na fase aguda é capaz de se replicar em todos os tecidos - células nucleadas - de seus hospedeiros (LEKUTIS et al., 2001). Os hospedeiros definitivos do *Toxoplasma gondii* são os felídeos (como o gato - *Felis catus* - e outras espécies da família *Felidae*), onde ocorre o ciclo sexuado do parasita. O homem e outros animais homeotérmicos (exceto os Felídeos) representam os hospedeiros intermediários, onde o parasita realiza apenas o ciclo assexuado (TENTER et al., 2000). A capacidade do parasita em se disseminar está intrinsecamente relacionada às várias formas de transmissão, como, por exemplo, o contato com solo contaminado com oocistos esporulados (RANDALL; HUNTER, 2011), ou a veiculação hídrica de oocistos (KIM; WEISS, 2004). A ingestão de carne crua ou mal cozida contaminada com cistos está relacionada à transmissão por meio de bradizoítas (THOMAS et al., 2013).

A superfície do *T. gondii*, tanto da forma taquizoíta como da bradizoíta, é recoberta por uma família de antígenos ancorados por âncora de glicosilfosfatidilinositol (SAGs) e antígenos relacionados à SAG (SRS) (LEKUTIS et al., 2001) e durante o processo de adesão e invasão celular utilizam um conjunto de organelas funcionais, características do filo, conhecidas como micronemas, roptrias e grânulos densos (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; PAREDES-SANTOS et al., 2012). Portanto, os genes que codificam proteínas antigênicas imunodominantes do parasita são bons alvos moleculares para a clonagem e produção de antígenos recombinantes de importância diagnóstica (HOLEC-GASIOR et al., 2014).

As galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) criadas de forma extensiva são ótimas indicadoras de contaminação do solo com oocistos do parasito, já que se alimentam a partir dele (DUBEY et al., 2005). Além disso, podem ser frequentemente encontradas albergando cepas atípicas do parasito, dependendo da região geográfica onde se encontram (LOPES et al., 2016), situando-se entre as espécies mais relevantes na transmissão do *Toxoplasma gondii*. Portanto, a carne crua ou mal cozida desses animais representa uma fonte de infecção importante para os seres humanos e outros

animais (ZHAO et al., 2012), mostrando ser uma necessidade essencial desenvolver estudos no que se refere ao diagnóstico destas infecções, o que pode resultar em uma diminuição da taxa de transmissão do parasito. Galinhas previamente imunizadas, por Klemperer em 1893, possuíam proteínas neutralizantes na gema dos ovos e, a partir dessa observação, vários pesquisadores publicaram as funções biológicas destes anticorpos, os quais foram posteriormente denominados de Imunoglobulina Y (IgY) (MUNHOZ et al., 2014). Os anticorpos IgY policlonais quando utilizados em técnicas de imunodiagnóstico, em mamíferos, evitam resultados falso-positivos pois estes não interagem com proteínas do sistema Complemento e nem com receptores do fragmento Fc de mamíferos (CAI et al., 2012), não se ligam à proteína G de *Streptococcus spp.* e nem à proteína A de *Staphylococcus aureus* (KARLSSON et al., 2004). Os anticorpos IgY são funcionalmente similares à IgG de mamíferos e na clara do ovo estão presentes também os anticorpos IgM e IgA, sendo que, proporcionalmente, a concentração dos anticorpos IgY é maior do que IgM e IgA (WARR et al., 1995).

Para diagnosticar a infecção em animais, frequentemente recorre-se ao isolamento de cistos teciduais, fluidos corporais, detecção de ácidos nucleicos (SUN et al., 2015), ou pela verificação de anticorpos séricos contra o parasito, uma vez que os mesmos podem durar por anos, e eventualmente, durante toda a vida do hospedeiro (SADRAIE et al., 2013). Dentre os métodos utilizados que detectam anticorpos específicos em amostras de soro de galinhas estão a hemaglutinação indireta (IHA), teste de imunofluorescência indireta (RIFI), teste de aglutinação em látex (LAT), teste de aglutinação modificada (MAT), e ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (SUN et al., 2015). Tem sido demonstrado que há uma maior sensibilidade e especificidade do ELISA, utilizando antígenos solúveis totais do parasito (STAg), quando comparado com o MAT (HAMIDINEJAT et al., 2014). No entanto, como no ELISA utilizando STAg como preparação antigênica há problemas para padronização dos imunoensaios, particularmente relacionados aos diferentes protocolos de extração e fonte de suspensões parasitárias, o ideal para a melhoria do teste é a utilização de proteínas recombinantes ou sintéticas, com as vantagens de fácil preparação e padronização, além de uma composição precisa do antígeno (HOLEC-GASIOR, 2013). A predição *in silico* e síntese de epítomos dos antígenos mais promissores para o desenvolvimento de testes, de ferramentas diagnósticas, ou até de vacinas peptídicas vem sendo utilizadas ao longo dos últimos anos (AHN et al., 2005; BEGHETTO et al., 2006; DRAPALA et al., 2015; FERRA et al., 2015a;2015b; LIU, L. L. et al., 2012;

MAKSIMOV et al., 2012; PERSAT et al., 2012; WANG, Y. et al., 2013; WANG, Y. H. et al., 2013).

Deste modo, no presente estudo selecionamos peptídeos imunodominantes, preditos *in silico*, dentre os antígenos provenientes de organelas secretórias (ROP, MIC, GRA) ou de superfície do *Toxoplasma gondii* (SAG), com potencial diagnóstico previamente descrito em outras espécies, determinando-se quais peptídeos poderiam apresentar-se como mais eficazes para o imunodiagnóstico da infecção por *T. gondii* em galinhas naturalmente infectadas. Depois de inferir quais foram os peptídeos que apresentaram melhores performances para o diagnóstico da toxoplasmose, uma combinação de tais peptídeos foi analisada, visando obter maiores índices de especificidade e sensibilidade. Assim, desenvolvemos um imunoensaio que apresenta índices semelhantes de especificidade e sensibilidade ao da detecção sérica da imunoglobulina Y (IgY) anti-*T. gondii*, quando comparado ao antígeno solúvel total de *Toxoplasma gondii* (STAg).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processamento dos soros

Foram coletadas 120 amostras de sangue de galinhas criadas de forma extensiva em diversas localidades do município de Uberlândia, podendo ser de criações domiciliares e/ou de pequenas propriedades localizadas nas regiões urbana e peri-urbana. As amostras de sangue foram coletadas por meio da punção da veia braquial e, após a coleta, o soro foi obtido por centrifugação (1500g por 5 minutos), sendo posteriormente armazenadas em freezer -20°C. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia aprovou todos os procedimentos experimentais (nº054/11, UFU-CEUA).

Antígenos

Antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito previamente por Carvalho e colaboradores (CARVALHO et al., 2008), com algumas modificações. Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram coletados de camundongos, centrifugados a

400g e adicionado inibidores de proteases diluídos em água ultrapura (*Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science, Penzberg, Bavaria, Germany*). Posteriormente foram realizados dez ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e em banho maria a 37°C, respectivamente. Em seguida foram realizados seis ciclos de um minuto de sonicação e posterior centrifugação (10.000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado para quantificação proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas do STAg foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para obter os peptídeos sintéticos, as sequências completas dos aminoácidos do antígeno de superfície 2Y (SAG2Y), da proteína 1 de micronema e da proteína 2 associada a micronema (MIC1 e M2AP), da proteína 10 de grânulo denso (GRA10) e das proteínas 2 e 7 de roptria (ROP2 e ROP7) foram obtidas através do banco de dados de *Toxoplasma* (www.toxodb.org). As sequências obtidas foram analisadas utilizando ferramentas de predição de epítomos de células B (*Chou & Fasman beta-Turn prediction* and *Emini surface accessibility prediction*), as quais estão disponíveis em *Immune Epitope Database Analysis Resource* (IEDB-AR), acessando-se o sítio http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input. A predição de epítomos lineares, a partir da sequência da proteína de cada antígeno escolhido, foi realizada utilizando-se o método “Bepipred Linear Epitope Prediction” com um ponto de corte estabelecido em 1,5 (LARSEN et al., 2006). Sequências com 15 aminoácidos com os escores mais elevados foram escolhidos como antígenos e utilizados para síntese dos peptídeos. BLASTP das sequências peptídicas resultou num total alinhamento com os respectivos antígenos de *T. gondii* e nenhum alinhamento significativo com proteínas de outros organismos. O grau de pureza dos peptídeos sintetizados foram avaliados como 95% puros, quando avaliados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, e a sequência correta de aminoácidos de cada peptídeo foi confirmada por espectrometria de massa, de acordo com as especificações do fabricante (GenScript USA Inc. Piscataway, New Jersey, USA). Como demonstrado na Tabela 1, os peptídeos foram conjugados com soro albumina bovina (BSA) pela inserção de cisteína na posição N-terminal do aminoácido e posteriormente liofilizados. Antes da utilização, cada peptídeo foi dissolvido em água ultrapura e armazenado (-20°C), de acordo com as instruções do fabricante.

Seleção dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados (SAG2Y, ROP2, ROP7, GRA10, MIC1 e MIC2-M2AP) foram testados separadamente, por ELISA, nos soros de galinhas obtidas do município de Uberlândia-MG. Os peptídeos testados isoladamente que apresentaram as melhores características diagnósticas, após os testes sorológicos, foram utilizados para desenvolvimento de uma combinação de peptídeos antigênicos, de acordo com os índices de especificidade, sensibilidade e acurácia obtidos para esses peptídeos.

ELISA para detecção de IgY

Para a detecção de anticorpos IgY específicos de *T. gondii* por ELISA indireto utilizamos placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA). As placas foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. Realizamos três lavagens com tampão fosfato de sódio contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) de cada placa e posteriormente bloqueamos os sítios de ligação inespecíficos com 100 microlitros de PBS-T contendo 5% de leite desnatado (PBS-TM 5%), por 1 hora à temperatura ambiente. Em sequência, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídos em PBS-TM 5%, na proporção de 1: 100 em duplicata, durante 1 hora a 37°C. Soros conhecidamente positivos e negativos também foram incluídos em cada placa como controle. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgY marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) diluído 1:30000 por 1 hora a 37°C. Após o processo final de lavagem, as reações foram reveladas com substrato enzimático H_2O_2 a 0,03% e cromógeno ABTS (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico - Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA). As densidades ópticas (DO) foram determinadas a 405 nanômetros em leitora de microplacas (Tecan Spectra Classic, Grödig, Austria).

Para os peptídeos, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA) foram sensibilizadas com os peptídeos selecionados (10 µg/mL) em tampão Fosfato (pH 6,5), por 18 horas a 4°C. Realizamos três lavagens com PBS-T, de cada placa e posteriormente bloqueamos os sítios inespecíficos com PBS-BSA (soro albumina bovina) 1% por 1 hora em temperatura ambiente. Em sequência, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídos em NaCl 7% (DUBEY, 2010), na proporção de 1: 100 em duplicata, durante 1

hora a 37°C. Soros de controle positivo e negativo também foram incluídos em cada placa. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgY marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.), diluído em PBS-BSA 1% (1:30000) por 1 hora a 37°C. Em ambas as reações foram adicionados poços controles sensibilizados com BSA para assegurar que a reação observada era específica para as sequências de peptídeos e não para o esqueleto de BSA onde os peptídeos foram ligados. Após o processo final de lavagem, as reações foram reveladas com substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno ABTS. A DO foi lida a 405 nanômetros em leitora de ELISA.

Os valores foram calculados em DO para STAg e em DO líquida (valor obtido com os peptídeos subtraído do valor obtido com o BSA) para os peptídeos. O ponto de corte (*cut-off*) da reação foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos somada a três desvios padrão. Níveis de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / DO \text{ do } cut-off$, como descrito (SILVA et al., 2002). Amostras com valores de $IE > 1,2$ foram consideradas positivas.

Análise estatística.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos softwares *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) e *MedCalc*, sendo que os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos utilizando One-way ANOVA com o pós-teste de Bonferroni e os índices de positividade para as diferentes preparações antigênicas foram analisados pelo teste exato de Fisher. Curvas ROC (GREINER et al., 1995) também foram determinadas utilizando-se este aplicativo. Para calcular a sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos e a razão de verossimilhança foi utilizado o software *MedCalc* para Windows, versão 11.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Peptídeos sintéticos possuem positividade e reatividade similares ao STAg.

