



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

HEBER LEÃO SILVA BARROS

Avaliação de epítomos derivados de micronema MIC8 e de antígeno de superfície SRS52A de *Toxoplasma gondii*, associados a diferentes adjuvantes, como possíveis antígenos vacinais contra a toxoplasmose

UBERLÂNDIA – MG

2020

HEBER LEÃO SILVA BARROS

Avaliação de epítomos derivados de micronema MIC8 e de antígeno de superfície SRS52A de *Toxoplasma gondii*, associados a diferentes adjuvantes, como possíveis antígenos vacinais contra a toxoplasmose

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA – MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B277 Barros, Heber Leão Silva, 1991-
2020 Avaliação de epítomos derivados de micronema MIC8
e de antígeno de superfície SRS52A de *Toxoplasma*
gondii, associados a diferentes adjuvantes, como
possíveis antígenos vacinais contra a toxoplasmose
[recurso eletrônico] / Heber Leão Silva Barros. - 2020.

Orientador: José Roberto Mineo.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de
Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em:

<http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.738>.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. I. Mineo, José Roberto, 1953-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia.
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. III. Título.

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada
 Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 130º do PPIPA				
Data:	trinta e um de março de dois mil e vinte	Hora de início:	08h30min	Hora de encerramento:	14h38min
Matrícula do Discente:	11613IPA003				
Nome do Discente:	Heber Leão Silva Barros				
Título do Trabalho:	Seleção de epitopos derivados de micronema MIC8 e de antígeno de superfície SRS52A de <i>Toxoplasma gondii</i> com potencial vacinal e utilização dos correspondentes peptídeos sintéticos associados a diferentes adjuvantes aplicados à imunoprofilaxia contra a toxoplasmose.				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biotecnologia empregada no diagnóstico e controle de doenças				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Fatores de virulência do <i>Toxoplasma gondii</i> e imunomarcadores de resistência do hospedeiro				

Reuniu-se por conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta por: Angelica de Oliveira Gomes - ICBN/UFTM; Silas Silva Santana - IECT/UFVJM; Jair Pereira da Cunha Junior - ICBIM/UFU; Bruna Barbosa de Sousa Simamoto - ICBIM/UFU e José Roberto Mineo - ICBIM/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Sr. José Roberto Mineo, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a) agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **José Roberto Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2020, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jair Pereira da Cunha Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/03/2020, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 31/03/2020, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Barbosa de Sousa Simamoto, Usuário Externo**, em 31/03/2020, às 14:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silas Silva Santana, Usuário Externo**, em 31/03/2020, às 14:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1957487** e o código CRC **29F2C9E5**.

AGRADECIMENTO

A DEUS, por todas as dádivas e oportunidades alcançadas, por toda a benevolência que vem me mostrando.

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

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

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

À família Polloni: Luiz Sérgio, Aparecida, Luiz Paulo e Lorena, agradeço a amizade e paciência.

Aos amigos e companheiros de bancada, Tamires, Patrício, Ana Cláudia, Cristina, Silas e Fernando, pela amizade e ajuda essencial no planejamento, execução e interpretação dos experimentos.

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

Aos colegas de laboratório, Eliézer, Vanessa Resende, Vanessa Miranda, Anna Laura, Camila e Flávia, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de convívio.

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

Romanos 12:2

RESUMO

A toxoplasmose, zoonose causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, é um parasita virtualmente capaz de infectar qualquer hospedeiro homeotérmico, possuindo casos registrados em diversas espécies de aves e mamíferos, incluindo humanos. Essa doença apresenta relevância não somente para os seres humanos, uma vez que a infecção por este protozoário está associada a perdas financeiras substanciais na pecuária, principalmente na ovina e caprina. Humanos infectados podem ser assintomáticos ou apresentar diversos sintomas diferentes, sendo que os mais graves usualmente são observados em indivíduos que pertencem aos grupos de risco para essa doença, como os pacientes imunocomprometidos ou gestantes cujos conceitos podem ser infectados. Na hipótese da transmissão vertical da gestante para o conceito, a toxoplasmose pode causar diversos sintomas, que podem ser menos graves, como casos de coriorretinite brandas, até as manifestações mais severas, caracterizados por mal-formações do sistema nervoso central do feto e até mesmo morte intra-uterina e aborto. Para indivíduos imunocomprometidos, a toxoplasmose também representa riscos significativos, uma vez que os cistos parasitários latentes no sistema nervoso central podem reativar o processo inflamatório, causando neurotoxoplasmose, que pode ser fatal. Ainda que seja capaz de causar grande dano ao hospedeiro, possivelmente levando a óbito ou causando sequelas que prejudiquem a qualidade de vida do indivíduo afetado pelo restante de sua vida, essa doença continua a ser negligenciada. Fruto da falta de vigilância e conscientização sobre essa doença, tanto por parte de profissionais da saúde como da população em geral, acontecem anualmente diversos surtos em nosso país e em todo o mundo, sendo sempre caracterizada pela demora em chegar ao diagnóstico correto. No presente trabalho, estudamos uma alternativa que possa amenizar os efeitos dessa doença por meio do princípio da imunoprevenção. Para atingir esse objetivo, foi realizada a predição de três peptídeos contendo 15 resíduos de aminoácidos cada, por meio de ferramentas de predição disponíveis com potencial para atuarem como epitopos para células B. Os trechos foram analisados a partir de duas sequências mais imunodominantes da proteína 8 secretada pela organela Micronema (MIC8) e 1 da sequência relacionada a antígenos de superfície 52A (SRS52A). Aos peptídeos sintetizados foram adicionados compostos imunoadjuvantes, como hidróxido de alumínio, ou lectina derivada de *Synadenium carinatum* (ScLL), ou propranolol, os quais foram utilizados para imunizar camundongos. Foram realizados ensaios para quantificar os níveis de anticorpos e de citocinas produzidos, em adição aos parâmetros de sobrevivência e da carga parasitária após 30 dias de infecção. Observou-se que todos os animais imunizados com peptídeos produziram anticorpos

específicos à proteína original, exceto pelos grupos imunizados com propranolol. Em relação à análise de citocinas produzidas, os grupos imunizados com peptídeos + ScLL tiveram menores concentrações de citocinas, comparados ao grupo não imunizado, porém a razão de citocinas do perfil Th1 por Th2 foi mais alta nos grupos em que o ScLL esteve presente como adjuvante. Além disso, os animais imunizados com peptídeos e ScLL sobreviveram um tempo maior do que os não imunizados, ainda que a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Por fim, a carga parasitária, nos grupos de animais imunizados com formulação na qual ScLL esteve presente, foi significativamente menor, ficando em cerca de 25% da carga observada nos animais não imunizados. Em síntese, os resultados obtidos demonstram que os peptídeos preditos conservaram suas características imunodominantes e juntamente com ScLL, foram capazes de induzir uma resposta de maior eficácia contra a infecção, particularmente em relação à fase crônica, apresentando-se, portanto, como uma ferramenta potencial em estudos futuros de prevenção na cadeia epidemiológica da toxoplasmose.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; micronema MIC8; antígeno SRS52A; peptídeos sintéticos; novos adjuvantes; protocolos vacinais.

ABSTRACT

Toxoplasmosis, a zoonosis caused by the mandatory intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*, is a disease virtually capable of infecting any homeothermic host, with cases recorded in several species of birds and mammals, including humans. This disease is relevant not only for humans, since infection with this protozoan is associated with substantial financial losses in livestock, especially in sheep and goats. Infected humans can be asymptomatic or have several different symptoms, the most serious of which are usually seen in individuals who belong to the groups at risk for this disease, such as immunocompromised patients or pregnant women whose concepts can be infected. In the hypothesis of vertical transmission from the pregnant woman to the fetus, toxoplasmosis can cause several symptoms, which can be less severe, such as cases of mild chorioretinitis, even the most severe manifestations, characterized by malformations of the central nervous system from fetus and even intrauterine death and abortion. For immunocompromised individuals, toxoplasmosis also constitutes significant risks, since latent parasitic cysts in the central nervous system can reactivate the inflammatory process, causing neurotoxoplasmosis, which can be fatal. Although it is capable of causing great damage to the host, possibly leading to death or causing sequelae that impair the quality of life of the affected person for the rest of his life, this disease continues to be neglected. As a result of the lack of vigilance and awareness about this disease, both by health professionals and the population in general, several outbreaks occur annually in our country and around the world, always being characterized by the delay in reaching the correct diagnosis. In the present work, we studied an alternative that can mitigate the effects of this disease through the principle of immunoprophylaxis. To achieve this goal, three peptides were predicted containing 15 amino acid residues each, using available prediction tools with the potential to act as epitopes for B cells. The regions were analyzed looking for the two most immunodominant sequences of the secreted protein 8 by the Micronema organelle (MIC8) and one of the sequences related to 52A surface antigens (SRS52A). The synthesized peptides were added immunoadjuvant compounds, such as aluminum hydroxide, or lectin derived from *Synadenium carinatum* (ScLL), or propranolol, which were used to immunize mice. Tests were carried out to quantify the levels of antibodies and cytokines produced, in addition to the parameters of survival and parasitic load after 30 days of infection. It was observed that all animals immunized with peptides produced specific antibodies to the original protein, except for groups immunized with propranolol. Regarding the analysis of produced cytokines, the groups immunized with ScLL

had lower concentrations of cytokines than the non-immunized group, however the ratio of cytokines of the Th1 profile to Th2 was higher. In addition, the animals immunized with peptides and ScLL survived longer than those not immunized, although the difference was not statistically significant. Finally, the parasitic load, when the ScLL group was present, was significantly lower, being around 25% of the load observed in the non-immunized animals. In summary, the results obtained demonstrate that the predicted peptides retained their immunodominant characteristics and, together with ScLL, were able to induce a more effective response against infection, particularly in relation to the chronic phase, thus presenting itself as a potential tool in future prevention studies in the epidemiological chain of toxoplasmosis.