Inicialmente, a reatividade (níveis de anticorpos) e a positividade de 120 amostras de soros de galinhas criadas extensivamente foram determinadas por ELISA indireto, com utilização de STAg e os peptídeos sintéticos (SAG2Y, GRA10, ROP2, ROP7, MIC1 e M2AP) propostos como antígeno (Tabela 1).

Tabela 1- Sequências de aminoácidos de peptídeos sintéticos dos epítomos preditos de célula B de antígenos imunodominantes de *Toxoplasma gondii*.

Antígeno	Número total de aminoácidos	Posição Inicial e Final	Sequência
SAG2Y	367 aa	296 - 310 aa	BSA-CPPNPPSGGSGRTGTP
ROP 2	407 aa	100 - 114 aa	BSA-CGGSDGGGEPPQTPRP
ROP 7	542 aa	528 - 542 aa	BSA-CGTLTGDDDMPPPET
MIC 1	440 aa	248 - 262 aa	BSA-CGGPPSQPPMQPAD
MIC2- M2AP	308 aa	260 - 274 aa	BSA-CPVPPQDGENPDSPQN
GRA 10	894 aa	590 - 604 aa	BSA-CSRVP PPPPPPPG SVG

Os resultados obtidos utilizando os peptídeos foram comparados com aqueles obtidos com STAg (Figura 1). Os níveis de anticorpos IgY foram expressos em Índice ELISA (IE) para cada antígeno. O IE médio dos peptídeos sintéticos foram 1,56 (SAG2Y), 1,55 (MIC1), 1,83 (MIC2-M2AP), 1,90 (ROP2), 1,97 (ROP7), 1,45 (GRA10) e o STAg foi de 1,64. O peptídeo ROP7 apresentou um nível médio de anticorpos mais elevado e foi o único peptídeo estatisticamente diferente entre os peptídeos experimentais e STAg ($P < 0,05$) (Figura 1A).

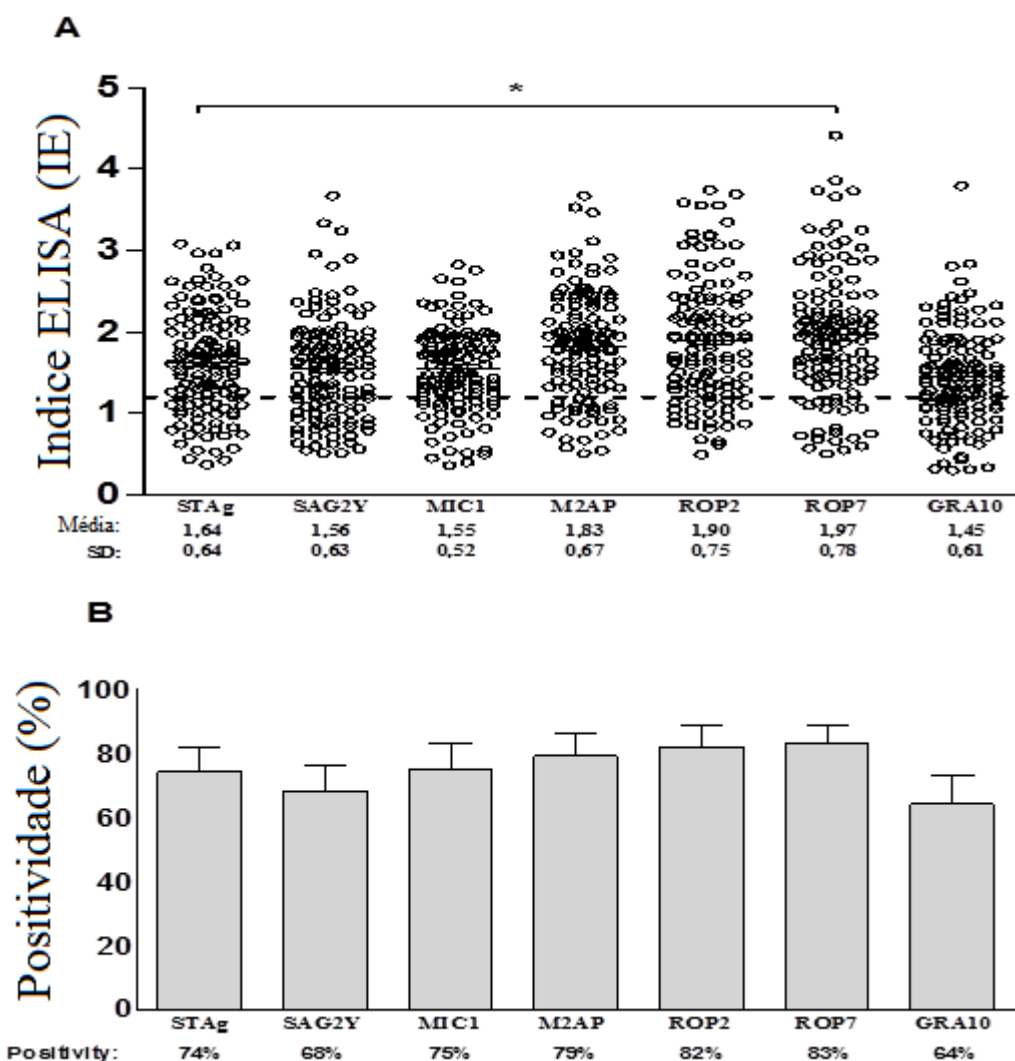


Figura 1. Reatividade dos peptídeos sintéticos para a detecção de anticorpos IgY anti-*T. gondii* em amostras de soros de galinhas criadas de forma extensiva coletadas em várias áreas de Uberlândia ($n = 120$). Os níveis de anticorpos IgY (A) e a positividade (B) foram avaliados por ELISA indireto. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) e valores maiores que 1,2 foram considerados positivos. A linha pontilhada indica o *cut-off* da reação. Significância estatística entre os níveis de IgY para os peptídeos sintéticos e o STAg foram determinados por One-way Anova, enquanto que as diferenças entre as positivities foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. $*P < 0,05$.

O STAg apresentou 74% de positividade, enquanto os peptídeos SAG2Y, MIC1, M2AP, ROP2, ROP7 e GRA10 apresentaram percentuais de positividade de 68, 75, 79, 82, 83 e 64%, respectivamente (Fig. 1B). Não houve diferença significativa de positividade entre os peptídeos e STAg. Estes resultados indicaram que os peptídeos mostraram reatividade e positividade semelhantes aos observados com STAg.

Potencial diagnóstico dos peptídeos

A fim de confirmar o potencial diagnóstico de peptídeos, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, foram avaliadas (Tabela 2). STAg foi considerado o valor de referência. Considerando a sensibilidade dos testes, os resultados para os peptídeos isolados foram SAG2Y (82%), MIC1 (90%), ROP2 (94%), MIC2-M2AP (92%), ROP7 (93%) e GRA10 (73%). Em relação à especificidade do ensaio, o desempenho dos peptídeos foi: ROP2 (55%), seguido por ROP7 (48%), MIC1 (68%), SAG2Y (71%), MIC2-M2AP (45%) e GRA10 (61%).

O valor preditivo positivo foi de 86% para ROP2, 84% (ROP7), 89% (MIC1), 83% (M2AP), 89% (SAG2Y) e 84% (GRA10). Em relação ao valor preditivo negativo, o peptídeo que apresentou melhor resultado foi ROP2 (77%), seguido por ROP7 (71%), MIC1 (70%), M2AP (67%) SAG2Y (58%) e GRA10 (44%). Considerando-se os índices de acurácia para os peptídeos testados, o peptídeo com o maior valor foi MIC1 (84%) e ROP2 (84%), seguido por ROP7 (82%), M2AP (80%), SAG2Y (79%) e GRA10 (70%).

Tabela 2. Dados relativos à capacidade diagnóstica dos peptídeos sintéticos testados isoladamente em amostras de galinhas caipiras criadas no município de Uberlândia.

Antígenos	Amostras Soropositivas (%)	Amostras Soronegativas (%)	Sensibilidade (I.C. 95%)	Especificidade (I.C. 95%)	VPP	VPN	Acurácia (%)
STAg	89/89 (100)	31/31(100)	100% (96 - 100)	100% (87 - 100)	100%	100%	1
MIC1	80/89 (90)	21/31 (68)	90% (81 – 95)	68% (48 – 83)	89%	70%	84
ROP2	84/89 (94)	17/31 (55)	94% (87 – 98)	55% (36 – 72)	86%	77%	84
ROP7	83/89 (93)	15/31 (48)	93% (85 – 97)	48% (30 – 66)	84%	71%	82
M2AP	82/89 (92)	14/31 (45)	92% (84 – 96)	45% (27 – 64)	83%	67%	80
SAG2Y	73/89 (82)	22/31 (71)	82% (80 – 95)	71% (51 – 85)	89%	58%	79
GRA10	65/89 (73)	19/31 (61)	73% (62 – 82)	61% (42 – 78)	84%	44%	70

VPP: Valor preditivo positivo,

VPN: Valor preditivo negativo.

I.C. 95%: Intervalo de confiança 95%

A precisão do teste foi examinada pela curva ROC (Figura 2) sendo considerada proporcionalmente relacionada com a área sob a curva (AUC). Peptídeos com maior AUC foram MIC1 (0,893) e ROP2 (0,853) para os peptídeos isolados.

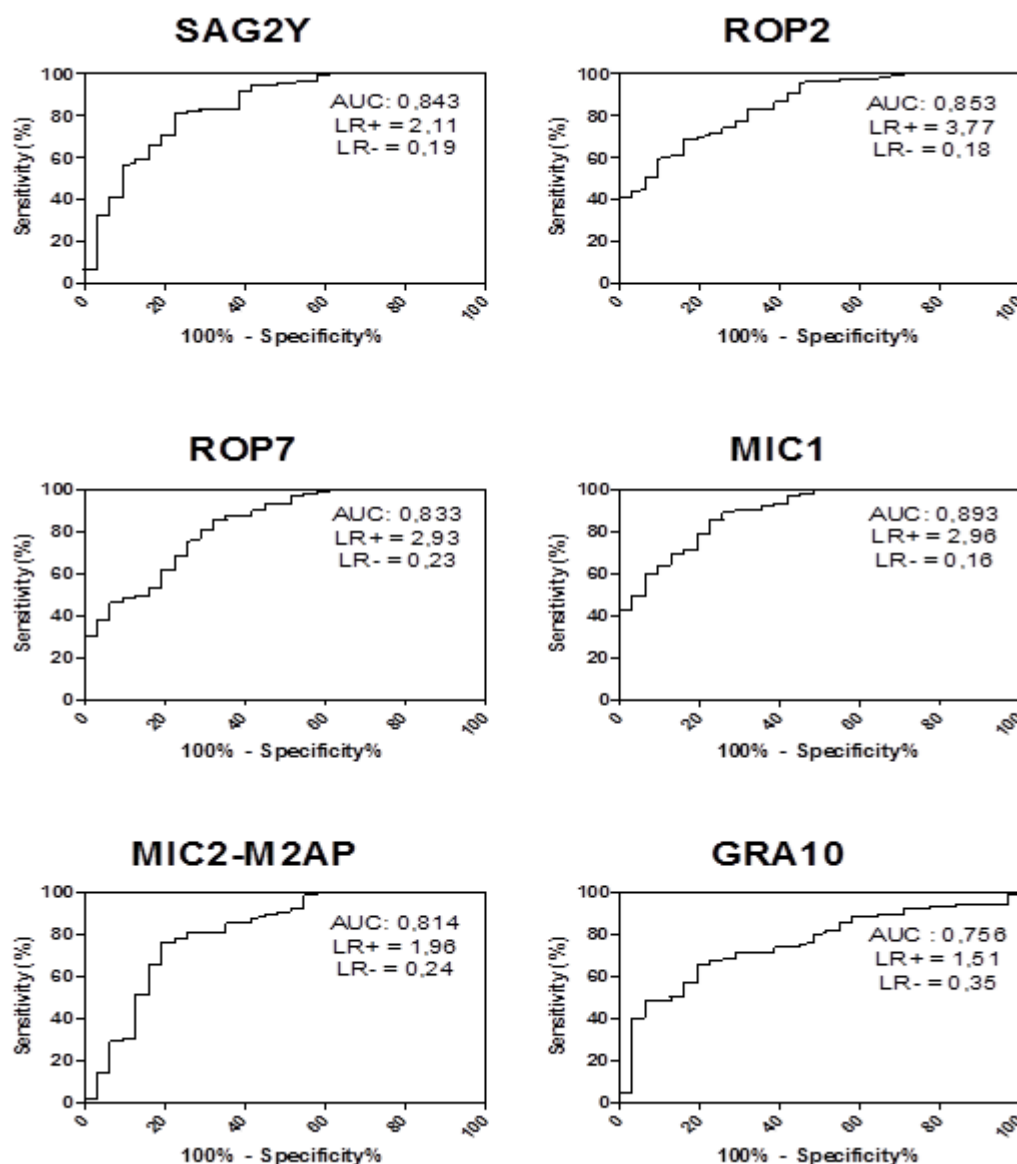


Figura 2. Análises de curva ROC (*Receiver operating characteristics*) mostrando a relação entre sensibilidade e especificidade dos peptídeos isolados, em amostras de galinhas usando ELISA-IgY. A figura mostra eficiência diagnóstica representada pela Área sob a curva (AUC), razão de verossimilhança positiva (LR+) e razão de verossimilhança negativa (LR-).

Como uma forma complementar de descrever o desempenho da sensibilidade e especificidade dos peptídeos testados, utilizamos as Razões de verossimilhança positiva e negativa (LR+ e LR-, respectivamente) (Figura 2). A razão de verossimilhança expressa quantas vezes mais provável (ou menos) se encontra um resultado de um teste em pessoas doentes comparadas com as saudáveis. Com os peptídeos isolados obtivemos as seguintes Razões (Figura 2): SAG2Y (LR+ = 2,11; LR- = 0,19), ROP2 (LR+ = 3,77; LR- = 0,18), ROP7 (LR+ = 2,93; LR- = 0,23), MIC1 (LR+ = 2,96; LR- = 0,16), MIC2-M2AP (LR+ = 1,96; LR- = 0,24), GRA10 (LR+ = 1,51; LR- = 0,35).

Potencial diagnóstico das combinações de peptídeos sintéticos

De acordo com os resultados supracitados definimos as combinações de peptídeos adotando-se como parâmetro de escolha a sensibilidade, especificidade e acurácia próximas uma das outras, dos peptídeos mais promissores, visando determinar os índices de reatividade frente às amostras de soros de galinhas naturalmente expostas à infecção em comparação ao antígeno solúvel do *Toxoplasma gondii* (STAG), também determinados por ELISA indireto. Foram selecionadas as seguintes combinações de peptídeos: SAG2Y+GRA10, ROP7+M2AP, MIC1+ROP2. Como demonstrado na Figura 3, os seguintes resultados foram obtidos:

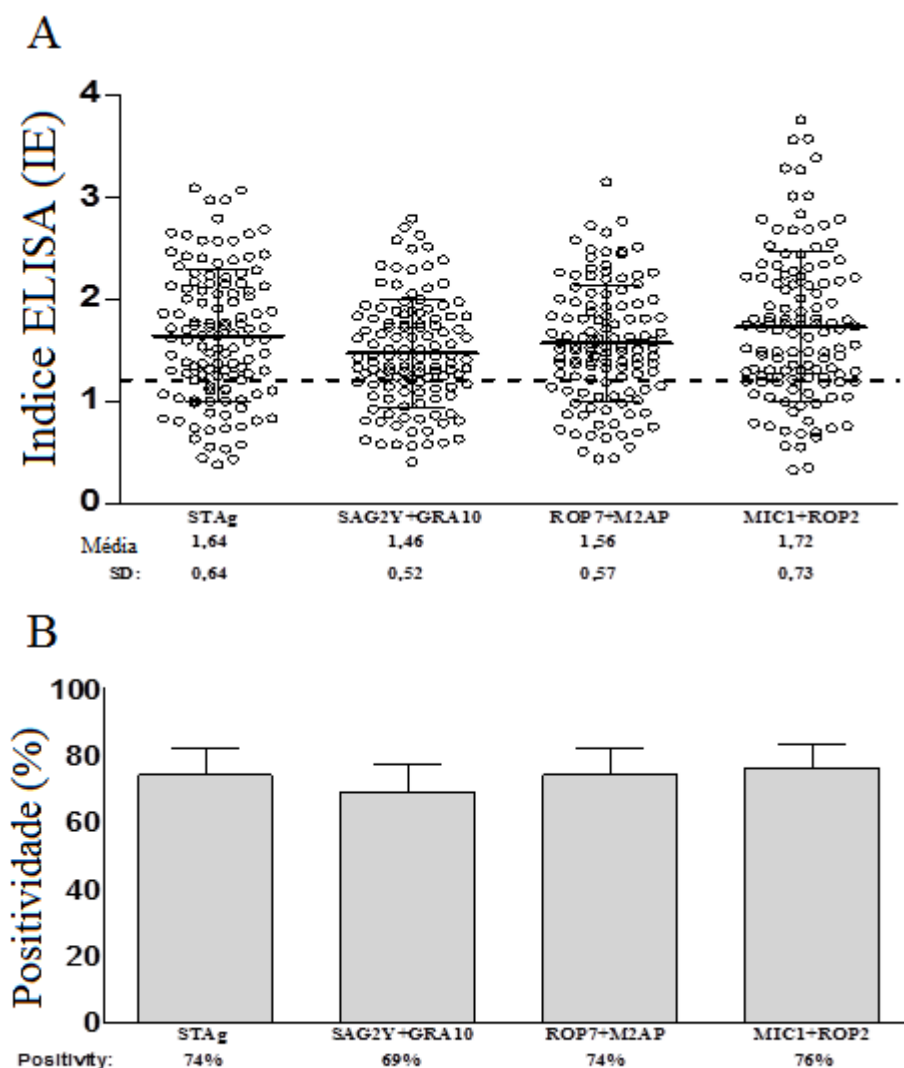


Figura 3. Níveis de reatividade (A) e positividade (B) das combinações de peptídeos (SAG2Y+GRA10, ROP7+M2AP, MIC1+ROP2) testadas em um total de 120 amostras de soros de galinhas. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) e valores maiores que 1,2 foram considerados positivos. A linha tracejada indica o *cut-off* da reação. Significância estatística para os níveis de IgY entre os peptídeos sintéticos e o STAg foram determinados por *One-way* Anova, enquanto que as diferenças entre as positivities foram avaliadas pelo teste exato de Fisher. * $P < 0,05$.

Na figura 3A, os níveis de anticorpos IgY foram expressos por Índices ELISA (IE) para cada antígeno. A combinação de peptídeos MIC1+ROP2 apresentou a maior média de Índice Elisa (1,72), quando comparadas com STAg (1,64). As combinações de peptídeos sintéticos analisados apresentaram índices de reatividade adequados quando

comparados com o antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*, sendo que nenhum peptídeo apresentou diferença significativamente estatística ($p < 0,05$). Na análise da positividade (Fig. 3B), STAg apresentou 74% de positividade, enquanto que as combinações de peptídeos SAG2Y+GRA10, ROP7+M2AP, MIC1+ROP2 apresentaram percentagens de positividade de 69%, 74%, 76%, respectivamente. Como demonstrado na Tabela 3, os índices diagnósticos, como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, e acurácia foram determinados.

Tabela 3. Dados relativos à capacidade diagnóstica, representado pela sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia das combinações de peptídeos sintéticos obtidos a partir da eficiência dos peptídeos utilizados isoladamente.

Preparações Antigênicas	Amostras Soropositivas (%)	Amostras Soronegativas (%)	Sensibilidade (I.C. 95%)	Especificidade (I.C. 95 %)	VPP	VPN	Acurácia (%)
STAg	89/89 (100)	31/31(100)	100% (96 - 100)	100% (87 - 100)	100%	100%	1
SAG2Y+GRA10	72/89 (81)	20/31 (65)	81 (71 – 88)	65 (45 – 81)	87	54	77
ROP7+M2AP	78/89 (88)	20/31 (65)	88 (79 – 93)	65 (45 – 81)	88	65	82
MIC1+ROP2	82/89 (92)	22/31 (71)	92 (84 – 97)	71 (52 – 85)	90	76	87

VPP: Valor preditivo positivo,

VPN: Valor preditivo negativo.

I.C. 95%: Intervalo de confiança 95%

Na tabela 3, considerando-se a sensibilidade do teste, os melhores resultados para as combinações de peptídeos foram: MIC1+ROP2 (92%), ROP7+MIC2-M2AP (88%), SAG2Y+GRA10 (81%). Quanto à especificidade do teste os peptídeos tiveram o seguinte desempenho: MIC1+ROP2 (71%), ROP7+M2AP (65%), SAG2Y+GRA10 (65%).

Quanto aos valores preditivos positivos, os resultados demonstraram que o melhor peptídeo foi o MIC1+ROP2 (90%), seguido dos demais ROP7+MIC2-M2AP (88%), SAG2Y+GRA10 (87%). Já em relação ao valor preditivo negativo, a combinação de peptídeo que apresentou melhor desempenho foi o MIC1+ROP2 (76%), seguido por ROP7+MIC2-M2AP (65%), SAG2Y+GRA10 (54%). A acurácia das combinações de peptídeos testados apresentou como melhor resultado MIC1+ROP2 (87%), seguido por ROP7+MIC2-M2AP (82%), SAG2Y+GRA10 (77%).

Como demonstrado na Figura 4, a exatidão do teste por meio da curva ROC (*Receiver operating characteristics*), para as combinações selecionadas de peptídeos, apresentou os seguintes resultados da AUC: SAG2Y+GRA10 (0,827), ROP7+MIC2-M2AP (0,853) e MIC1+ROP2 (0,905). As Razões de Verossimilhança positiva e negativa (LR+ e LR-, respectivamente), com as combinações de peptídeos, demonstraram os seguintes índices: SAG2Y+GRA10 (LR+ = 1,89; LR- = 0,25), ROP7+MIC2-M2AP (LR+ = 2,47; LR- = 0,19), MIC1+ROP2 (LR+ = 3,73; LR- = 0,13) (Figura 4).

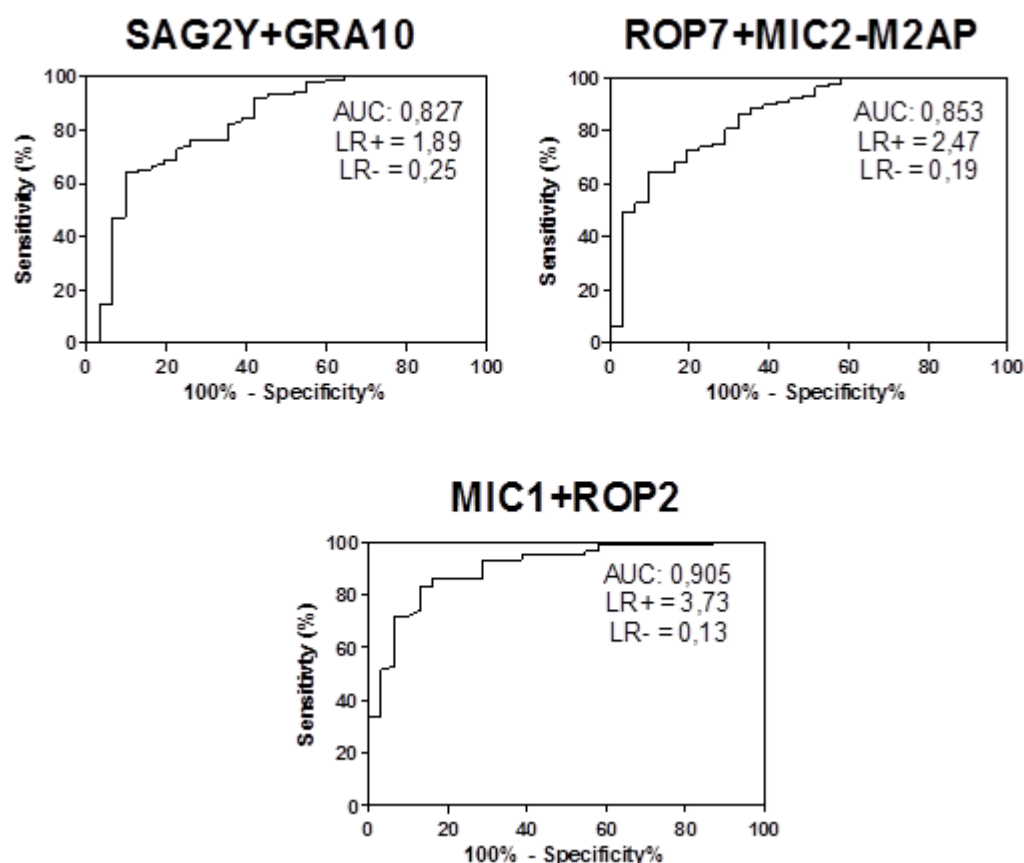


Figura 4. Análises de curva ROC das combinações de peptídeos, em amostras de galinha usando ELISA-IgY. A figura mostra a eficiência diagnóstica representada pela Área sob a curva (AUC), razão de verossimilhança positiva (LR+) e razão de verossimilhança negativa (LR-).