Keywords: Immunization; peptides; novel adjuvants; plant extract; toxoplasmosis; *Toxoplasma gondii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das etapas seguidas deste trabalho-----	32
Figura 2: Representação da utilização de animais neste trabalho-----	40
Figura 3 – Lectina do látex de <i>Synadenium carinatum</i> purificada-----	43
Figura 4 – Acompanhamento da imunização-----	44
Figura 5 – Análises sorológicas de animais imunizados e infectados-----	45
Figura 6 – Análise da produção de citocinas por esplenócitos de animais imunizados-	46
Figura 7 – Carga parasitária no cérebro de animais imunizados e infectados-----	49
Figura 8 – Curva de sobrevivência de C57BL/6 imunizados e desafiados-----	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos peptídeos sintetizados	----- 33
Tabela 2 – Grupos de imunização e a composição da imunização	----- 38

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Parasita	16
1.2. A toxoplasmose.....	16
1.3. Ciclo biológico	21
1.4. Morfologia do parasita	23
1.5. Interação hospedeiro e parasita.....	24
1.6. Prevenção	26
1.7. Imunoprofilaxia.....	27
2. JUSTIFICATIVA.....	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1. Ética na experimentação animal.....	32
4.2. Delineamento experimental.....	32
4.3. Seleção e Síntese de Peptídeos	33
4.4. Produção de Antígeno Solúvel de <i>T. gondii</i> (STAg).....	34
4.5. Adjuvantes	34
4.5.1. ScLL	34
4.5.2. Propranolol	36
4.6. Modelos experimentais	36
4.7. Imunização.....	37
4.8. Análises sorológicas.....	38
4.9. Infecção e Desafio.....	39
4.9.1. Infecção crônica.....	40
4.9.2. Grupo desafio	40
4.10 Citocinas	40
4.11 Contagem de cistos	42
4.12 Análise estatística.....	42
5. RESULTADOS.....	43
5.1. Delineamento e síntese dos peptídeos	43
5.2. Obtenção de ScLL	43
5.3. Acompanhamento da imunização.....	44

5.4. Produção de citocinas	45
5.5. Contagem de cistos.....	48
5.6. Sobrevivência.....	51
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS	61

APRESENTAÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose causada por um protozoário intracelular obrigatório chamado *Toxoplasma gondii*. Esse parasita, pertencente ao filo Apicomplexa, é oportunista e amplamente disseminado por diversas espécies de animais, virtualmente todas aves e mamíferos. Além de não apresentar predileção por qualquer espécie de hospedeiro, essa espécie parasitária também é pouquíssimo seletiva com relação às células em que irão penetrar, sendo necessário apenas que aquela célula seja nucleada. Com relação à infecção em humanos, as estimativas atuais indicam que cerca de 2/3 da população humana está infectada por esse parasita. O motivo dessa doença não estar nos holofotes mundiais é a sua incapacidade de gerar sintomas severos em indivíduos imunocompetentes, ou pelo menos na maioria deles, mas ainda assim essa doença é extremamente maléfica para determinados grupos de risco. Fetos de gestantes, indivíduos imunossuprimidos constituem a população humana que a toxoplasmose se desenrola nos sintomas mais severos. No caso dos fetos das gestantes, atualmente acredita-se que a infecção congênita mais frequentemente acontece com mais frequência quando a primoinfecção acontece durante a gestação. Os possíveis sintomas variam de acordo com o trimestre em que a infecção acontece e podem ter diferentes graus de severidade. Os sintomas mais comuns são aborto espontâneo, morte fetal intrauterino, nascimento de crianças com uma série de comprometimentos visuais e/ou neurológicos, como coriorretinite, cegueira, hidrocefalia, déficit cognitivo ou calcificações cerebrais, apresentando sequelas para o restante de sua vida.

A toxoplasmose, atualmente, pode ser diagnosticada de diferentes maneiras, sendo que boa parte delas envolve algum tipo de análise sorológica, pois é um método de fácil realização e também de fácil obtenção de amostra, apresentando especificidade e sensibilidade normalmente aceitáveis, mas que tendem a variar de acordo com a metodologia utilizada. Porém, mesmo com especificidade e sensibilidade, essa doença tende a não ser corretamente diagnosticada. A falta de conhecimento a respeito dessa doença fica evidente nos diversos surtos que aconteceram recentemente no mundo, nos quais diversos indivíduos desenvolveram a doença e dela padeceram, inclusive com óbitos e abortos, antes do diagnóstico ser corretamente executado e tratado. Considerando que essa é uma doença oportunista e que normalmente preda uma parcela da população socialmente mais vulnerável, visto que essa parcela da população recorre mais frequentemente a açougues clandestinos e a água não tratada, seria interessante desenvolver uma ferramenta capaz de fornecer proteção em larga escala a todas as pessoas, tanto aquelas do grupo de risco quanto o restante da população. Essa

ferramenta poderia ser a imunoprofilaxia, um conceito que já tem centenas de anos e que ainda não foi satisfatoriamente aplicado contra a toxoplasmose.

A presente tese de doutorado, realizada no Laboratório de Imunoparasitologia “Dr. Mario Endsfieldz” da Universidade Federal de Uberlândia, teve como objetivo pesquisar a capacidade de uma série de novos antígenos vacinais, associados com adjuvantes experimentais, em induzir proteção contra essa doença em modelos murinos. Vários parâmetros foram mensurados, caracterizando a resposta imunológica de animais imunizados e não imunizados, possibilitando a comparação de uma infecção com ou sem a imunização prévia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Parasita

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório ubiquitário, capaz de infectar diversas espécies de animais. Foi inicialmente identificado por Nicolle e Manceaux (1908) em tecidos de um pequeno roedor da África, conhecido como Gundi (*Ctenodactylus gundi*). Esse animal foi usado para criar o nome da espécie de protozoário nele identificada, que recebeu esse nome devido ao seu formato de arco (*Toxo*, que quer dizer formato de arco, e *plasma*, que significa forma de vida) e pela espécie do hospedeiro na qual foi identificada (*gundi*, que foi erroneamente grafada como *gondii*) (DUBEY, 2008). Interessante ressaltar que, também no ano de 1908, esse parasita foi identificado no Brasil, por Splendore (1908). Após sua descoberta, este protozoário foi registrado parasitando diversas outras espécies, sendo que atualmente todos estes isolados estão categorizados dentro da espécie *Toxoplasma gondii* (DUBEY, 2008). Este parasita é único em seu gênero e pertence também ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Conoidasida e família Sarcocystidae (BLADER; SAEIJ, 2009).

1.2. A toxoplasmose

A infecção por *Toxoplasma gondii* resulta na toxoplasmose. As manifestações clínicas dessa doença podem variar intensamente, de acordo com o status imunológico do hospedeiro, virulência da cepa, carga parasitária adquirida e também pela forma que a infecção é contraída (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Nos indivíduos imunocompetentes, normalmente a infecção é assintomática ou apresenta uma série de sintomas brandos, inespecíficos e autolimitados que frequentemente são confundidos com outras doenças. Entre os sintomas mais comumente vistos durante a fase aguda, nesses indivíduos, estão a linfadenopatia cervical com linfonodos aumentados por até 45 dias após a infecção, febre, dores musculares, astenia e cefaleia. Eventualmente são relatados casos de inflamação do tecido cardíaco, pneumonia, hepatite e encefalite nesses indivíduos, mas esses relatos são extremamente raros (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Uma vez que o sistema imunológico do indivíduo consiga controlar a fase aguda da toxoplasmose, ele exercerá uma pressão que exterminará os taquizoítos até que não mais sejam detectados, porém não são capazes de extinguir os bradizoítos inseridos nos cistos, logo a toxoplasmose passa para a sua fase crônica, cuja sintomatologia ainda não está totalmente caracterizada, mas vem sendo

relacionada a diversos distúrbios neurológicos e psicológicos (FLEGR, 2013; COCARO et al., 2016; ESSHILI et al., 2016; MAHMOUDVAND et al., 2016).

A doença muda completamente de prognóstico quando os indivíduos infectados pertencem a algum dos grupos de risco. Em pessoas imunodeficientes e fetos, o parasita encontra um ambiente rico para sua nutrição e replicação descontrolada, uma vez que o sistema imunológico não é capaz de barrar o aumento da carga parasitária. A infecção se dissemina e atinge diversos órgãos do hospedeiro, incluindo sistema nervoso central, onde causa os sintomas mais graves da toxoplasmose, podendo levar ao óbito ou aborto, por exemplo (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Além das manifestações do encéfalo, outras podem ser verificadas, como coriorretinite de diversos graus de comprometimento da membrana coróide e retina, pneumonia e patologias em outros órgãos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; MAENZ et al., 2014). No caso dos fetos, os sintomas variam de acordo com a idade gestacional na qual ocorre a infecção primária. Durante o primeiro trimestre da gestação, o que pode ser observado é aborto espontâneo, morte do feto dentro do útero ou o desenvolvimento de lesões graves no sistema nervoso central e nos olhos, porém o . Se a infecção ocorrer durante o segundo ou terceiro trimestre de gestação, as chances de acontecer as manifestações acima descritas são mais reduzidas, mas o que pode acontecer é o nascimento prematuro de crianças que apresentem uma série de má-formações, como alterações de volume craniano (hidrocefalia e microcefalia), problemas de desenvolvimento neurológico (retardamento mental e motor), manifestações oculares centradas nos danos gerados à retina e até mesmo a cegueira. O parasita pode produzir ainda outros sintomas, de acordo com o órgão parasitado. Importante ressaltar que a probabilidade de passagem do taquizoíta para o feto é diretamente correspondente à idade gestacional, sendo que se a primo-infecção acontecer nos primeiros meses de gestação, a probabilidade de transmissão é substancialmente menor do que nos meses finais. (MONTROYA; ROSSO, 2005).

A maioria dos casos de toxoplasmose grave podem ser evitados, ou ao menos terem suas manifestações clínicas amenizadas, se o diagnóstico for realizado de maneira precoce e correta. Essa afirmação vale tanto para gestantes, recém-nascidos e indivíduos adultos, imunocomprometidos ou não, que porventura venham a desenvolver essa doença (SANFELICE et al., 2017). Atualmente, existe uma série de técnicas de diagnóstico que utilizam de diferentes princípios para o diagnóstico da infecção causada por esse parasita e podem ser divididas em diagnóstico direto ou diagnóstico indireto. Pode ser feito ainda, através da análise de determinados componentes da amostra, a determinação do tempo aproximado de infecção e

também se a infecção foi originada a partir de consumo de cistos ou oocistos (SANTANA et al., 2015).

No caso dos métodos de diagnóstico direto, procura-se evidenciar o parasita em alguma amostra colhida do paciente, como sangue, tecido proveniente de biópsia ou mesmo líquido amniótico. Essa metodologia possui vantagens importantes, como a extrema improbabilidade de falsos positivos, visto que boa parte desses métodos é baseado na identificação do parasita dentro do tecido, e a especificidade muito alta que pode ser obtida ao utilizar técnicas avançadas, como reação em cadeia pela polimerase (PCR). Nessa metodologia, a amostra utilizada é um fragmento de tecido ou fluido corporal no qual se suspeita que o parasita possa estar. Frequentemente, essa metodologia é utilizada para testar amostras de líquido amniótico em suspeitas de casos de toxoplasmose congênita (EL BISSATI et al., 2018). A amostra é preparada através de diferentes metodologias que permitam realizar a extração do DNA presente na amostra, tanto do hospedeiro quanto de qualquer outro organismo ali presente. Uma vez que este DNA tenha sido extraído e purificado, ele é amplificado e visualizado em gel ou em tempo real, em um aparelho que permite essa visualização. Seja através de uma PCR tradicional ou uma em tempo real, um dos elementos essenciais para a amplificação do DNA parasitário presente na amostra e que também garante extrema sensibilidade e especificidade à metodologia é a escolha dos *primers* corretos. Esses são sequências de pares de bases complementares a determinada região do genoma que somente aquela espécie parasitária possui. Esse método possui a vantagem de, quando bem executado, ser extremamente sensível e específico, detectando baixíssimas quantidades de parasita na amostra, porém não é frequentemente utilizado devido ao seu alto custo, necessidade de mão de obra altamente qualificada e ser executado somente em centros de pesquisa/diagnóstico que disponham de maquinário adequado (EL BISSATI et al., 2018).

Outra forma de detecção direta do *T. gondii* é a utilização da imunohistoquímica. Essa metodologia é realizada através do tratamento da amostra, que pode ser amostra tecidual proveniente de biópsia, com anticorpos específicos contra *T. gondii*, conjugados a enzimas que, juntamente com um substrato, evidenciem se um taquizoíta/bradizoíta está ou não presente naquele tecido (GONDIM; MINEO; SCHARES, 2017).