Analisando estes resultados em conjunto, a combinação dos peptídeos MIC1+ROP2 foi considerada aquela que apresentou características mais balanceadas quando comparadas com as outras combinações.

DISCUSSÃO

O diagnóstico específico de infecção por *Toxoplasma gondii* em galinhas é fundamental para uma melhor compreensão da epidemiologia e dinâmica de transmissão na população infectada, especialmente em seres humanos, sendo particularmente importante para o planejamento de um programa eficaz de prevenção e controle da toxoplasmose (HAMIDINEJAT et al., 2014). Os ensaios serológicos são usados para determinar a presença de anticorpos específicos no soro e são, atualmente, o método de escolha para o diagnóstico da infecção aguda ou crônica da toxoplasmose. Os antígenos utilizados na maioria dos testes disponíveis baseiam-se no antígeno total de *T. gondii* (BEGHETTO et al., 2003), fazendo com que haja uma certa dificuldade relacionada com a produção padronizada do antígeno, o manuseio e custo deste processo.

A utilização de moléculas que substituam o antígeno solúvel (STAg) no diagnóstico sorológico da toxoplasmose é altamente benéfica para melhorar a normalização do teste. Além disso, a combinação de vários antígenos que possuem múltiplos epitopos, seja como uma mistura ou um produto sintético, aumenta muito a probabilidade de detecção de anticorpos anti-*T. gondii* (HOLEC-GASIOR, 2013). Nesse contexto, vários grupos de pesquisa tentaram e ainda tentam estabelecer novos antígenos proteicos visando melhorar o nosso entendimento sobre as características estruturais e biológicas das proteínas do parasita, para obtermos então um novo antígeno que seja mais eficiente, de fácil produção e manutenção (CAKIR-KOC, 2016; WANG et al., 2014).

Da análise individual das técnicas de diagnóstico, o ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) foi considerado o método mais sensível para o diagnóstico sorológico da infecção por *T. gondii* em galinhas (CASARTELLI-ALVES et al., 2014). Têm sido descritos estudos utilizando-se proteínas recombinantes no diagnóstico da toxoplasmose nesses animais (HOTOP et al., 2014; SANTANA et al., 2015; SUN et al., 2015). Outra estratégia utilizada atualmente é a abordagem computacional para

interpretar e vincular informações disponíveis em bancos de dados específicos, sendo que tal análise pode levar a uma melhor compreensão de várias proteínas (e suas interações) gerando novos alvos para testes sorológicos (SOUSA et al., 2008).

A carência de estudos conclusivos voltados para o desenvolvimento de um diagnóstico preciso em galinhas é um grande problema que visamos sanar. Neste trabalho, foi desenvolvida uma análise *in silico* de regiões imunodominantes de taquizoítos comuns às três linhagens clonais de *T. gondii* e em seguida avaliamos vários aspectos das reações antígeno-anticorpo, utilizando-se os peptídeos resultantes e testando-os frente a um painel de 120 amostras de soros de galinhas naturalmente expostas ao risco de infecção. Foi observada uma soroprevalência em 74,17% de anticorpos anti-*T. gondii* das amostras estudadas, índice mais elevado que aqueles descritos nos trabalhos de Beltrame e Feitosa que encontraram taxas de 38,8% no estado do Espírito Santo, Brasil (BELTRAME et al., 2012) e 31,5% no estado da Paraíba, Brasil (FEITOSA et al., 2016), porém nosso resultado concorda com o trabalho de Lopes, que encontrou prevalência de 71,3% em Uberlândia, Brasil (LOPES et al., 2016). Nossos resultados indicam que todos os peptídeos tiveram positividade semelhante ao STAg e que, dentre os seis peptídeos sintéticos, SAG2Y e a combinação MIC1+ROP2 obtiveram a maior especificidade (71%, para ambos). Já os peptídeos ROP2, ROP7, M2AP e MIC1 e a combinação MIC1+ROP2 demonstraram alta sensibilidade (94%, 93%, 92%, 90% e 92%, respectivamente), podendo ser utilizados na triagem e diagnóstico sorológico.

Utilizando as proteínas recombinantes GRA7 e GRA1, Sun e colaboradores, encontraram sensibilidade de 100% para GRA7 e 81,3% para GRA1 e especificidade de 98,9% e 94,7%, respectivamente, onde a prevalência da doença era de 14.5% por *Western blot* – 16 soros positivos e 94 negativos (SUN et al., 2015). Interessantemente, a proteína GRA1 apresentou um índice de resultados falso-positivos de 27,8%, demonstrando que os testes sorológicos, por serem probabilísticos, devem ser cautelosos quando a prevalência da doença na região é baixa. Pois, a presença resultados de falso-positivos e falso-negativos podem afetar a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos, devido à possibilidade dos títulos de anticorpos não serem detectados nas infecções recentes, além do que, na fase crônica os títulos de anticorpos nesses animais podem ter diminuído para níveis indetectáveis (DUBEY et al., 1993).

Os melhores desempenhos obtidos com os peptídeos testados, considerando-se o parâmetro da acurácia, foram ROP2 e MIC1 (0,84, para ambos). Concordando com esse resultado a área sob a curva (AUC) da combinação MIC1+ROP2 foi de 0,91, evidenciando uma eficiência diagnóstica elevada. Portanto, a combinação dos peptídeos MIC1+ROP2 por ter características mais equilibradas de sensibilidade e especificidade e a melhor AUC, quando comparada às outras combinações testadas, apresentou um melhor potencial para a utilização no diagnóstico da infecção por *T. gondii*. Por conseguinte, nossos resultados demonstram os benefícios da utilização de peptídeos sintéticos, porque eles podem ser sintetizados como reagentes precisos em imunoenaios, além do fato de que estes componentes são facilmente obtidos e ao custo relativamente baixo. Além disso, é possível selecionar regiões imunogênicas específicas das proteínas do parasita que apresentam características de proteínas imunodominantes, na ausência de componentes de células hospedeiras. Assim, as inconveniências associadas às reatividades cruzadas nos imunoenaios podem ser minimizadas com a utilização de peptídeos sintéticos, sendo que a combinação de MIC1+ROP2 apresentou resultados particularmente promissores, constituindo-se em um alvo importante para compor um painel antigênico que possa melhorar significativamente o diagnóstico da infecção por *T. gondii* em galinhas criadas extensivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, H. J.; KIM, S.; NAM, H. W. Host cell binding of GRA10, a novel, constitutively secreted dense granular protein from *Toxoplasma gondii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, n. 2, p. 614-20, Jun 2005.

BEGHETTO, E. et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5414-8, Dec 2003.

BEGHETTO, E. et al. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133-40, Jun 2006.

BELTRAME, M. A. et al. Seroprevalence and isolation of *Toxoplasma gondii* from free-range chickens from Espirito Santo state, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 3-4, p. 225-30, Sep 2012.

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79-88, Jan 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

CAI, Y. C. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, v. 61, n. 3, p. 385-90, Sep 2012.

CAKIR-KOC, R. Production of anti-SAG1 IgY antibody against *Toxoplasma gondii* parasites and evaluation of antibody activity by ELISA method. **Parasitology Research**, Apr 2016.

CARVALHO, F. R. et al. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, Aug 2008.

CASARTELLI-ALVES, L. et al. Sensitivity and specificity of serological tests, histopathology and immunohistochemistry for detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic chickens. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 346-51, Aug 2014.

COLE, R. A. et al. Biological and molecular characterizations of *Toxoplasma gondii* strains obtained from southern sea otters (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 3, p. 526-30, Jun 2000.

DRAPALA, D.; HOLEC-GASIOR, L.; KUR, J. New recombinant chimeric antigens, P35-MAG1, MIC1-ROP1, and MAG1-ROP1, for the serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology Infectious Diseases**, v. 82, n. 1, p. 34-9, May 2015.

DUBEY, J. P. A review of toxoplasmosis in wild birds. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 2, p. 121-153, Jun 2002.

_____. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 1, p. 60-73, Feb 2010.

DUBEY, J. P. et al. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. **Veterinary Parasitology**, v. 134, n. 1-2, p. 67-72, Nov 2005.

DUBEY, J. P. et al. Serologic and parasitologic responses of domestic chickens after oral inoculation with *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n. 10, p. 1668-72, Oct 1993.

FEITOSA, T. F. et al. First study on seroepidemiology and isolation of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in the semi-arid region of Paraíba state, Brazil. **Parasitology Research**, Jun 2016.

FERGUSON, D. J. P. Identification of faecal transmission of *Toxoplasma gondii*: small science, large characters. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 871-5, Jul 2009.

FERRA, B.; HOLEC-GASIOR, L.; KUR, J. A new *Toxoplasma gondii* chimeric antigen containing fragments of SAG2, GRA1, and ROP1 proteins-impact of immunodominant sequences size on its diagnostic usefulness. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3291-9, Sep 2015a.

_____. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. **Parasitology International**, v. 64, n. 5, p. 288-94, Oct 2015b.

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 123-32, Sep 1995.

HAMIDINEJAT, H. et al. Comparison of three diagnostic methods for the detection of *Toxoplasma gondii* in free range chickens. **Tropical Biomedicine**, v. 31, n. 3, p. 507-13, Sep 2014.

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

HOLEC-GASIOR, L. et al. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 146-52, Dec 2014.

HOTOP, A. et al. Humoral immune responses in chickens and turkeys after infection with *Toxoplasma gondii* by using recombinant antigens. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1473-80, Apr 2014.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **Worlds Poultry Science Journal**, v. 60, n. 3, p. 341-347, Sep 2004.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-32, Mar 2004.

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

LEKUTIS, C. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-92, Oct 2001.

LIU, L. L. et al. rROP2(186-533): A novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 1, p. 7-12, Jan 2012.

LIU, Q. et al. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasite & Vectors**, v. 8, p. 292, Oct 2015.

LOPES, C. S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of two *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Uberlandia, Brazil. **Epidemiology & Infection**, v. 144, n. 9, p. 1865-75, Jul 2016.

MAKSIMOV, P. et al. Analysis of clonal type-specific antibody reactions in *Toxoplasma gondii* seropositive humans from Germany by peptide-microarray. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e34212, Feb 2012.

MUNHOZ, L. S. et al. Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. **Ciencia Rural**, v. 44, n. 1, p. 153-160, Jan 2014.

PAREDES-SANTOS, T. C.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal Structural Biology**, v. 177, n. 2, p. 420-30, Feb 2012.

PERSAT, F. et al. A synthetic peptide derived from the parasite *Toxoplasma gondii* triggers human dendritic cells' migration. **Journal Leukocyte Biology**, v. 92, n. 6, p. 1241-50, Dec 2012.

RANDALL, L. M.; HUNTER, C. A. Parasite dissemination and the pathogenesis of toxoplasmosis. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 1, n. 1, p. 3-9, Mar 2011.

SADRAIE, J.; BAHADORY, E. S.; MARSUSI, V. The merits of designed ELISA avidity kit in detection of *Toxoplasma gondii* IgG antibody in laboratory conditions. **Tropical Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 40-3, Jan 2013.

SANTANA, S. S. et al. CCp5A Protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1305, Jul 2015.

SILVA, D. A. et al. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 181-95, Aug 2 2002.

SOUSA, S. et al. Use of GRA6-derived synthetic polymorphic peptides in an immunoenzymatic assay to serotype *Toxoplasma gondii* in human serum samples collected from three continents. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 9, p. 1380-1386, Sep 2008.

SUN, X. F. et al. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA1, GRA7 and soluble antigens for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 161-164, Jun 2015.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1217-58, Nov 2000.

THOMAS, L. F. et al. The spatial ecology of free-ranging domestic pigs (*Sus scrofa*) in Western Kenya. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 46, 2013.

WANG, Y. et al. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 474, Oct 2014.

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

WANG, Y. H. et al. Identification of novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA1. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 3, p. 606-610, Nov 2013.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392-398, 8// 1995.

ZHAO, G. et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range chickens in China based on circulating antigens and antibodies. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 72-7, Apr 2012.

Capítulo III

Avaliação de peptídeos sintéticos derivados de marcadores imunodominantes do taquizoíto de *Toxoplasma gondii* para diagnóstico sorológico da infecção em ovinos.

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório muito bem-sucedido, que infecta um grande número de espécies de mamíferos. Embora a maioria das infecções seja clinicamente assintomática, o parasita pode induzir doença grave em algumas populações de determinados animais. Ovelhas são comumente infectadas com esse parasito devido ao seu hábito alimentar. A infecção em ovelhas grávidas pode trazer sérias consequências como a morte embrionária, reabsorção do feto, mumificação e morte neonatal. Uma preocupação decorrente da infecção nesses animais é que a carne pode ser uma fonte de contaminação para seres humanos e outros animais carnívoros. Portanto, realizar um diagnóstico preciso nesses animais é de fundamental importância. Assim, no presente estudo avaliamos o potencial de novos peptídeos sintéticos como ferramenta de diagnóstico. Os peptídeos foram preditos *in silico*, a partir de proteínas imunodominantes de *T. gondii*, visando determinar os níveis de anticorpos IgG a partir de 79 amostras de soros obtidas de ovelhas em duas fazendas do município de Uberlândia. A análise *in silico* identificou epítomos de células B em sequências completas de proteínas da superfície do parasita, de micronemas, de proteínas associadas à micronema, de proteína de grânulo denso e de roptrias, sendo quimicamente sintetizados oito peptídeos (SAG2Y, SRS52A, MIC14, GRA4, dois peptídeos de GRA10 e dois de GRA15) com maiores *scores* de predição. Analisando os resultados em conjunto, a combinação P6+P8 (GRA10+GRA15) apresentou acurácia de 0,82 possuindo parâmetros diagnósticos quando comparadas com as outras misturas. Desta maneira, a combinação dos peptídeos P6+P8 constitui-se em uma mistura antigênica com potencial uso para o diagnóstico da toxoplasmose em ovinos, o que tem grande importância epidemiológica.

Palavras-chave: Diagnostico, *Toxoplasma gondii*, peptídeos sintéticos, ELISA, ovelhas.

SUMMARY

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan very successful, which affects almost all mammalian species. Although the majority of infections are asymptomatic, the parasite can induce severe disease in some populations of certain animals. Sheep are commonly infected by this parasite because of their eating habits. Infection in pregnant sheep can have serious consequences, such as embryonic death, fetal resorption, mummification, and neonatal death. One concern regarding the infection in these animals is that the meat can be a source of contamination to humans and other carnivores. Therefore, an accurate diagnosis in these animals is of fundamental importance. In the present study we evaluated the potential of new synthetic peptides as a diagnostic tool. Peptides were predicted *in silico* from immunodominant proteins against *T. gondii* and determined the levels of IgG antibodies against this parasite by using 79 serum samples from sheep, obtained from two farms of Uberlândia city. *In silico* analysis identified B-cell epitopes in full sequence of the parasite surface proteins, micronemes, proteins associated with microneme, dense granule protein and rhoptries, and 8 peptides (SAG2Y, SRS52A, MIC14, GRA4, two peptides of GRA10 and two of GRA15) with higher prediction scores were chemically synthesized. Analyzing the results together, the GRA10+GRA15 (P6 + P8) peptide combination (accuracy = 0.82) showed better characteristics compared with the other peptide combination. Thus, this synthetic peptide combination could be proposed as a potential antigenic preparation to be used in the diagnosis of toxoplasmosis in sheep, which is important under the epidemiologic point of view.

Keywords: Diagnosis, *Toxoplasma gondii*, synthetic peptides, ELISA, sheep.

INTRODUÇÃO

O parasito *Toxoplasma gondii*, causador da toxoplasmose, é um protozoário intracelular obrigatório, supostamente capaz de infectar todas as células nucleadas dos seus hospedeiros (LUDER; SEEBER, 2001). É um coccídeo ubíquo capaz de infectar todos os animais vertebrados homeotérmicos, incluindo as ovelhas (CENCI-GOGA et al., 2011; SUN et al., 2015). Sendo capaz de causar diversas manifestações clínicas, principalmente em organismos imunocomprometidos ou suscetíveis, resultando em uma série de problemas na medicina humana e veterinária (SHARIF et al., 2015). O parasito possui antígenos de membrana (SAGs), antígenos relacionados à SAG (SRS), além de organelas funcionais, características do filo, conhecidas como micronemas, roptrias e grânulos densos, que são utilizadas durante o processo de adesão, invasão celular e manutenção do vacúolo parasitóforo (BOOTHROYD; DUBREMETZ, 2008; LEKUTIS et al., 2001; PAREDES-SANTOS et al., 2012). Os genes que codificam essas proteínas antigênicas do parasita são bons alvos moleculares para a prospecção de novos antígenos que tenham significado diagnóstico (HOLEC-GASIOR et al., 2014).

Ovelhas domésticas (*Ovis aries*) são importantes devido à produção de carne, lã, leite e produtos lácteos em vários países (CENCI-GOGA et al., 2011; GAZZONIS et al., 2015). Dados da FAO (Food and agriculture organization of the United Nations) estimaram que somente no Brasil o rebanho ovino fosse de 17.614.454,00 cabeças em 2014 (FAOSTAT, 2014). A transmissão da toxoplasmose para as ovelhas e outros herbívoros ocorre pela passagem transplacentária de taquizoítos para o feto ou pela ingestão de oocistos esporulados em água ou pastagem contaminada. Na Grã-Bretanha, investigações estimam que a toxoplasmose seja a terceira maior causa de patologia em fetos, perdendo somente para *Chlamydomphila abortus* e Schmallenberg vírus (HUTCHINSON; SMITH, 2015). Além das patologias ocasionadas pelo parasito, a infecção pode causar morte embrionária prematura, reabsorção fetal, mumificação, aborto e morte neonatal (DUBEY, 2009). A soroprevalência parece aumentar com a idade, atingindo 95% em alguns rebanhos em que as ovelhas tinham seis anos de idade, o que sugere que a maioria dos animais adquire a infecção depois do nascimento. Em geral, a maioria das ovelhas contrai a infecção antes do quarto ano de idade (DUBEY; KIRKBRIDE, 1989). Devido a esses fatos o diagnóstico preciso é de fundamental importância, principalmente em animais destinados para reprodução, já que preveniria muitas perdas de ovelhas, levando consequentemente a um ganho econômico.

Os métodos diagnósticos mais utilizados em ovelhas são o teste de aglutinação modificada (MAT), teste de imunofluorescência indireta (IFA), teste de aglutinação em látex (LAT), hemaglutinação indireta (IHA), e ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) (DUBEY, 2009). Caballero-Ortega e colaboradores relataram uma boa correlação entre ELISA e *Western blot* utilizando antígeno solúvel total (STAg), mostrando concordância em 91% das amostras, embora uma maior especificidade tenha sido obtida com ELISA (CABALLERO-ORTEGA et al., 2008).

Atualmente existem poucos testes diagnósticos disponíveis comercialmente para utilização em animais. O teste ELISA pode ser realizado utilizando o antígeno bruto, fracionado, ou recombinante para detectar anticorpos de *T. gondii* no soro ovino (DUBEY, 2009), demonstrando, ainda, alta sensibilidade, a possibilidade de quantificar os níveis de anticorpos a um baixo custo e poder ser feita automaticamente. Porém, exige maior refinamento no que diz respeito aos procedimentos e padronização do antígeno utilizado (SHAAPAN et al., 2008).

Deste modo, propomos pela primeira vez selecionar peptídeos imunodominantes, preditos *in silico*, dentre os antígenos provenientes de organelas secretórias (MIC, GRA), da superfície do *Toxoplasma gondii* (SAG) ou de sequências relacionadas à SAG (SRS), visando determinar quais peptídeos poderiam ser mais eficazes para o imunodiagnóstico da toxoplasmose em ovinos naturalmente infectados. Para este trabalho, foram utilizados os seguintes peptídeos: MIC14, GRA4, GRA10, GRA15, SAG2Y, SRS52A. Após selecionar os peptídeos que apresentassem um melhor desempenho para o diagnóstico da infecção por *T. gondii*, uma mistura de tais peptídeos foi avaliada visando um aumento na sensibilidade e especificidade do ELISA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e processamento dos soros

Foram coletadas 79 amostras de sangue de ovelhas em duas fazendas do Município de Uberlândia. O sangue foi coletado através de punção venosa na veia jugular e, após a coleta, o soro foi obtido por meio de centrifugação a 1500g por 5 minutos, sendo posteriormente armazenado em freezer -20°C. O Comitê de Ética em

Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU-CEUA) aprovou todos os procedimentos.

Antígenos

Antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) foi preparado como descrito previamente por Carvalho e colaboradores (CARVALHO et al., 2008), com algumas modificações. Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram coletados de camundongos, centrifugado a 400g e adicionado a um coquetel de inibidores de proteases, diluído em água ultrapura (*Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science*, Penzberg, Bavaria, Germany). Posteriormente, foram realizados dez ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e em banho maria a 37°C, respectivamente. Em seguida, foram realizados seis ciclos de um minuto de sonicação e posterior centrifugação (10.000g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi coletado para quantificação proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Aliquotas do STAg foram armazenadas a -20°C até o momento do uso.

Para obter os peptídeos sintéticos, as sequências completas dos aminoácidos das proteínas foram obtidas por meio do banco de dados de *Toxoplasma* (www.toxodb.org). Para este fim, as sequências obtidas foram analisadas usando ferramentas de predição de epítomos de células B (*Chou & Fasman beta-Turn prediction* and *Emini surface accessibility prediction*), disponível em *Immune Epitope Database Analysis Resource* (IEDB-AR). A predição de epítomos lineares, a partir da sequência da proteína de cada antígeno escolhido, foi realizada utilizando o método “*Bepipred Linear Epitope Prediction*”, a partir de um ponto de corte estabelecido em 1,5 (LARSEN et al., 2006). Sequências com 15 aminoácidos com os escores mais elevados foram escolhidos como preparações antigênicas e utilizadas para a síntese dos peptídeos. BLASTP das sequências peptídicas resultou num total alinhamento com os respectivos antígenos de *T. gondii* e nenhum alinhamento significativo com proteínas de outros organismos. Os peptídeos foram sintetizados com um grau de pureza de 95%, tendo sido avaliados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, e a sequência correta de aminoácidos de cada peptídeo foi confirmada por espectrometria de massa, de acordo com as especificações do fabricante (GenScript USA Inc., Piscataway, New Jersey, USA). Os peptídeos (Tabela 1) foram conjugados com albumina bovina (BSA), pela inserção de cisteína na posição N-terminal do aminoácido,

tendo sido liofilizados posteriormente à síntese química. Antes da utilização, cada peptídeo foi dissolvido em água ultrapura e armazenado (-20°C), de acordo com as instruções do fabricante.

Seleção dos peptídeos

Os peptídeos sintetizados SAG2Y (P1), SRS52A (P2), MIC14 (P3), GRA4 (P4), GRA10 (P5 e P6), GRA15 (P7 e P8), foram testados separadamente, por ELISA, em amostras de soros de galinhas obtidas do município de Uberlândia-MG. Os peptídeos testados isoladamente que apresentaram as melhores características diagnósticas, por meio deste teste sorológico, foram utilizados para desenvolvimento de um conjunto de peptídeos antigênicos, de acordo com especificidade, sensibilidade e acurácia desses peptídeos.