Uma terceira metodologia de detecção direta, que atualmente é muito pouco utilizada, mas no passado recente era considerada a forma padrão de diagnóstico direto, é a inoculação de tecido suspeito de conter parasitas em animais de laboratório, como camundongos. Esses animais eram acompanhados por um determinado tempo, podendo chegar até 30 dias, quando

amostras de sangue eram coletadas para verificar se houve soroconversão. Complementarmente, podiam ser eutanasiados e seus órgãos pesquisados em busca de cistos de *T. gondii*. Essa metodologia é dispendiosa, tanto de modelos animais como de tempo, além de ter a grande desvantagem de que a amostra inoculada nos animais deve possuir parasitas viáveis. Atualmente é utilizado também o isolamento em cultura de células, principalmente na rotina de laboratórios de pesquisa (LIU et al., 2015).

A detecção indireta é baseada na visualização de sinais de resposta do hospedeiro à infecção. No caso da toxoplasmose, as imunoglobulinas específicas contra o *T. gondii* fornecem essas informações e diversas metodologias são utilizadas para evidenciar a presença do anticorpo em amostras do hospedeiro. Interessante ressaltar também que, normalmente, a classe de anticorpo que é pesquisada é a imunoglobulina G (IgG), pois este anticorpo começa a ser produzido depois de 2 semanas do primeiro contato com o antígeno e depois é produzido por um prazo indeterminado (SENSINI, 2006). As metodologias mais frequentemente são teste de imunofluorescência indireta, *immunoblotting* e os diversos tipos de ensaios imunoenzimáticos.

A imunofluorescência indireta possui um embasamento semelhante à imuno-histoquímica, exceto que agora não utilizaremos anticorpos de afinidade conhecida para verificar se há parasitas em determinada amostra, e sim amostras de soro do paciente serão adicionadas a uma lâmina em que tenham parasitas fixados. Dessa forma, se o paciente doador da amostra tiver anticorpos contra o *T. gondii*, essas proteínas se ligarão ao parasita presente na lâmina e posteriormente serão reconhecidas por anticorpos conjugados específicos às imunoglobulinas da espécie do doador da amostra. Esse método é extensivamente utilizado, porém possui a importante desvantagem de necessitar de aparelhos específicos e de alto custo para o seu funcionamento (ROSTAMI; KARANIS; FALLAHI, 2018).

Outra metodologia que permite a visualização de anticorpos na amostra de soro do paciente é o *immunoblotting*. Nessa metodologia, é realizada a eletroforese do antígeno total do parasita e posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose. A essas membranas de nitrocelulose são adicionadas as amostras de soro, sendo que, se houver anticorpos específicos contra o parasita na amostra, eles se ligarão à membrana, no ponto onde seu alvo se encontra, e posteriormente serão reconhecidos por anticorpos conjugados a enzimas que, juntamente com o substrato, provocarão a emissão de sinal naquele local. Essa metodologia é bastante versátil e pode ser utilizada tanto para detecção de diferentes classes de anticorpos como para verificar diferenças de reconhecimento antigênico provenientes de infecções com diferentes cepas de parasitas (ROSTAMI; KARANIS; FALLAHI, 2018).

Por fim, os ensaios imunoenzimáticos representam os métodos de triagem populacional mais frequentemente utilizados atualmente, uma vez que permitem a verificação de dezenas de amostras simultaneamente e também a automatização do processo. A metodologia é baseada na evidência da interação antígeno-anticorpo realizada em poços de microtitulação, sendo que é possível verificar diferentes classes de anticorpos, quantificação da positividade ou negatividade das amostras, boa especificidade e sensibilidade, além de extrema versatilidade, como demonstrado nos diferentes objetivos que podem ser alcançados ao realizar mudanças pontuais, como o antígeno usado para sensibilização da placa ou a especificidade do conjugado utilizado na reação (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980; (ROSTAMI; KARANIS; FALLAHI, 2018).

Uma vez que a toxoplasmose tenha sido corretamente diagnosticada, é iniciado o tratamento. O tratamento deve ser escolhido de acordo com o estágio atual da infecção e também observando as características do hospedeiro (DUNAY et al., 2018).

Indivíduos imunocompetentes, imunodeficientes recém nascidos e outros indivíduos não gestantes normalmente podem ser tratados com drogas do grupo dos antagonistas dos folatos, que agirão reduzindo a proliferação do parasita ao inibir a atividade de enzimas envolvidas na síntese do folato; macrolídeos, que possuem um efeito tóxico direto ao parasita ao inibir a sua síntese proteica; e fluoroquinolonas, que atuam inibindo a produção de DNA pelo parasita. As gestantes, devido à alta toxicidade aos fetos que a maioria das classes de drogas aqui listadas apresenta, normalmente são tratadas com espiramicina, uma droga do grupo dos macrolídeos menos tóxica e capaz de impedir a transmissão vertical deste parasita. Nos casos de toxoplasmose aguda, pode ser utilizado ainda combinações desses medicamentos, resultando na eliminação mais eficaz desse parasita (MONTROYA, LIESENFELD, 2004; DUNAY et al., 2018; SANFELICE et al., 2017).

Com relação à distribuição epidemiológica da toxoplasmose, é necessário citar que se trata de uma infecção extremamente prevalente em todo o globo, com estimativa de que 2/3 da população global encontra-se infectada (SHAPIRO et al., 2019). No entanto, a prevalência não é distribuída uniformemente pelo mundo, existindo países e regiões que concentram um grande número de casos. A soroprevalência (uma medida que indica o número de pessoas que possuem anticorpos contra *T. gondii* sem que necessariamente tenham exibido sintomas dessa doença) é influenciada por uma série de fatores, sendo os mais importantes deles: clima, oferta de água tratada e hábitos culturais. No caso do clima, é verificado que ele influencia no desenvolvimento do oocisto não esporulado em oocisto esporulado, sendo importante também a manutenção de

um clima com de temperatura relativamente alta (acima de 25°C), com pouca oscilação e umidade alta para que esse oocisto permaneça viável no ambiente por mais tempo. Oferta de água tratada é importante para garantir que a população faça o consumo de água não contaminada com oocistos, visto que surtos já foram atribuídos a fontes de água não tratadas contaminadas com oocistos. Por fim, existem as características sociais, culturais e religiosas dos diferentes segmentos da sociedade, sendo que o consumo de carne crua ou mal-cozida está entre os hábitos que mais disseminam a toxoplasmose (PINTO-FERREIRA et al., 2019; SHAPIRO et al., 2019). A combinação destes resultam em diferenças intensas de soroprevalência, como observado em algumas regiões do norte da Europa e América do Norte que registram até 10% de indivíduos soropositivos para *T. gondii* (AREFKHAH et al., 2019) e acima de 60% em outras regiões, como América do Sul e África tropical (MORAIS et al., 2020).

1.3. Ciclo biológico

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um Apicomplexa e, semelhante a outras espécies desse filo, é um parasita intracelular obrigatório de ciclo heteroxênico. Esse parasita alterna fases em que executa a reprodução sexuada (hospedeiro definitivo) e a reprodução assexuada (demais hospedeiros) e, durante todo o seu ciclo biológico, podem ser vistas 3 formas infecciosas distintas: taquizoíta, bradizoíta e esporozoíta (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; WILHELM; YAROVINSKY, 2014). O seu ciclo biológico só foi desvendado em 1969, seis décadas após a descoberta desse parasita. Essa demora se deve à complexidade do ciclo e também pela demora em associar o parasita à doença por ele causada.

Antes de tratar propriamente do ciclo, é necessário fornecer algumas informações. As três formas infecciosas desse parasita podem ser adquiridas de fontes diferentes. A forma alimentar pode envolver dois tipos de fontes distintas: infecção por esporozoítas, presentes nos oocistos, ao consumir vegetais consumidos crus ou água contaminada; e infecção por cistos, presentes em carnes consumidas cruas ou incorretamente preparadas. Ambas formas resultaram na penetração dos parasitas nas células intestinais e posterior invasão sistêmica do hospedeiro (VON KLITZING et al., 2017). Existe ainda a infecção por taquizoítas, bem menos frequente. Ela pode acontecer por meio da transmissão congênita, no qual o parasita migra da mãe para o feto, ou por outras formas que envolvam a transferência de tecidos, como transplante de órgãos, transfusão de sangue contaminados ou mesmo acidentes laboratoriais com amostras infectadas (PINTO-FERREIRA et al., 2019; HERWALDT, 2001). Nesses casos, o parasita não passa pela etapa de penetração e proliferação nas células intestinais, já tendo acesso direto ao sistema de seu novo hospedeiro (HERWALDT, 2001).

Outra informação que é interessante ressaltar é que esse protozoário possui diversas espécies de hospedeiros intermediários, que virtualmente são todas espécies de aves e mamíferos, porém somente espécies de felídeos são hospedeiros definitivos. Outra peculiaridade interessante é que, ainda que os felídeos infectados liberem milhões de oocistos com as fezes durante 10 a 15 dias da infecção, a esse taxon pertencem as espécies melhor adaptadas a esse parasita, sendo capazes de controlar a carga parasitária da maneira mais efetiva dentre todas espécies até agora analisadas (GAZZINELI et al., 2014).

O ciclo biológico se inicia com a infecção do hospedeiro intermediário, que normalmente ocorre pela via alimentar. Após ingeridos, os cistos e oocistos recebem o estímulo do suco gástrico para eliminarem as suas paredes, derramando as células infecciosas no intestino delgado. As primeiras células parasitadas são aquelas que recobrem a superfície intestinal. Bradizoítas ou esporozoítas penetram nessas células, se multiplicam assexuadamente por um processo chamado de endodiogenia e se transformam em taquizoítas, forma de vida de replicação rápida e metabolismo também rápido. Os taquizoítas emergem das células infectadas e já penetram em outras. Eventualmente as células infectadas ganham a corrente sanguínea e, dessa forma, a infecção passa a ser sistêmica (ZHU et al., 2019). Desde o primeiro contato do parasita com o hospedeiro, a resposta imune é acionada por meio de reconhecimento do patógeno e do dano por ele causado por meio dos receptores de padrão molecular associados a patógeno (PAMP - *pathogen associated molecular patterns*) e outros de padrão molecular associados ao dano (DAMP – *damage associated molecular patterns*), respectivamente. Logo após a infecção, concomitante ao aumento da carga parasitária e invasão dos diversos tecidos pelo *T. gondii*, ocorre uma forte resposta inflamatória do hospedeiro, inicialmente realizada somente com elementos da resposta imunológica inata. Decorridos 10 a 15 dias da infecção, os títulos de IgG contra o *T. gondii* começam a atingir valores detectáveis e, coincidindo com este momento, a resposta imune celular se torna mais efetiva. A partir destes eventos o hospedeiro se torna mais apto a combater o parasita, eliminando as suas formas livres e deixando somente os bradizoítas, encistados dentro de células (ZHU et al., 2019). O hospedeiro intermediário infectado, independente da espécie, possuirá cistos desse parasita em seu corpo por toda a vida (ZHU et al., 2019).