ELISA de IgG

Para a detecção de anticorpos IgG por ELISA indireto utilizamos placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA). As placas foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. Realizamos três lavagens com tampão fosfato de sódio contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T, pH 7,2) de cada placa e posteriormente bloqueamos os sítios de ligação inespecíficos com 100 microlitros de PBS contendo 5% de leite desnatado (PBS-M 5%), por 1 hora à temperatura ambiente. Em sequência, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídos em PBS-M 1%, na proporção de 1: 64 em duplicata, durante 1 hora a 37°C. Amostras de soros sabidamente positiva e negativa também foram incluídas em cada placa, como controles. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgG ovina marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.), diluído 1:5000 em PBS-M 1% por 1 hora a 37°C. Após o processo final de lavagem, as reações foram reveladas com substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno ABTS (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico - Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA). A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nanômetros em leitora de microplacas (Tecan Spectra Classic, Grödig, Austria).

Para os peptídeos, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA) foram sensibilizadas com os peptídeos selecionados (10 µg/mL) em tampão Fosfato (pH 6,5), por 18 horas a 4°C. Realizamos três lavagens com PBS-T, de cada placa e posteriormente bloqueados os sítios inespecíficos com PBS-BSA (soro albumina bovina) 0,5% por 1 hora em temperatura ambiente. Em sequência, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídos em PBS-BSA 0,1% na proporção de 1:64 em duplicata, durante 1 hora a 37°C. Soros de controle positivo e negativo também foram incluídos em cada placa. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgG ovina marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.), diluído em PBS-BSA 0,1% (1:5000) por 1 hora a 37°C. Após o processo final de lavagem, as reações foram reveladas com substrato enzimático H₂O₂ a 0,03% e cromógeno ABTS. As DOs foram determinadas a 405 nanômetros em leitora de microplacas. Em ambas as reações foram adicionados poços controle sensibilizados com BSA para assegurar que a reação observada era específica para as sequências de peptídeos e não para o esqueleto de BSA ao qual os peptídeos foram ligados quimicamente.

Os valores foram calculados em DO para STAg e em DO líquida (valor obtido com os peptídeos subtraído do valor obtido com o BSA) para os peptídeos. O ponto de corte (*cut-off*) da reação foi calculado pela média da densidade óptica dos controles negativos somada a três desvios padrão. Níveis de anticorpos foram expressos em Índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula: $IE = DO \text{ da amostra} / DO \text{ do cut off}$, como descrito (SILVA et al., 2002). Amostras com valores de EI > 1,2 são consideradas positivas.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos softwares *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA) e *MedCalc*, sendo que os níveis de anticorpos foram comparados entre os grupos utilizando ONE WAY ANOVA com o pós-teste de Bonferroni. Curvas ROC (GREINER et al., 1995) também foram determinadas. Para calcular a sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativos e positivos e a razão de verossimilhança foi usado o software *MedCalc* para Windows, versão 11.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Peptídeos sintéticos possuem reatividade similar ao STAg.

Inicialmente, a reatividade (níveis de anticorpos) e a positividade de 79 soros de ovelhas foram medidas por ELISA indireto, com utilização de STAg e os peptídeos sintéticos propostos como antígenos, MIC14 (P3), GRA4 (P4), GRA10 (P5 e P6), GRA15 (P7 e P8), SAG2Y (P1), SRS52A (P2); Tabela 1.

Tabela 1- Sequências de aminoácidos de peptídeos sintéticos dos epítomos preditos de célula B de antígenos imunodominantes de *Toxoplasma gondii*.

Antígeno	Peptídeo	Número aminoácidos	Posição Inicial e Final	Sequência
SAG2Y	P1	367 aa	296 - 310 aa	BSA-CPPNPPSGGSGRTGTP
SRS52A	P2	297 aa	123 - 137 aa	BSA-CAPTGDPSQNSDGNRG
MIC14	P3	968 aa	910 - 924 aa	BSA-CKAEEGEGPDEDAEPE
GRA4	P4	325 aa	176 - 190 aa	BSA-CPGTTSTPTPPRPASY
GRA10	P5	894 aa	590 - 604 aa	BSA-CSRVP PPPPPPPG SVG
GRA10	P6	894 aa	674 - 688 aa	BSA-CGLRGDPGEPSNPYLG
GRA15	P7	550 aa	283 - 297 aa	BSA-CASATPSPPERPQNFR
GRA15	P8	550 aa	370 - 384 aa	BSA-CSQSPAGGPPTDSRTP

Os resultados obtidos utilizando os peptídeos foram comparados com aqueles obtidos com STAg (Figura 1). Os níveis de anticorpos IgG de ovinos foram expressos em Índice ELISA (IE) para cada antígeno. O Índice Elisa (IE) médio dos peptídeos sintéticos foi de 1,32 para SAG2Y (P1); 1,27 SRS52A (P2); 1,2 MIC14 (P3); 1,21 GRA4 (P4); 1,35 GRA10 (P5) e 1,27 (P6); 1,2 GRA15 (P7) e 1,13 (P8); o STAg foi de 1,07. Os peptídeos reconhecem níveis médios de anticorpos similares ao STAg não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($P < 0,05$) (Figura 1).

O STAg mostrou 47% de positividade, enquanto os peptídeos P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8 mostraram percentuais de positividade de 49, 48, 48, 42, 52, 59, 44 e 30%, respectivamente (Figura 1). Estes resultados indicaram que os peptídeos mostraram índices de reatividade semelhantes aos observados com STAg, a exceção de P8.

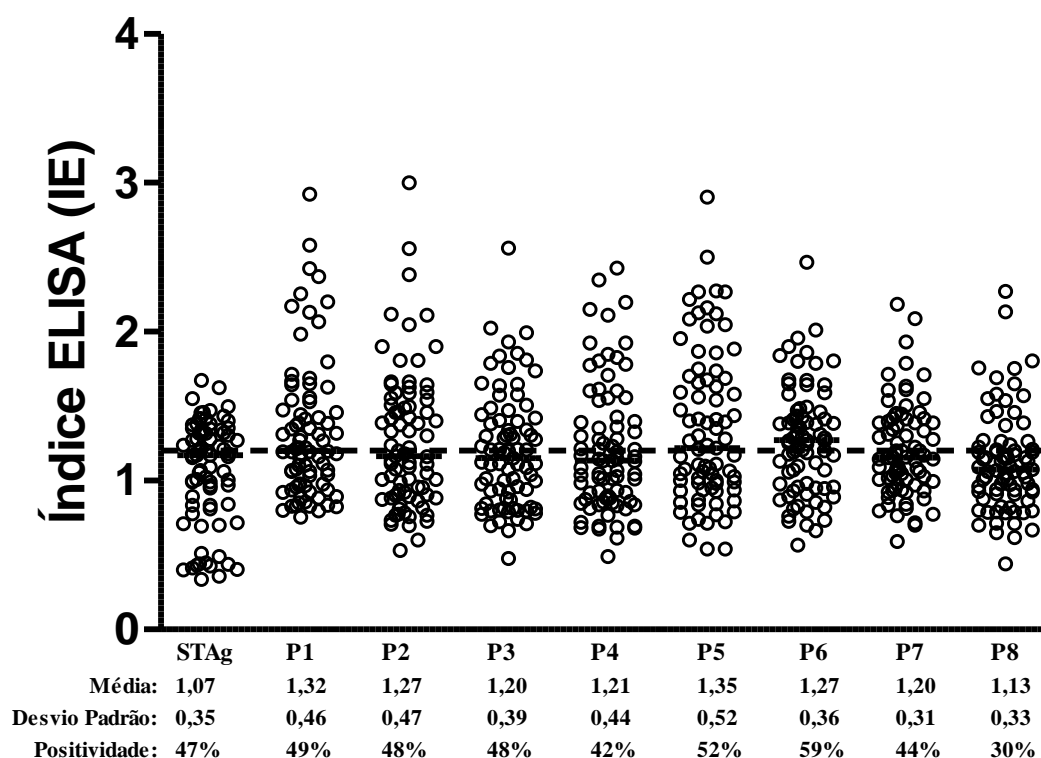


Figura 1. Reatividade dos peptídeos sintéticos contra amostras de ovelhas coletadas em áreas de Uberlândia ($n = 79$). Os níveis de anticorpos IgG anti-*T. gondii* e a positividade foram avaliados por ELISA indireto. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) e valores maiores que 1,2 foram considerados positivos. A linha pontilhada indica o cut off da reação. Significância estatística do IE entre os peptídeos sintéticos e o STAg foram determinados por *One-way* Anova. * $P < 0,05$.

Potencial diagnóstico dos peptídeos

A fim de confirmar o potencial diagnóstico de peptídeos, a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia, foram avaliadas (Tabela 2), tendo sido o STAg considerado o valor de referência. Considerando a sensibilidade dos testes, os resultados para os peptídeos isolados foram P1 (66,1%), P2 (69%), P3 (73%), P4 (61%), P5 (76%), P6 (81%), P7 (67%) e P8 (50%). Em relação à especificidade do ensaio, obtivemos o seguinte desempenho: P1 (67,8%), P2 (70%), P3 (73%), P4 (73%), P5 (69%), P6 (60%), P7 (70%) e P8 (83%).

O valor preditivo positivo foi de 67% para P1, 68% (P2), 72% (P3), 66% (P4), 71% (P5), 69% (P6), 65% (P7) e 69% (P8). Em relação com o valor preditivo negativo, os peptídeos que apresentaram os melhores resultados foram: P3 e P5 (75%), seguido por P6 (74%), P7 (72%), P2 (71%), P8 (70%), P4 (69%) e P1 (66%). Considerando-se a acurácia dos peptídeos testados, os peptídeos com os maiores valores foram: P3 (0,63), P5 (0,62), seguido por P6 (0,6), P8 e P2 (0,56), P7 (0,54), P4 (0,52) e P1 (0,5).

Tabela 2. Dados relativos à capacidade diagnóstica do imunoensaio ELISA utilizando-se peptídeos sintéticos testados isoladamente para a detecção de anticorpos IgG em amostras de soros de ovelhas.

Antígenos	Amostras VP (%)	Amostras VN	Sensibilidade (CI95%)	Especificidade (CI95%)	VPP	VPN	Acurácia
STAg	37 (100,0)	42 (100,0)	100% (96 - 100)	100% (87 - 100)	100%	100%	1
P1	20 (54,1)	20 (47,6)	66,1% (53 - 78)	67,8% (54 - 79)	67%	66%	0,50
P2	20 (54,1)	24 (57,1)	69% (55 - 81)	70% (56 - 81)	68%	71%	0,56
P3	23 (62,2)	27 (64,3)	73% (59 - 84)	73% (59 - 84)	72%	75%	0,63
P4	16 (43,2)	25 (59,5)	61% (47 - 74)	73% (60 - 83)	66%	69%	0,52
P5	24 (64,9)	25 (59,5)	76% (62 - 87)	69% (55 - 81)	71%	75%	0,62
P6	26 (70,3)	21 (50,0)	81% (69 - 90)	60% (46 - 74)	69%	74%	0,60
P7	18 (48,6)	25 (59,5)	67% (53 - 80)	70% (57 - 81)	65%	72%	0,54
P8	31 (83,8)	13 (31,0)	50% (35 - 64)	83% (72 - 91)	69%	70%	0,56

VPP: Valor preditivo positivo, VPN: Valor preditivo negativo, VP: Verdadeira positiva, VN: Verdadeira negativa.

As curvas ROC (*Receiver Operator Characteristic curve*) são uma forma de representar a relação, normalmente antagônica, entre a sensibilidade e a especificidade de um teste diagnóstico quantitativo. Portanto, também examinamos os peptídeos pela curva ROC (Figura 2), considerada proporcionalmente relacionada com a área sob a curva (AUC). Os peptídeos tiveram as seguintes AUC: P1 (0,575), P2 (0,575), P3(0,701), P4 (0,602), P5 (0,658), P6 (0,628), P7 (0,569) e P8 (0,641).