Uma vez que o parasita tenha se encistado, pode acontecer de seu hospedeiro ser predado por um felídeo, que consumirá os tecidos contaminados com cistos. De forma muito semelhante à observada nos hospedeiros intermediários, esses cistos liberarão seu conteúdo na luz intestinal do novo hospedeiro, seguido pela penetração dos bradizoítas nas células intestinais e

transformação do produto do primeiro ciclo de multiplicação assexuada em taquizoítas. A partir desse ponto, o parasita pode seguir por dois caminhos: penetrar em outra célula e repetir o ciclo assexuado, ou penetrar em outra célula intestinal e passar por um processo diferenciado de replicação, chamado de esquizogonia. Esse processo resultará na formação de merozoítas, uma forma precursora dos gametócitos. A formação deste será dependente da penetração dos merozoítas em uma nova célula, onde terminarão o processo de diferenciação por um processo chamado de gamogonia. Gametas masculinos fertilizarão gametas femininos, resultando na formação de oocistos dentro das células intestinais. As células se rompem, liberando oocistos na luz intestinal, que são carregados para o ambiente externo juntamente com as fezes do felídeo. Os oocistos liberados são não esporulados, que quer dizer que as células internas ainda não se diferenciaram em células infecciosas, sendo necessário que o oocisto seja exposto aos fatores ambientais por um período de 2 a 5 dias para que ocorra a esporulação e esse oocisto produza os 4 esporozoítos infectantes. Essas células estão presentes aos pares, dentro de vesículas chamadas de esporozoítos. Interessante realçar que oocistos, em condições ideais de temperatura, abrigo do sol e umidade, podem ficar viáveis por meses no ambiente. Uma vez que se torne esporulado, esse oocisto deverá ser consumido por um novo hospedeiro para que o ciclo reinicie (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

1.4. Morfologia do parasita

Os três estágios infecciosos do parasita possuem uma série de semelhanças e diferenças quando analisados quanto às suas morfologias, expressão de moléculas e comportamento.

O taquizoíta possui forma de meia-lua e está mais presente durante a fase aguda da toxoplasmose, sendo caracterizado por ser capaz de penetrar rapidamente nas células hospedeiras e também realizar seu ciclo rapidamente. Essa forma é capaz de se disseminar pelo corpo do hospedeiro juntamente com as células em que estão hospedadas, sendo então responsáveis pelo caráter sistêmico da infecção. Essas formas possuem as dimensões aproximadas de 4 a 8 μm de comprimento por 2 a 4 μm de largura, com a extremidade apical (anterior) afilada e a posterior mais arredondada. Essa forma parasitária é revestida por uma associação de membranas: a mais externa é contínua, seguida por outras duas membranas que apresentam falhas, sendo que estas membranas mais internas estão associadas a elementos do citoesqueleto do parasita e são responsáveis, juntamente com outros elementos do citoesqueleto, pelos movimentos de *gliding*, essenciais para a penetração desse parasita (HALONEN; WEISS, 2013). Essa forma apresenta ainda o complexo apical, que é uma associação de diversas organelas responsáveis por secretar proteínas que atuam nas diversas

etapas da invasão da célula hospedeira. As organelas mais conhecidas, presentes nesse complexo apical, são as roptrias, micronemas e grânulos densos (MERCIE; CESBRON-DELAUW, 2015; PITTMAN; KNOLL, 2015; WANG et al., 2016).

O bradizoíta é a forma presente dentro do cisto tecidual. Morfologicamente, é extremamente semelhante ao taquizoíta, tanto no formato de arco ou meia-lua quanto nas suas dimensões. As diferenças entre as duas formas residem nas moléculas expressas, distribuição de organelas e também na velocidade de replicação. Um exemplo das diferenças observadas é que esta forma parasitária apresenta um número maior de organelas roptrias e também a expressão de moléculas associadas à resistência contra a ação da pepsina (ROUGIER; MONTROYA; PEYRON, 2017). Outra diferença importante é o comportamento destas formas dentro dos cistos. Diferentemente dos taquizoítas, os bradizoítas se replicam muito lentamente, podendo permanecer por anos dentro da mesma célula hospedeira (ROUGIER; MONTROYA; PEYRON, 2017).

Por fim, existem os esporozoítas. Esta forma é extracelular e incapaz de se replicar, e além disso apresenta maior número de organelas envolvidas com penetração nas células hospedeiras, como roptrias, micronemas e grânulos densos. Uma característica importante é que esta é a única forma vista no ambiente, fora do hospedeiro. Nesses ambientes, os esporozoítas são recobertos por duas vesículas: a primeira, e que está em contato mais íntimo com o parasita, é o esporocisto. A segunda, que recobre dois esporocistos, é o oocisto. Ambas paredes são resistentes a agentes físicos e químicos, dando resistência às variações climáticas e mantendo o oocisto viável por várias semanas e até meses (WESLEY et al., 2018; SHAPIRO et al., 2019).

1.5. Interação hospedeiro e parasita

Talvez um dos aspectos mais estudados a respeito da toxoplasmose é a capacidade do *T. gondii* de invadir os diferentes tipos de células e manipular células parasitadas e a resposta imunológica do hospedeiro, mantendo-se incógnito nos cistos por todo o restante da vida do hospedeiro. O que já foi caracterizado é que essa relação se trata de um processo de manipulação muito refinado, desenvolvido pelo parasita, no qual diversas organelas, proteínas de superfície e substâncias excretadas possuem funções específicas. O processo é composto por diferentes etapas: reconhecimento da célula hospedeira, penetração, que ocorre concomitante à formação do vacúolo parasitóforo, início da etapa de nutrição e replicação parasitária, que leva ao esgotamento da célula hospedeira e sua lise, liberando os parasitas resultantes no meio extracelular (ZHU et al., 2019). Por parte do hospedeiro, normalmente o que acontece é uma

resposta imunológica clássica, com envolvimento da resposta imunológica humoral e, principalmente, a celular (WILHELM; YAEVINSKY, 2014).

O primeiro contato entre parasita e hospedeiro é realizado pelas diferentes moléculas que os recobrem. No caso do parasita, os antígenos de superfície, proteínas e outras moléculas biológicas que recobrem externamente o parasita, realizam esse reconhecimento inicial. Além do reconhecimento, essas moléculas são também responsáveis por ancorar inicialmente parasita e hospedeiro. Importante notar que nesta fase o parasita ainda não se encontra na posição correta para que realize a penetração na célula hospedeira. Essa reorientação, colocando a porção apical do parasita em contato direto com a superfície da célula hospedeira, é mediada por proteínas secretadas pelas micronemas (SHARMA; CHITNIS, 2013). Essas proteínas, secretadas por organelas de mesmo nome, são adesinas capazes de ligar a superfície celular do parasita, em filamentos do citoesqueleto, e à do hospedeiro, ao se ligar a receptores específicos. Essas proteínas, que ancoram firmemente o parasita e a célula hospedeira, formam a junção de movimento (SIBLEY, 2011). Essa estrutura é o primeiro passo para que ocorra a penetração ativa do parasita, por meio de uma movimentação específica conhecida como *gliding*. Este é um processo complexo, no qual o parasita utiliza a motilidade dos filamentos de seu citoesqueleto, aos quais estão ligadas as porções intracelulares das micronemas descritas anteriormente, movimentando esses filamentos da região apical (anterior) até a posterior. Dessa maneira, as micronemas ali ligadas acabam empurrando o parasita em direção à célula hospedeira, de forma helicoidal, forçando a membrana celular da célula hospedeira a se invaginar, sendo que o parasita se aloja dentro dessa invaginação. Essa bolsa é conhecida como vacúolo parasitóforo (HUNTER; SIBLEY, 2012). Nas etapas seguintes, o parasita precisa manipular a célula hospedeira para que ela não o destrua e estabeleça uma forma de conseguir acessar os nutrientes necessários para a sua nutrição e replicação. Então, logo após o parasita forçar a criação do vacúolo parasitóforo, ele secreta proteínas de organelas chamadas roptrias no citoplasma da célula hospedeira, que serão responsáveis por garantir a integridade do vacúolo parasitóforo e também por manipular determinados eventos celulares que, se não fossem inibidos, poderiam resultar na lise do parasita. Quando o ambiente já está protegido da ação da célula hospedeira, é necessário que o vacúolo parasitóforo modifique sua composição, de forma a se tornar seletivamente permeável aos nutrientes necessários aos seus ocupantes. Essa função é desempenhada pelas proteínas secretadas pelas organelas grânulos densos (NAM, 2009).

Essa sequência de eventos é o observado pelo lado do parasita. Já pelo hospedeiro, é possível também descrever uma série de eventos que resultam na fase crônica da infecção. Iniciando do momento em que o parasita penetra na primeira célula do hospedeiro, este é capaz de sentir a presença do parasita através de PAMPs e DAMPs. Dentre os receptores que mais desempenham essa função durante a infecção por *T. gondii*, pode-se destacar os receptores semelhantes a toll (*toll-like receptors* – TLR) 11 e 12, que reconhecerão a profilina, molécula continuamente expressa pelo parasita (PLATTNER et al., 2008; ANDRADE et al., 2013; RAETZ et al., 2013).

Uma vez que o parasita seja reconhecido, uma série de eventos é desencadeada por células residentes e também por células imunológicas, como a liberação de quimiocinas e citocinas pro-inflamatórias, capazes de recrutar e ativar células com capacidade fagocítica (YAROVINSKY, 2014). Dentre as citocinas de maior importância durante essa fase de combate inicial realizado pela resposta imune inata, o interferon- γ é uma das citocinas mais produzidas e utilizadas, pois entra no processo de ativação de diversos grupos celulares diferentes, como linfócitos assassinos naturais (*natural killers* – NK), células dendríticas e outras (ZIMMERMANN et al., 2006). Normalmente, a resposta inata não é suficiente para fazer com que a carga parasitária pare de se elevar, então a resposta imunológica adaptativa é ativada, sendo que uma das células que mais exerce a função de estimular linfócitos específicos a se diferenciar são as células dendríticas, com sua função de apresentadora de antígeno (APC) profissional (YAROVINSKY, 2014). Os linfócitos mais importantes durante a infecção por *T. gondii* são os linfócitos TCD4⁺, graças ao seu papel de ativar e estimular outros tipos celulares, e os TCD8⁺, responsáveis por reconhecer células infectadas e induzi-las à apoptose, destruindo também os parasitas intracelulares no processo (GAZZINELI, 1998). Importante ressaltar que, ainda que se trate de um parasita intracelular, a resposta humoral é importante por ser capaz de atuar no momento em que o parasita está no meio extracelular, sendo que os anticorpos produzidos são capazes de neutralizar o taquizoíta aos quais se ligaram e também de causar a lise deles por meio do sistema complemento ou marcando-os para fagocitose, por exemplo (DUPONT; CHRISTIAN; HUNTER, 2012).

1.6. Prevenção

A toxoplasmose é uma doença contraída, basicamente, por deficiência de medidas higiênicas, higienização incorreta de verduras consumidas cruas e preparo incorreto de carnes. Todas essas formas de transmissão podem ser evitados por meio de práticas adequadas de higienização, como lavar as mãos periodicamente e, especialmente, antes da refeição, lavar

verduras corretamente e preparar bem as carnes (em temperatura de pelo menos 67 °C), evitando o consumo delas cruas ou mal-passadas (ROUATBI et al., 2019). Essas formas de prevenção, aparentemente simples, esbarram em uma série de problemas sérios em diversas regiões, especialmente em países em desenvolvimento ou em regiões carentes. No primeiro caso, existem diversos comportamentos, seja de origem religiosa ou mesmo culinária, que estimulam indivíduos a consumir carne mal-cozida, ou mesmo crua, onde os cistos podem estar ainda viáveis (ROUATBI et al., 2019). Além desses fatores, que são enraizados no comportamento humano, muitas vezes tradicionais e dificilmente alterados, existem ainda a falta de informação e de infra-estrutura básica, que podem acabar acarretando a infecção por meio de oocisto presente em água não tratada contaminada, uma vez que a determinada parcela da população pode não ser fornecida água potável para consumo (SHAPIRO et al., 2019). Vários outros cuidados devem ainda ser tomados para que a transmissão possa ser evitada: não utilizar, em verduras consumidas sem cozimento, utensílios de cozinha que tenham sido previamente utilizados para o manejo de carne e que não tenham sido higienizados e higienizar adequadamente a superfície em que os alimentos são preparados (JONES; DUBEY, 2012).

A história mostra que implementar um padrão de comportamento em grandes populações é uma batalha perdida, visto que é de conhecimento popular que as práticas de higiene são necessárias para a saúde e ainda assim existem grandes números de indivíduos que não as seguem, por diversas razões. Considerando o interesse de combater ou, melhor ainda, evitar essa doença de forma mais eficiente, é necessário buscar alternativas que contornem todas essas dificuldades há muito conhecidas e não sanadas. Uma alternativa, já utilizada há séculos e com grande sucesso em combater outras doenças, é a imunoprofilaxia.

1.7. Imunoprofilaxia

A busca por uma medida imunoprolática já possui um extenso histórico, quando se trata da tentativa de prevenir a toxoplasmose. Os primeiros trabalhos publicados neste sentido normalmente tratam de vacinas de tecnologia de primeira geração, na qual o parasita é utilizado inteiro de forma atenuada ou inativada (CUTCHINS; WARREN, 1956). Nas décadas que se passaram desde a primeira publicação de tentativa de criação de vacina contra a toxoplasmose, muito progresso já foi realizado, mas, ainda assim, atualmente somente 1 vacina está disponível comercialmente, sendo que a sua utilização é restrita a ovelhas e busca atenuar a infecção para diminuir o número de abortos nessa espécie (HISZCZYNSKA-SAWICKA et al., 2014). Esse único sucesso modesto obtido pode ser explicado devido a diversos fatores relacionados a características inerentes desse parasita: a diversidade genotípica, que se traduz em subespécies

extremamente diversas existentes no ambiente (BOOTHROYD,2009), os vários mecanismos de evasão de que esse parasita dispõem (ZIMMERMANN et al., 2006) e a capacidade de expressar proteínas distintas nas diversas fases de seu ciclo de vida (VERMA; KHANNA, 2013). Ainda assim, várias tentativas foram feitas para tentar contornar essas dificuldades, utilizando diversas estratégias diferentes. Como ressaltado anteriormente, a pesquisa para desenvolvimento da vacina contra a toxoplasmose foi iniciada utilizando formulações que continham o parasita inteiro, sendo este atenuado ou inativado. Ao longo das décadas, essa metodologia se aprimorou e ainda nos dias atuais gera trabalhos interessantes, nos quais os parasitas agora são atenuados por manipulação genética (WANG et al., 2020), irradiação com materiais radioativos (ZORGI et al., 2011), entre outras abordagens. Seguindo o sucesso observado no estudo e imunoprevenção de outras doenças, foram também utilizadas as estratégias de segunda e terceira geração na produção de vacinas, sendo que estas estratégias envolvem a utilização de proteínas do parasita ou da sequência genética que codifica proteínas importantes à biologia do parasita, respectivamente (ARAB-MAZAR et al., 2016; GHAFARIFAR et al., 2019; WANG et al., 2019). Ambas abordagens renderam resultados interessantes nos diversos trabalhos em que foram utilizados, contribuindo também para a descoberta das funções das proteínas desse parasita (WANG et al., 2019).

Uma das abordagens mais recentemente utilizadas para a identificação de possíveis antígenos vacinais é a predição de regiões imunodominantes e funções proteicas a partir de análises computacionais que observam diversas características da sequência analisada (ROMANO; GIUGNO; PULVIRENTI, 2011). Essa abordagem permite uma aproximação mais racional do problema, possibilitada pelos dados obtidos a partir de estudos extensos a respeito das moléculas do parasita, que caracterizam sua morfologia, função e outros aspectos (ROMANO; GIUGNO; PULVIRENTI, 2011; ZHOU¹ et al., 2016). A partir dessa ferramenta, é possível estimar quais estruturas são primordiais para a biologia do parasita e também ficam expostas, sendo facilmente reconhecidas por anticorpos, receptores ou outras moléculas de defesa do hospedeiro (ROMANO; GIUGNO; PULVIRENTI, 2011). Uma vez que regiões com essas características são identificadas, elas podem então ser produzidas quimicamente ou expressas em algum modelo biológico, purificadas e estudadas quanto à capacidade de agirem como antígenos vacinais, especialmente se associadas a adjuvantes imunológicos (WANG et al., 2016).

A formulação vacinal normalmente é composta pelo antígeno vacinal associado a um adjuvante, sendo que a função deste último é intensificar a imunogenicidade do composto a ele

associado (HE et al., 2015). A escolha do adjuvante deve ser pautada no tipo de resposta imunológica que é mais interessante de ser gerada contra o antígeno vacinal associado. No caso de *Toxoplasma gondii*, já foi demonstrado que, durante a fase aguda da infecção, é interessante que o perfil da célula TCD4⁺ *helper* 1 Th1 seja o mais ativo e ele será responsável por eliminar os taquizoítas intracelulares (SONAIMUTHU et al., 2016). Naturalmente, o adjuvante ao qual o antígeno vacinal contra esse parasita deveria ser associado é um capaz de ativar esse tipo de resposta. Dentre os inúmeros compostos que já foram descritos na literatura, compostos derivados de plantas aparecem entre os mais promissores (TRIER et al., 2019). Um composto, obtido por um processo relativamente fácil e barato, derivado de *Synadenium carinatum* é a lectina extraída do látex dessa planta (ScLL). Essa lectina já foi demonstrada como capaz de ativar o perfil Th1 quando inserida no sistema de animais, promovendo também diferentes graus de proteção contra toxoplasmose (SOUZA et al., 2016), além de já ter sido testada como antígeno vacinal contra *Neospora caninum* (CARDOSO et al., 2012) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (AFONSO-CARDOSO et al., 2011).

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é um mal que aflinge humanos, registrando prevalência altíssima, e outras espécies, cuja prevalência é desconhecida em sua maioria, mas que é presumidamente tão alta quanto a humana. Na espécie humana, essa infecção é assintomática na grande maioria dos hospedeiros, pois o sistema imunológico é capaz de combater a fase aguda da infecção de maneira eficaz e manter os bradizoítas encistados. Já na parcela da população que apresenta algum tipo de distúrbio imunológico, deixando-os imunossuprimidos ou imunodeficientes, e também nos fetos das gestantes, essa doença apresenta uma face muito mais grave, com sintomas extremamente debilitantes e possibilidade de óbito, aborto ou nascimento prematuro acompanhado de má-formação. Já na pecuária, estima-se que as perdas causadas por esse parasita, em rebanhos bovinos, ovinos e caprinos, sejam imensas. Um parasita como este, virtualmente capaz de infectar qualquer animal homeotérmico e quaisquer células nucleadas, certamente não recebe a atenção devida, atitude evidenciada pelos diversos surtos que vem atualmente sendo registrados. A prevenção é simples, pois esta é uma doença prioritariamente contraída por vias alimentares, porém esbarra em diversos problemas, que vão desde a falta de conscientização e saneamento básico até hábitos culturais e culinários, então uma alternativa se faz necessária. Uma vacina poderia ser essa alternativa. Tendo em vista essa necessidade, no presente trabalho propusemos realizar a predição de peptídeos imunodominantes das proteínas MIC8 e SRS52A. Esses peptídeos foram posteriormente associados aos adjuvantes imunológicos experimentais ScLL, propranolol e ao hidróxido de alumínio. Dessa forma, buscamos iniciar a caracterização dessas associações como possíveis formulações vacinais contra a toxoplasmose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade protetora das combinações de três peptídeos sintetizados a partir da predição de epitopos de células B para proteínas imunodominantes de *Toxoplasma gondii* e diferentes adjuvantes em dois modelos murinos de infecção oral.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar a predição dos peptídeos para serem utilizados em protocolos vacinais;
- Triar, por meio de amostras de soros de animais imunizados, os peptídeos sintetizados para verificar se as características imunodominantes da proteína original foram mantidas;
- Imunizar animais de experimentação e verificar, por meio de amostras de soro, a capacidade da formulação induzir a produção de imunoglobulinas G;
- Analisar se os animais imunizados apresentaram alterações nos níveis de citocinas produzidas, a partir da cultura *ex vivo* de células dos baços desses animais e verificando-se se houve alterações frente a diferentes estímulos;
- Comparar a carga parasitária cerebral após 30 dias de infecção nos animais imunizados e experimentalmente infectados;
- Realizar o desafio experimental para se avaliar se houve alterações nos índices de sobrevivência dos animais imunizados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

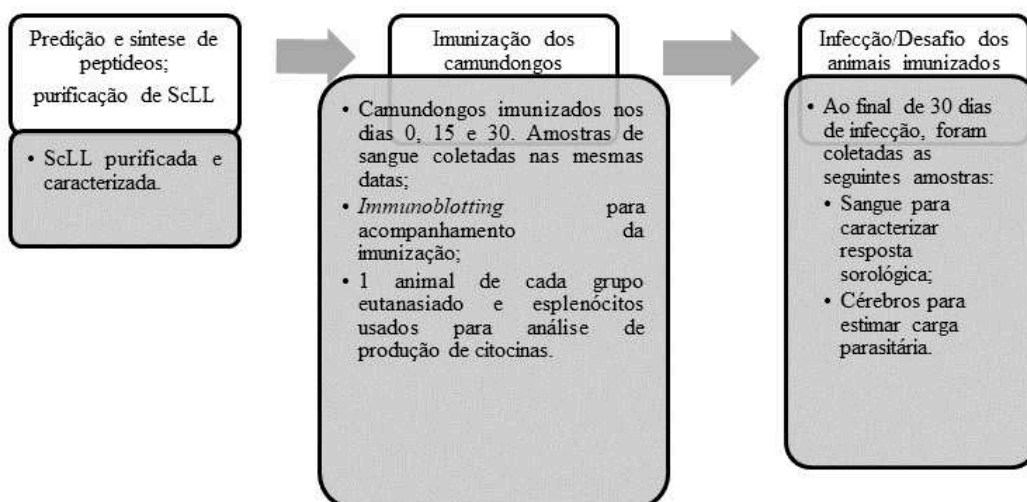
4.1. Ética na experimentação animal

A utilização de animais no presente trabalho, assim como todos experimentos neles realizados, foram aprovados previamente ao início dos experimentos pelo comitê de ética de utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sendo aprovado com o número de protocolo de aprovação 109/16.