De forma complementar, foram também avaliados os desempenhos da sensibilidade e especificidade dos peptídeos testados, por meio das Razões de verossimilhança positiva e negativa (LR+ e LR-, respectivamente) (Figura 2). A razão de verossimilhança expressa quantas vezes mais provável (ou menos) se encontra um resultado de um teste em pessoas doentes comparadas com as saudáveis. Obtivemos as seguintes Razões: P1 (LR+ = 2,05; LR- = 0,5), P2 (LR+ = 2,26; LR- = 0,44), P3 (LR+ = 2,73; LR- = 0,37), P4 (LR+ = 2,26; LR- = 0,53), P5 (LR+ = 2,46; LR- = 0,35), P6 (LR+ = 2,05; LR- = 0,31), P7 (LR+ = 2,23; LR- = 0,47), P8 (LR+ = 3; LR- = 0,6).

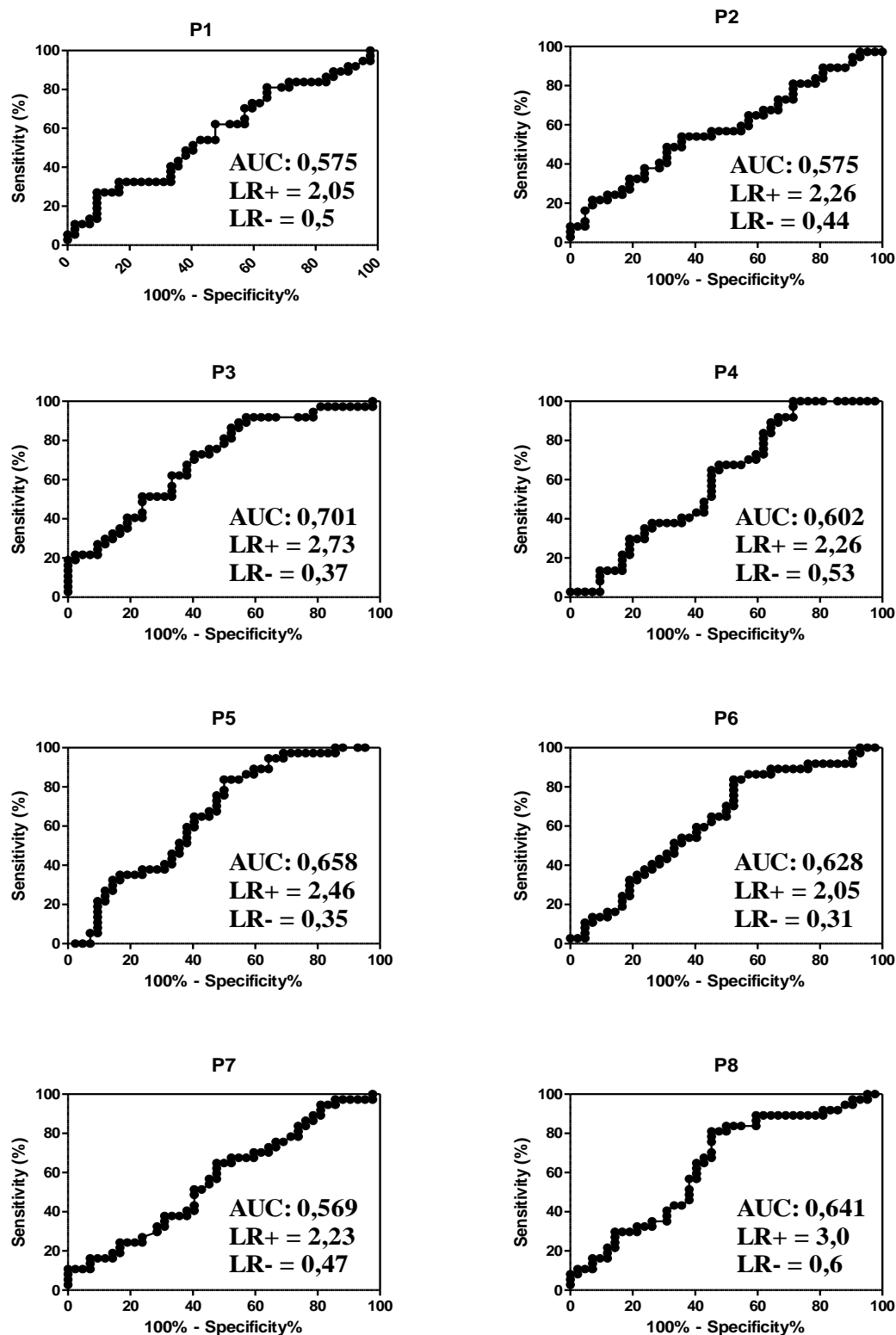


Figura 2. Análises de curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) em amostras de soros de ovelhas, utilizando-se ELISA, com peptídeos isolados para a detecção de IgG anti-*T. gondii*. A figura mostra eficiência diagnóstica representada pela Área sob a curva (AUC), razão de verossimilhança positiva (LR+) e razão de verossimilhança negativa (LR-).

Potencial diagnóstico de diferentes combinações de peptídeos

Testamos várias combinações de peptídeos, porém algumas destas combinações não atingiram AUC de 0,5 (mínimo para um teste diagnóstico ser capaz de discriminar doentes de não doentes). Assim sendo, as melhores combinações resultantes foram: P1+P2 (SAG2Y+SRS52A), P3+P5 (MIC14+GRA10), P4+P7 (GRA4+GRA15) e P6+P8 (GRA10+GRA15) (Figura 3).

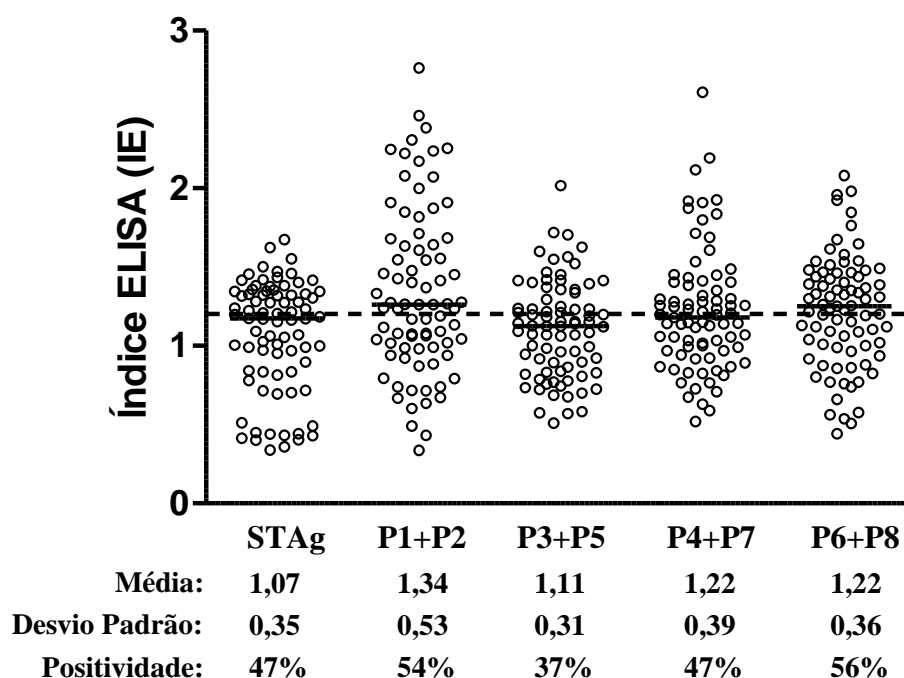


Figura 3. Níveis de reatividade e positividade obtidos para as combinações de peptídeos testadas em 79 amostras de soros de ovinos na detecção de IgG anti-*T. gondii*. Os resultados foram expressos em Índice ELISA (IE) e valores maiores que 1,2 foram considerados positivos. A linha tracejada indica o *cut-off* da reação. Significância estatística entre os níveis de IgG entre os peptídeos sintéticos e o STAg foram determinados por one way anova. * $P < 0,05$.

Na figura 3, os níveis de anticorpos IgG foram expressos em índice ELISA (IE) para cada antígeno. A combinação de peptídeos P1+P2 (SAG2Y+SRS52A) apresentou a maior média de Índice Elisa (1,34), seguido por P4+P7 (GRA4+GRA15), P6+P8

(GRA10+GRA15) e P3+P5 (MIC14+GRA10) quando comparado com STAg (1,07). As combinações de peptídeos sintéticos analisados apresentaram boa reatividade quando comparado com o antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii*, sendo que nenhum peptídeo apresentou diferença significativamente estatística ($p < 0,05$). Na análise da positividade, STAg apresentou 47% de positividade, enquanto que as combinações de peptídeos P1+P2, P4+P7, P6+P8 e P3+P5 apresentaram percentagens de positividade de 54%, 47%, 56% e 37%, respectivamente. Posteriormente, dados diagnósticos como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, e acurácia foram calculados (Tabela 3).

Tabela 3. Dados relativos à sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia das combinações de peptídeos comparadas ao extrato total de *Toxoplasma gondii*, testadas em amostras de ovelhas criadas no município de Uberlândia.

Preparações Antigênicas	Amostras VP (%)	Amostras VN (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP	VPN	Acurácia
STAg	37 (100,0)	42 (100,0)	100% (96 - 100)	100% (87 - 100)	100%	100%	1
P1+P2	23 (62,2)	22 (52,4)	75,44% (62 - 86)	64,29% (50 - 77)	68%	72%	0,57
P3+P5	18 (48,6)	31 (73,8)	60,42% (45 - 74)	81,97% (70 - 91)	73%	72%	0,62
P4+P7	17 (45,9)	22 (52,4)	67,74% (55 - 79)	64,91% (51 - 77)	68%	65%	0,49
P6+P8	37 (100,0)	28 (66,7)	82,27% (74 - 94)	70% (55 - 82)	75%	83%	0,82

VPP: Valor preditivo positivo,

VPN: Valor preditivo negativo,

VP: Verdadeira positiva,

VN: Verdadeira negativa.

Na tabela 3, considerando a sensibilidade do teste os melhores resultados para as combinações de peptídeos selecionadas foram: P6+P8 (82,27%), P1+P2 (75,44%), P4+P7 (67,74%), P3+P5 (60,42%), em ordem decrescente. Quanto à especificidade do teste os peptídeos tiveram o seguinte desempenho: P1+P2 (64,29%), P3+P5 (81,97%), P4+P7 (64,91%), P6+P8 (70%), em ordem decrescente.

Quanto ao valor preditivo positivo, os melhores resultados dentre as combinações testadas foram: P6+P8 (75%), P3+P5 (73%), P4+P7 (68%) e P1+P2 (68%). Já em relação ao valor preditivo negativo, a combinação de peptídeos que teve melhor desempenho foi P6+P8 (83%), seguido por P1+P2 e P3+P5 (72%) e P4+P7 (65%). A acurácia das combinações testadas teve como melhor resultado P6+P8 (0,82), seguido por P3+P5 (0,62), P1+P2 (0,57) e P4+P7 (0,49).

Analisando a exatidão do teste por meio da curva ROC, como demonstrado na Figura 4, os resultados da AUC foram: P1+P2 (0,6), P3+P5 (0,641), P4+P7 (0,56) e P6+P8 (0,742), para as combinações de peptídeos.

As Razões de verossimilhança positiva e negativa (LR+ e LR-, respectivamente), com as combinações de peptídeos, demonstraram os seguintes valores (Figura 4): P1+P2 (LR+ = 2,11; LR- = 0,38), P3+P5 (LR+ = 3,35; LR- = 0,48), P4+P7 (LR+ = 1,93; LR- = 0,5) e P6+P8 (LR+ = 2,88; LR- = 0,2).