4.2. Delineamento experimental

Este trabalho foi dividido em 3 etapas, a saber: 1ª.) a etapa de preparação dos insumos principais, na qual foi realizada a predição e síntese dos peptídeos, além da obtenção dos adjuvantes; 2ª.) a etapa da realização do protocolo de imunização, na qual os animais foram imunizados e amostras de soros foram coletadas em intervalos regulares, sendo utilizadas para se monitorar o progresso da imunização por meio de *immunoblotting*, e também 1 animal de cada grupo foi eutanasiado após as imunizações para obtenção de esplenócitos, posteriormente utilizados para verificar a produção de citocinas frente a estímulo; e 3ª.) etapa em que foi realizada a infecção/desafio dos animais imunizados, e também conduzida a coleta e análise das amostras que possibilitaram a obtenção dos resultados sobre a mensuração dos níveis IgG, bem como a determinação dos índices de sobrevivência de animais desafiados e a quantificação do número de cistos cerebrais após 30 dias do desafio (**Figura 1**).

Figura 1: Representação esquemática das etapas deste trabalho.



4.3. Seleção e Síntese de Peptídeos

Para analisar a presença de epitopos de célula B em antígenos imunodominantes de *T. gondii*, sequências completas das proteínas MIC8 (secretadas pelas organelas micronemas presentes nas formas infecciosas desse parasita) e SRS52A, presente na superfície do parasita durante sua fase extracelular, foram obtidas do banco de dados ToxoDB (<http://www.toxodb.org/toxo>). Os dados coletados foram analisados utilizando recursos de predição de epítomos de células B, disponíveis *on line* no banco de dados e recursos de análise de epitopos imunológicos (epitope database and analysis resource – IEDB) (<http://www.iedb.org>). A predição dos epitopos lineares foi feita baseada nos dados obtidos, por meio do método de predição de epitopos lineares Bepipred, usando o score mínimo de 1,5 (LARSEN; LUND; NIELSEN, 2006). Uma vez que o aplicativo utilizou o ranking dos segmentos da proteína, selecionamos duas sequências, de 15 resíduos de aminoácidos, que apresentaram os melhores *scores* de predição (**Tabela 1**). Esses peptídeos foram submetidos a análises de BLASTP (Basic local alignment search tool for proteins), uma ferramenta capaz de comparar se o trecho de interesse possui homologia com outros organismos. Neste trabalho também foi utilizado um terceiro peptídeo, predito a partir da MIC8 utilizando ferramentas experimentais desenvolvidas pelo grupo do professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 1. Características dos peptídeos sintetizados.

Proteínas	Identificação do peptídeo	Sequência do peptídeo
SRS52A	PepB3	APTGDPSQNSDGNRG
MIC8	PepB5	IPSAPAPPPSGGIWS
MIC8	Pep42	LAKLKEPPDPDDENS

Os peptídeos foram, então, quimicamente sintetizados pelo mesmo grupo da UFMG. Cromatografia líquida de alta performance (high-performance liquid chromatography – HPLC) e espectrometria de massa foram realizadas para avaliar a sequência e a pureza dos peptídeos produzidos, servindo como controle da produção dos peptídeos.

4.4. Produção de Antígeno Solúvel de *T. gondii* (STAg)

Com o objetivo de Células HeLa (ATCC, Manassas VA, EUA) foram cultivadas usando meio de cultura RPMI01640 (Thermo Scientific Inc., Waltham MA, EUA) suplementado com HEPES 25mM, 100 U/mL de penicilina, 2 mM de L-glutamine, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. Uma vez que a monocamada celular atingiu confluência de de 80%-90% da superfície da garrafa, foi adicionado taquizoítas da cepa RH à garrafa. Esses parasitas então penetraram nas células e, no processo de sua replicação, destruíam a monocamada celular. Ao ser possível visualizar destruição intensa, o conteúdo da garrafa era coletado em tubos de 15 mL, centrifugados a 400 xg por 8 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em meio RPMI, sem adição de soro fetal bovino, e uma fração era transferida para uma nova garrafa de cultivo celular, reiniciando-se o processo. O restante do material coletado foi estocado em a -20°C.

O processo acima descrito foi repetido até que uma quantidade adequada de parasitas foi coletada. A produção de STAg (*soluble antigen of Toxoplasma gondii*) a partir dos pellets de parasitas foi realizada como descrita em outros trabalhos (SCOTT et al., 1987; CUNHA-JÚNIOR et al., 2010; SANTANA et al., 2012). Ele é iniciado com a adição de uma solução inibidora de proteases (cOmplete; Roche, Suíça), concomitante a uma sequência de mudanças bruscas de temperatura, através da imersão do tubo contendo a solução rica em taquizoítas em nitrogênio líquido até seu completo congelamento, seguido por imersão em banho maria a 37°C até seu descongelamento. Esse ciclo é repetido 10 vezes. Após os ciclos de congelamento e descongelamento, a solução foi submetida a ciclos de sonicação. O líquido resultante foi centrifugado e o sobrenadante, rico em proteínas íntegras e outros elementos do parasita, é STAg. Essa solução foi posteriormente utilizada como antígeno de sensibilização para mensurar a concentração de imunoglobulinas no soro de animais utilizados nesse estudo.

4.5. Adjuvantes

Para o presente trabalho, escolhemos os seguintes adjuvantes imunológicos: hidróxido de alumínio (Alhydrogen®, InVivoGen, California, EUA), a lectina extraída do látex de *Synadenium carinatum* (ScLL) e o Propranolol (PRP, TEUTO, Goiás, Brasil).

4.5.1. ScLL

A lectina do *Synadenium carinatum* foi purificada a partir do látex total, como descrito por Cardoso e colaboradores (2012). O látex foi coletado do caule da *Synadenium carinatum* através de ranhuras cuidadosamente feitas no caule com o auxílio de um bisturi. O látex foi então

diluído em água destilada, na proporção de 1 mL de látex para 9 mL de água destilada, sendo a solução posteriormente submetida a agitação lenta por 48 horas, a 4°C. Após esse período de agitação, a mistura foi centrifugada (3500 x g, 30 minutos, 4 °C), o sobrenadante foi coletado e posteriormente filtrado usando membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro. O extrato aquoso (líquido resultante da filtração) foi submetido a cromatografia de afinidade à D-galactose imobilizada em agarose (Pierce, Illinois, EUA), utilizando o tampão salina-borato (BBS) 5mM, pH 8,0. A amostra foi submetida 6 vezes à coluna de afinidade, sendo que ao final desse processo o não ligado foi descartado, o material ligado à coluna foi eluído utilizando uma solução de D-galactose 0,4 mM (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e dializado contra água deionizada.

A purificação foi confirmada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE), também sob condições redutoras, como descrito anteriormente (LAEEMLI, 1970; BELA et al., 2008). Resumidamente, as amostras de ScLl foram diluídas e incubadas, a 100 °C por 5 minutos, com um tampão composto por Tris-HCl (0,1 M e pH 6,8), SDS 4%, azul de bromofenol 0,2% e glicerol 20%. A mistura tampão e amostra foi submetida a eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, EUA). Após o processo acima descrito, as bandas migraram para alturas distintas, permitindo visualizar as duas bandas da ScLL, em 30 e 28 KDa.

Além das análises acima descritas, o material purificado foi testado quanto à sua capacidade de promover hemaglutinação, pois esta é uma característica das lectinas. O protocolo utilizado foi descrito por Souza e colaboradores (2005), com algumas modificações. Resumidamente, sangue humano recém coletado foi utilizado para preparar um concentrado de hemácias de um doador de sangue tipo O negativo. Essa separação de hemácias do restante dos elementos sanguíneos foi realizado por meio de centrifugação a 500 xg por 10 minutos. As hemácias foram retiradas e transferidas para um novo tubo, no qual foi adicionado NaCl 0,15 M e a solução foi centrifugada, dessa vez a 1000 xg por 10 minutos. A ScLL purificada foi adicionada a placas de microtitulação de fundo em formato de “V”, em concentrações seriadas de denominador 2 (a concentração “B” é metade da concentração de “A”, por exemplo), sendo posteriormente adicionado uma suspensão de 2% de hemácias, diluída em solução de NaCl 0,15 M.

Uma vez que as amostras foram consideradas suficientemente puras e demonstraram ser capazes de promover a hemaglutinação, a concentração proteica foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976) e estocadas a -70 °C até o momento de uso.

4.5.2. Propranolol

O propranolol (PRP) foi obtido através de formulação comercialmente disponível. Cada comprimido possui a massa total de 220 mg, confirmado individualmente em cada um dos comprimidos usados, e a massa de propranolol era de 40 mg (informação extraída da bula). Para preparar uma solução homogênea e estéril que pudesse ser utilizada em animais de experimentação, foi retirado um comprimido, macerado e diluído em 1 mL de PBS. A solução foi homogeneizada até adquirir aspecto mais uniforme possível. Foi feita a filtração em membranas com poros de 0,22 µm de diâmetro, em ambiente estéril. Foram usadas 3 concentrações diferentes na imunização dos diferentes grupos de animais: 120 µg de PRP, por animal, para o primeiro grupo de camundongos imunizados com esse composto, sendo o grupo seguinte imunizado com 60 µg/animal e o seguinte com 30 µg/animal. A solução de PRP foi preparada logo antes de todas as imunizações.

4.6. Modelos experimentais

Para produzir os cistos da cepa ME49 de *Toxoplasma gondii* que foram posteriormente utilizados nesse trabalho, camundongos da linhagem BALB/c foram intraperitonealmente infectados com 10^3 taquizoítas, diluídos até o volume máximo de 200 µL de PBS, por animal. Após 30 a 45 dias, foram eutanasiados, seus cérebros coletados, liquefeitos em PBS (1 mL por cérebro) com auxílio de seringas e agulhas de diferentes calibres e o número de cistos foi contado por microscopia óptica. Os cistos foram posteriormente utilizados no desafio dos animais imunizados. Nessa etapa, foram utilizadas 20 fêmeas, separadas em grupos de 4 indivíduos, sendo que a infecção ocorreu no intervalo de 6 a 8 semanas de vida.

Com o intuito de verificar se as formulações vacinais propostas neste trabalho foram capazes de induzir qualquer nível de proteção, realizamos diferentes ensaios utilizando 2 modelos murinos diferentes, sendo o camundongo C57BL/6 mais susceptível à toxoplasmose, especialmente durante a fase em que o comprometimento intestinal é mais intenso (até o décimo dia de infecção) (LIESENFELD, 2002).

O outro modelo murino que utilizamos foi o camundongo BALB/c, que é um animal menos susceptível à toxoplasmose que o C57BL/6. Todos os experimentos aqui descritos foram realizados com ambas linhagens de camundongos, exceto que a linhagem BALBc não teve grupos imunizados com o adjuvante Propranolol.

Todos animais utilizados neste trabalho foram mantidos no Biotério Central da Universidade Federal de Uberlândia, com ciclos diurno e noturno de 12 horas, cada, em microisoladores, sendo fornecido alimentação e água *ad libitum*.

4.7. Imunização

Os camundongos foram divididos em 10 grupos, cada um com 10 animais, e foram imunizados, por via intradérmica, com diferentes combinações vacinais (**Tabela 2**). A imunização foi realizada em três momentos distintos, com intervalos de 15 dias entre elas. Amostras de sangue foram coletadas nas mesmas datas. A partir das amostras de soro, foram realizados ensaios de *Western blotting* para verificar se a imunização foi capaz de estimular os animais a produzir anticorpos com afinidade à proteína da qual os peptídeos foram preditos.

Tabela 2. Grupos de imunização e a composição da imunização.

Identificação do grupo	Antígeno	Adjuvante
PBS	-	-
ScLL	-	ScLL
Al(OH) ₃	-	Al(OH) ₃
PRP	-	PRP
Pep+ScLL	Peptídeos	ScLL
Pep+Al(OH) ₃	Peptídeos	Al(OH) ₃
Pep+PRP	Peptídeos	PRP
STAg+ScLL	STAg	ScLL
STAg+Al(OH) ₃	STAg	Al(OH) ₃
STAg+PRP	STAg	PRP

No trigésimo dia após a primeira imunização, foi realizada a terceira e última imunização. No 45º dia, cada grupo foi dividido em dois e infectados com concentrações diferentes de cistos, sendo o primeiro subgrupo, com 4 animais, infectado com 10 cistos (chamado grupo de acompanhamento de infecção crônica), enquanto o segundo, com 5 camundongos, infectado com 20 cistos (chamado de grupo desafio). Ambas infecções ocorreram via gavagem. Todos animais foram acompanhados por 30 dias, sendo observados diariamente quanto a sintomas que demonstrassem sofrimento excessivo e, uma vez que qualquer animal ultrapassasse o limite do aceitável (PASTOR-FERNÁNDEZ et al., 2015; SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2019), foram eutanasiados.

O animal restante de cada grupo não foi infectado. Eles foram eutanasiados no 48º dia de imunização, foram coletados o sangue e o baço desses animais.

Ao final do 75º dia de experimento (30º dia de infecção), todos animais sobreviventes foram eutanasiados e deles foram extraídos cérebro e o sangue.

4.8. Análises sorológicas

Para verificar se houve ou não produção de anticorpos específicos contra o peptídeo usado durante a imunização e se a infecção ocorreu de maneira correta nos animais imunizados, foram realizadas coletas de amostras de sangue dos animais imunizados. De posse desse material, empregamos duas técnicas: *immunoblotting*, como descrito por Béla e colaboradores (2008), e reação imunoenzimática (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - ELISA) indireta (COSTA et al., 2016).

O *immunoblotting* foi iniciado com a eletroforese de amostras de STAg em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O conteúdo do gel foi então transferido para uma membrana de nitrocelulose (Transblot Semi-Dry Transfers Cell, Bio-Rad, California, EUA). A membrana foi então recortada em tiras finas e estocadas em ambiente seco, a 4°C até o momento de uso. Para iniciar o *immunoblotting*, a fita teve seus sítios de ligação inespecíficos bloqueados através de uma solução composta por 1% de leite em pó em PBS (PBSTM), acrescida por 0,05% de detergente tween por 2 horas à temperatura ambiente. As fitas foram então lavadas com PBS acrescido de tween, na concentração de 0,05% (PBST). Após a lavagem, amostras de soro foram diluídas, na proporção 1:100, em PBSTM e acrescidas à fita, no volume de 500 µL/fita. As fitas ficaram em contato com esse líquido, sob agitação leve, por toda a noite, a 4 °C. Após essa etapa, a fita foi lavada novamente e foi adicionada uma solução com anticorpos conjugados à enzima peroxidase e que possuem especificidade contra o anticorpo murino. Esses anticorpos foram diluídos em PBST. A solução de anticorpos conjugados ficou em contato com as fitas por 2 horas, à temperatura ambiente, também sob agitação constante, na proporção de 1:2000. A seguir, foi feita nova lavagem das fitas, como descrito anteriormente, seguida pela adição de um composto capaz de reagir com os complexos antígenos-anticorpos e que gera um sinal de quimioluminescência (Promega, Wiscosin, EUA) no local onde houve essa interação, de forma que foi possível visualizar as bandas onde ocorreu tal interação. A visualização e também o registro dos resultados foi feito através do fotodocumentador Chemidoc MP Imaging System (Bio-Rad).

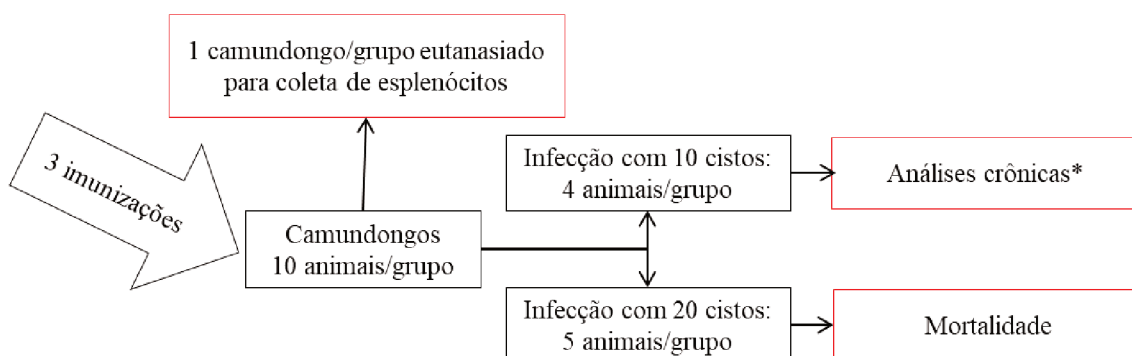
O ELISA indireto foi iniciado com a adição de uma solução de STAg, a 10 µg/mL, diluída em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6). Foram adicionados 100 µL dessa solução em cada poço da placa de 96 poços e a placa foi incubada a 4°C por 16 horas. Após esse período, os poços foram lavados com PBST, 200 µL/poço, e a seguir foi adicionada a amostra, diluída em PBSTM, na proporção de 1:50, 50 µL/poço, e incubado por 1 hora, a 37°C. Após a incubação com as amostras, foi realizada nova lavagem com PBST e adicionado anticorpos conjugados com peroxidase, específicos à cadeia pesada de IgG, sendo então capaz de reagir com todas as subclasses de IgG. Novamente, a placa foi incubada por 1 hora a 37°C e lavada com PBST ao final desse período. A visualização do resultado foi feita por meio do kit comercial de revelação ABTS (2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid); Roche) e a leitura foi realizada na faixa de 405 nm (M2e, Molecular Devices). O resultado foi expresso em forma de índice ELISA (IE), cuja fórmula é a seguinte: $IE = \frac{A}{(3 \cdot C) + B}$, onde A é o valor da leitura, B é o valor da média da leitura dos controles negativos e C é o valor de desvio padrão.

O valor de 1,2 I.E. é o *cut-off* que definiu as amostras negativas, inferiores a esse valor, e as positivas serão aquelas acima de 1,2.

4.9. Infecção e Desafio

As infecções, tanto letal quanto subletal, foram realizadas utilizando os cistos da cepa ME49 produzidos em BALB/c. Antes de realizarmos os ensaios, a quantidade de cistos foi definida a partir de um estudo de triagem para definirmos quais eram as doses de parasitas letal e não letal. Para ambas linhagens, foram duas infecções diferentes: 10 e 20 cistos. Para os C57BL/6, essas foram as doses de infecção para a infecção crônica e desafio letal, respectivamente. Já para os BALB/c, ambas infecções foram usadas para estimar a quantidade de cistos após 30 dias de infecção (**Figura 2**).

Figura 2: Representação da utilização de animais neste trabalho. *: A representação aqui feita é de animais C57BL/6, sendo que para a linhagem BALB/c houve uma diferença importante: ambas infecções foram realizadas para fazer a análise de aspectos crônicos. Na linhagem BALB/c não houve infecção letal.



4.9.1. Infecção crônica

Os grupos de infecção crônica foram infectados, via oral, e acompanhados por 30 dias. No 30º dia, os animais foram eutanasiados e os seus cérebros e sangue coletados. Os cérebros foram utilizados para contabilizar a carga parasitária no final dos 30 dias de infecção, que corresponde à infecção crônica no animal, e o soro retirado do sangue foi utilizado nos ensaios de *immunoblotting* e ELISA indireto. Importante ressaltar que esse experimento foi repetido com os animais BALB/c (ambos grupos imunizados foram utilizados para infecção crônica).

4.9.2. Grupo desafio

Experimento realizado somente com animais da linhagem C57BL/6, devido à sua maior susceptibilidade à toxoplasmose aguda. Os grupos de desafio foram infectados também por via oral. Desses animais não foram coletadas nenhuma amostra durante a infecção, visto que isso poderia afetar o estado de saúde do animal, debilitando e deixando-o mais susceptível à toxoplasmose experimentalmente induzida. Esses animais foram acompanhados por 30 dias e as datas de óbito foram anotadas e usadas para montar uma curva de sobrevivência.

4.10 Citocinas

Um animal de cada grupo de imunização não foi infectado e, 48 dias após o início das imunizações, eles foram eutanasiados e seus baços coletados em condições assépticas. Ainda em condições assépticas, o órgão foi fragmentado com o auxílio de um filtro com póros de 70 µm de diâmetro (*Cell strainer*, Falcon, New York, EUA). Dessa forma, a cápsula fibrosa do

órgão foi retida, permitindo já um início de separação das células desse órgão e à solução rica em células foi adicionado um tampão de lise de eritrócitos. Esse tampão ficou em contato com a solução por 5 minutos, numa temperatura de 37°C, e ao final desse tempo as hemácias haviam sido rompidas. Foi adicionado 10 mL de meio RPMI e a solução foi centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 5 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. O pellet, rico em esplenócitos, foi então plaqueado na concentração de 2×10^6 células/mL, sendo adicionado 100 µL/poço. As células foram colocadas numa estufa com 5% de tensão de CO₂, a 37°C e com umidade estável por 24 horas. Ao final desse período de adaptação das células, elas foram estimuladas com STAg (50 µg/mL) ou 5 µg/mL de Concanavalina A. Outros poços não foram estimulados, recebendo o mesmo volume (100 µL) de RPMI. Novamente, as células repousaram por 24 horas na estufa de cultivo celular. Ao final desse período, 100 µL do sobrenadante foi coletado. Por fim, 48 horas após o estímulo foi coletado o restante do sobrenadante dos poços. As amostras coletadas foram cuidadosamente identificadas e estocadas a -70°C, sendo descongeladas somente no momento de mensurar as citocinas ali presentes.

O sobrenadante coletado pelo método acima descrito foi utilizado para mensurar o Interferon γ (IFN- γ) e a Interleucina 10 (IL-10). As quantificações dessas citocinas foram realizadas por meio de um kit comercial de ELISA (BD, New Jersey, EUA), conforme instruído pelo manual do produto.

4.11 Contagem de cistos

Os animais dos grupos de infecção crônica foram eutanasiados 30 dias após a infecção e seus cérebros removidos. O método de quantificação de cistos cerebrais utilizado é o mesmo descrito por (ZHOU¹ et al., 2016). O processo foi iniciado com passagem de tecido cerebral e PBS através de uma seringa acoplada a agulhas de diferentes calibres, auxiliado pela adição de 1 mL de PBS. Dessa forma, o tecido foi se tornando mais fragmentado e mais solúvel no PBS. Após a solução ficar homogênea, foi aliquoteado 25 µL em uma lâmina comum de microscopia. Essa amostra foi integralmente observada e os cistos contabilizados. O processo foi realizado com 3 amostras diferentes de cada macerado de cérebro e contado por 3 pessoas diferentes. Os valores obtidos de cada cérebro foram usados para formar uma média da quantidade de cistos em 25 µL de solução de macerado. Essa média foi multiplicada por 40 para chegar à concentração de cistos/mL.