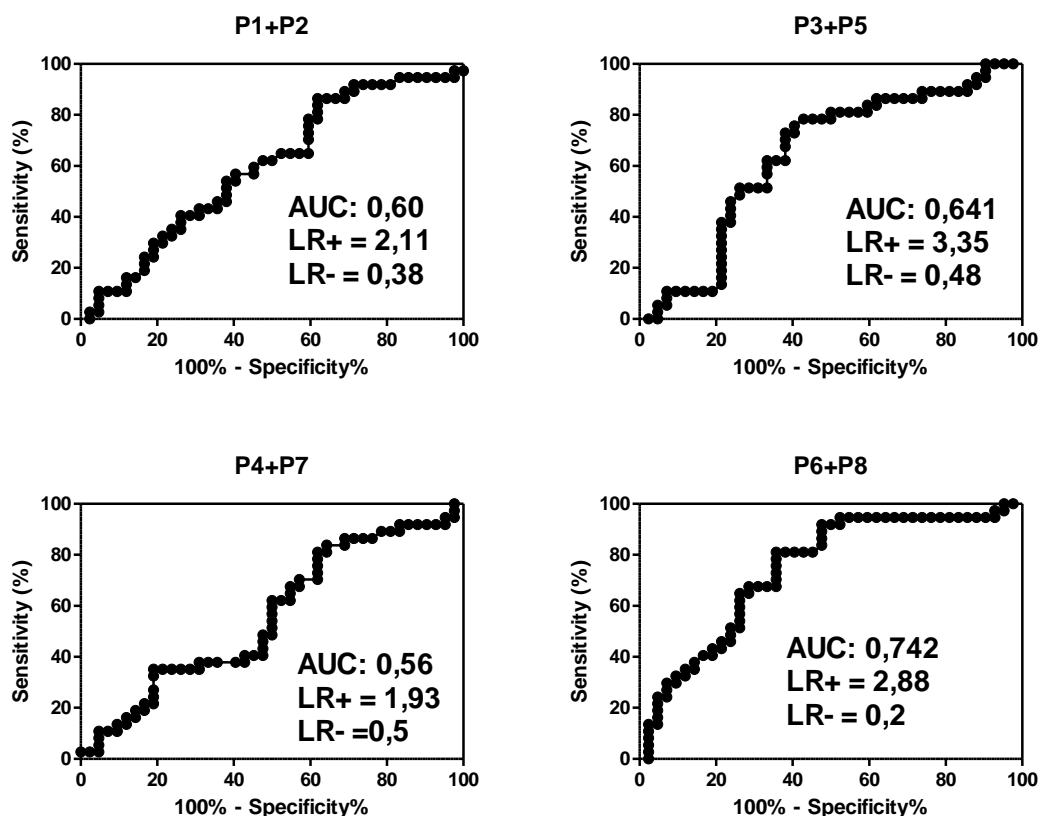


Figura 4. Análises de curva ROC utilizando o imunoensaio ELISA-IgG para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soros de ovelhas. A figura mostra a eficiência diagnóstica representada pela Área sob a curva (AUC), razão de verossimilhança positiva (LR+) e razão de verossimilhança negativa (LR-).

Analisando estes dados em conjunto, a combinação entre os peptídeos P6+P8 foi aquela que apresentou características mais balanceadas quando comparadas com as demais.

DISCUSSÃO

Oocistos de *Toxoplasma gondii* podem resistir por vários meses em condições climáticas favoráveis. Dessa forma, os animais herbívoros podem ser considerados sentinelas epidemiológicas, determinando a carga de agentes infecciosos transmitidos pela água ou pelo solo (CABALLERO-ORTEGA et al., 2008). A toxoplasmose é reconhecidamente uma das principais causas de aborto em ovelhas no mundo todo, porém as perdas reais são difíceis de serem estimadas, porque geralmente a doença surge em surtos, apenas uma pequena parcela de ovelhas que abortaram é submetida ao diagnóstico, além do fato de que o material utilizado no diagnóstico é muitas vezes inadequado, e de que a toxoplasmose não costuma produzir doença clínica na ovelha (DUBEY, 2009). Por outro lado, a carne ovina por ser muito apreciada, principalmente em países europeus, figura entre os principais fatores de risco para mulheres gestantes, sendo considerada uma importante fonte de infecção pelo *T. gondii* (DUMETRE et al., 2006). Portanto, diagnosticar corretamente ovelhas, principalmente as reprodutoras, é de fundamental importância tanto para a saúde do rebanho como também para a dos seres humanos.

Estudos anteriores demonstraram que o ELISA é uma técnica sensível para diagnosticar a infecção pelo protozoário em ovelhas (SAWADOGO et al., 2005). Assim, estudos prévios avaliaram proteínas recombinantes no diagnóstico da toxoplasmose em ovinos, utilizando as proteínas: MIC1-MAG1-SAG1(S), SAG1(L)-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1(S), SAG2-GRA1-ROP1(L) e GRA1-GRA2-GRA6; P22, ROP1 e GRA1 (FERRA et al., 2015; HOLEC-GASIOR et al., 2014). Porém, ainda não havia sido avaliado o potencial de peptídeos sintéticos no diagnóstico desses animais, para que demonstrem os seguintes benefícios: ser precisamente sintetizados como reagente para imunoensaio, ser facilmente obtido, apresentar um custo relativamente baixo e não necessitar de organismos vivos para produção. Outra vantagem significativa é a possibilidade de selecionar regiões imunogênicas específicas das proteínas do parasita que se comportam como proteínas imunodominantes, na ausência de componentes de células hospedeiras, que são associados com reatividade cruzada nos imunoensaios e que podem ser eliminados com a utilização de peptídeos sintéticos.

No presente trabalho observou-se uma soroprevalência de 47% dentre as setenta e nove amostras de soro ovino avaliado. Esse fato pode ser explicado devido às

condições climáticas favoráveis e pela exposição frequente dos ovinos a oocistos de *T. gondii* liberados por felinos nas pastagens. De acordo com Dubey, em sua revisão, a prevalência da toxoplasmose em ovelhas varia de 3 a 95%, dependendo do país (DUBEY, 2009), demonstrando que a contaminação ambiental é um fator influenciador na prevalência da doença nesses animais.

No trabalho de Holec-Gasior, as proteínas recombinantes GRA1 e ROP1 foram capazes de detectar todos os soros positivos, assim como o antígeno nativo (STAg), resultando numa sensibilidade de 100%. Os antígenos recombinantes P22 e GRA9 apresentaram variação de sensibilidade de 98,9% em P22 e de 40,9% em GRA9 (HOLEC-GASIOR et al., 2014). No presente trabalho, foram utilizados oito peptídeos sintéticos, dentre os quais quatro peptídeos foram sintetizados a partir da análise *in silico* de duas proteínas do parasito (GRA10 = 590 - 604 aa e 674 - 688 aa, GRA15 = 283 - 297 aa e 370 - 384 aa; Tabela1) e os outros quatro derivados de proteínas de micronema, de grânulo denso ou da superfície do parasito (SAG2Y, SRS52A, MIC14 e GRA4). A avaliação dos peptídeos sintéticos utilizados isoladamente mostrou que os melhores desempenhos foram de MIC14 (sensibilidade 73%, especificidade 73%, acurácia 0,63 e AUC 0,701), GRA10 (P5 = sensibilidade 76%, especificidade 69%, acurácia 0,62) e GRA10 (P6 = sensibilidade 81%, especificidade 60%, acurácia 0,6). Procedendo à combinação de peptídeos, observou-se uma melhora representada por GRA10+GRA15 (sensibilidade 82,27%, especificidade 70%, acurácia 0,82 e AUC 0,742).

As variações encontradas na precisão das proteínas recombinantes podem ser explicadas pelo fato de que como são produzidas em sistemas de expressão bacterianos (*E. coli*, por exemplo) e, frequentemente, podem perder as suas propriedades antigênicas, devido ao dobramento incorreto das proteínas. Por esse motivo, alguns dos epítomos característicos das proteínas nativas não estão presentes no antígeno recombinante e, por conseguinte, não são reconhecidos por anticorpos específicos (HOLEC-GASIOR et al., 2014). Da mesma forma que algumas proteínas recombinantes podem apresentar baixa sensibilidade (40,9% em GRA9) ocasionada pelos motivos citados, os peptídeos sintéticos também precisam ser analisados de forma mais minuciosa como ferramenta diagnóstica. Os alvos proteicos em *T. gondii* são muito variados, disponibilizando um amplo painel de proteínas com potencial diagnóstico da infecção. A análise de bioinformática do genoma de *T. gondii* sugere que, pelo menos,

800 genes codificam proteínas de secreção como micronema, roptria, e de grânulos densos (WEISS et al., 2009).

No presente trabalho os peptídeos sintéticos foram conjugados com BSA, como proteína carreadora, no entanto, existem outras moléculas que podem ser utilizadas com esta finalidade. Estes peptídeos podem também ser produzidos sem moléculas conjugadas, como no trabalho pioneiro com *Leishmania braziliensis* (MENEZES-SOUZA et al., 2015). Diante dos resultados obtidos, podemos concluir que a combinação dos peptídeos GRA10+GRA15 (P6+P8) obteve o melhor desempenho diagnóstico e, portanto, pode ser proposta para ser utilizada na detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* em amostras de soros de ovinos.

REFERÊNCIAS

BOOTHROYD, J. C.; DUBREMETZ, J. F. Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 79-88, Jan 2008.

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. 248-54, May 1976.

CABALLERO-ORTEGA, H. et al. Frequency of *Toxoplasma gondii* infection in sheep from a tropical zone of Mexico and temporal analysis of the humoral response changes. **Parasitology**, v. 135, n. 8, p. 897-902, Jul 2008.

CARVALHO, F. R. et al. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, Aug 2008.

CENCI-GOGA, B. T. et al. *Toxoplasma* in animals, food, and humans: an old parasite of new concern. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 7, p. 751-62, Jul 2011.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p. 1-14, Jul 2009.

DUBEY, J. P.; KIRKBRIDE, C. A. Enzootic toxoplasmosis in sheep in north-central United States. **Journal of Parasitology**, v. 75, n. 5, p. 673-6, Oct 1989.

DUMETRE, A. et al. *Toxoplasma gondii* infection in sheep from Haute-Vienne, France: seroprevalence and isolate genotyping by microsatellite analysis. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3-4, p. 376-9, Dec 2006.

FAOSTAT. FAOSTAT domains - live animals. 2014. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QA/E> >. Acesso em: 29/06.

FERRA, B.; HOLEC-GASIOR, L.; KUR, J. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. **Parasitology International**, v. 64, n. 5, p. 288-94, Oct 2015.

GAZZONIS, A. L. et al. *Toxoplasma gondii* in small ruminants in Northern Italy - prevalence and risk factors. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 22, n. 1, p. 62-8, 2015.

GREINER, M.; SOHR, D.; GOBEL, P. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 185, n. 1, p. 123-32, Sep 1995.

HOLEC-GASIOR, L. et al. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 146-52, Dec 2014.

HUTCHINSON, J. P.; SMITH, R. P. Seropositivity to *Toxoplasma* infection in sheep samples submitted to Animal and Plant Health Agency laboratories between 2005 and 2012. **Veterinary Record**, v. 176, n. 22, p. 573, May 2015.

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

LEKUTIS, C. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-92, Oct 2001.

LUDER, C. G.; SEEGER, F. *Toxoplasma gondii* and MHC-restricted antigen presentation: on degradation, transport and modulation. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1355-69, Oct 2001.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin L-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 1, p. e3426, Jan 2015.

PAREDES-SANTOS, T. C.; DE SOUZA, W.; ATTIAS, M. Dynamics and 3D organization of secretory organelles of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Structural Biology**, v. 177, n. 2, p. 420-30, Feb 2012.

SAWADOGO, P. et al. Seroprevalence of *T. gondii* in sheep from Marrakech, Morocco. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 89-92, Jun 2005.

SHAAPAN, R. M.; EL-NAWAWI, F. A.; TAWFIK, M. A. Sensitivity and specificity of various serological tests for the detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 359-62, May 2008.

SHARIF, M. et al. *Toxoplasma gondii* infection among sheep and goats in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Parasitology Research**, v. 114, n. 1, p. 1-16, Jan 2015.

SILVA, D. A. et al. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, n. 3, p. 181-95, Aug 2002.

SUN, X. F. et al. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA1, GRA7 and soluble antigens for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 100, p. 161-164, Jun 2015.

WEISS, L. M. et al. *Toxoplasma gondii* proteomics. **Expert Review of Proteomics**, v. 6, n. 3, p. 303-13, Jun 2009.