4.12 Análise estatística

Os dados gerados nesse trabalho foram analisados utilizando o software Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os resultados tiveram um comportamento não paramétrico, então o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste utilizado foi o Dunns. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

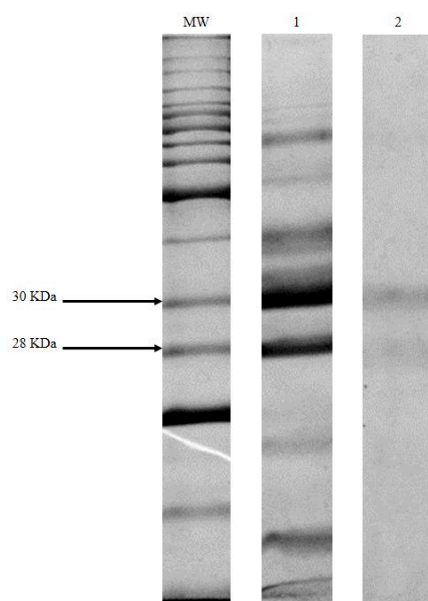
5.1. Delineamento e síntese dos peptídeos

Foram selecionados três peptídeos diferentes, sendo dois deles originados da proteína MIC8 e o último originado de SRS52A (**Tabela 1**). A sequência correta de aminoácidos e a pureza dos peptídeos foram verificadas por meio de espectrometria de massa e HPLC.

5.2. Obtenção de ScLL

A ScLL foi extraída a partir do látex da *Synadenium carinatum*, por um processo que utilizou a afinidade dessa lectina à D-galactose para separá-la das demais frações presentes naquela amostra. O processo de purificação, como demonstrado no SDS-PAGE, resultou em amostras ricas em ScLL (**Figura 3**). Várias amostras de látex foram coletadas e purificadas ao longo de 6 meses, sendo que todas elas foram purificadas, caracterizadas quanto à capacidade de promoverem hemaglutinação.

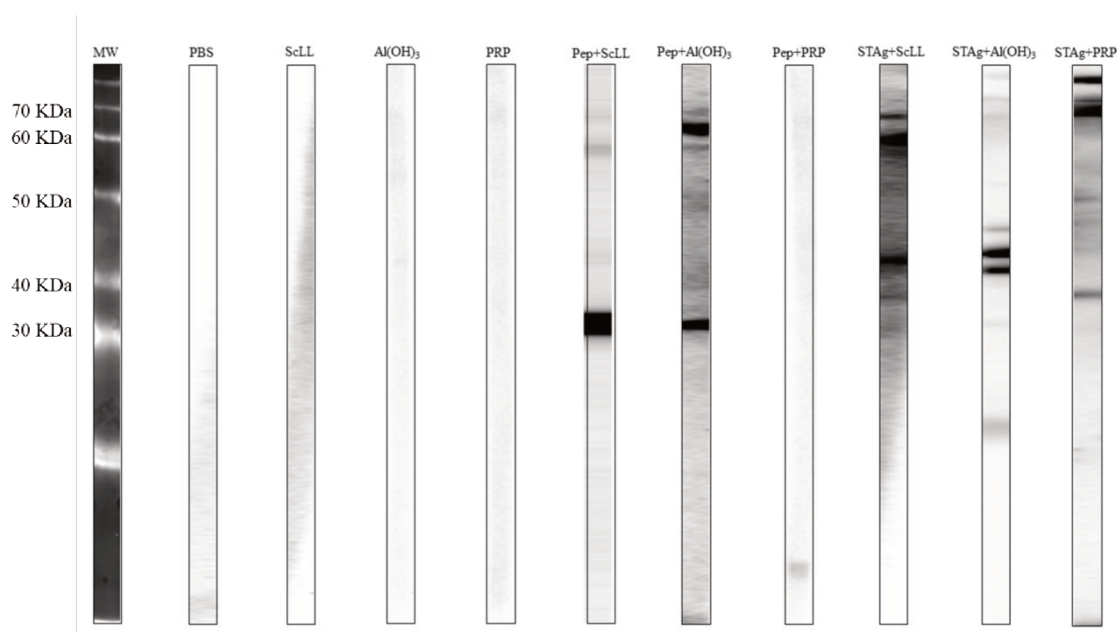
Figura 3 – Lectina do látex de *Synadenium carinatum* purificada. Foi realizada a purificação de ScLL e, como forma de comprovar a pureza do produto final, amostras do extrato bruto (fita 1) e da ScLL purificada (fita 2) foram analisadas em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio a 12%. Nessas condições a ScLL apresenta bandas em 30 e 28 KDa. A primeira fita é o padrão de peso molecular.



5.3. Acompanhamento da imunização

Os animais imunizados foram monitorados e dados como peso e comportamento foram observados, além da produção de anticorpos específicos contra o antígeno vacinal, que foi verificada a partir de amostras de sangue coletados quinzenalmente. Essas amostras foram utilizadas em ensaios de *immunoblotting*, utilizando membranas sensibilizadas com STAg da cepa RH. Os resultados demonstram que a maior parte dos animais, especialmente dos grupos pep+ScLL e pep+Al(OH)₃, geraram anticorpos capazes de reconhecer as proteínas MIC8 (34 KDa) e SRS52A (74 KDa) também é importante ressaltar que os grupos imunizados com formulações nas quais o PRP esteve presente, não houve produção detectável de anticorpos contra os antígenos vacinais, como demonstrado na **Figura 4**. Esses resultados foram observados para ambas linhagens de camundongos.

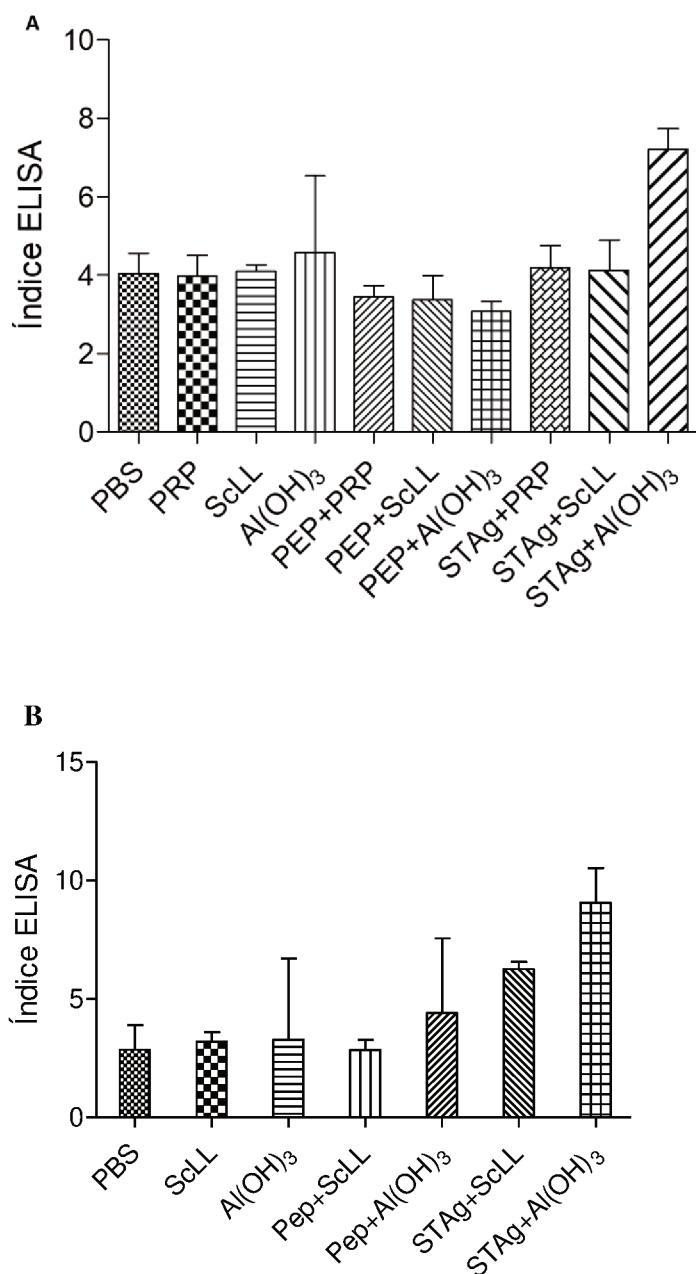
Figura 4 – Acompanhamento da imunização.



Amostras de soro foram coletadas dos animais 15 dias após a última imunização. Essas amostras foram utilizadas em ensaios de *immunoblotting*, com membranas sensibilizadas com STAg.

Ao final dos 75 dias do experimento (45 dias de imunização somados a 30 dias de infecção), sangue dos animais foi coletado e o soro foi utilizado em novos experimentos sorológicos. ELISA indireto foi realizado para verificar o título de IgG total (**Figura 5**). Em ambas linhagens, houve a produção de IgG contra antígenos do STAg, indicando que a infecção ocorreu como esperado.

Figura 5 – Análises sorológicas de animais imunizados e infectados. Após a infecção, os animais sobreviventes foram eutanasiados e novas amostras de soro foram coletadas. Elas foram usadas na verificação da produção de imunoglobulinas G totais em animais da linhagem C57BL/6 (**A**) e BALB/c (**B**), através de um ensaio imunoenzimático indireto, usando STAg como antígeno de revestimento dos poços.



5.4. Produção de citocinas

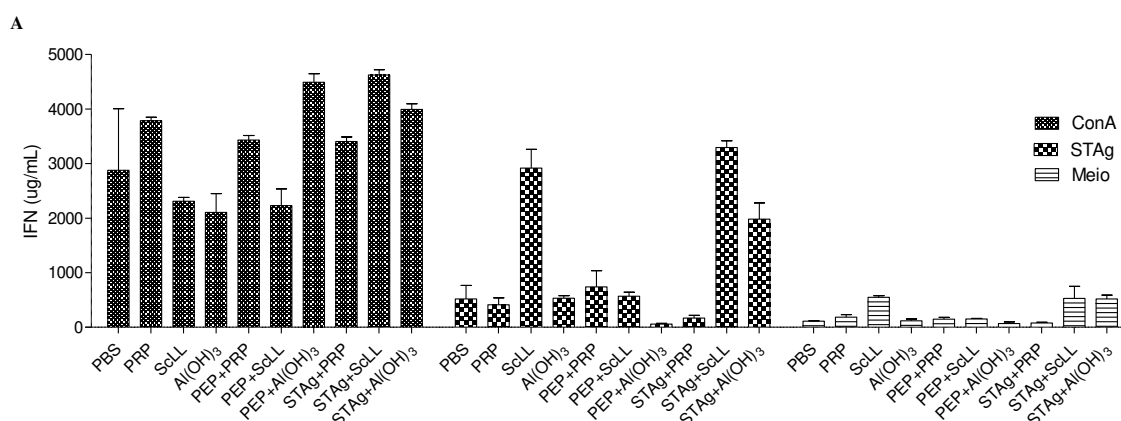
A produção de citocinas em resposta ao estímulo foi realizada utilizando-se os esplenócitos provenientes de animais imunizados ou aqueles do controle que havia recebido somente PBS. Estas células esplênicas foram homogeneizadas e adicionadas em placas de cultura, sendo

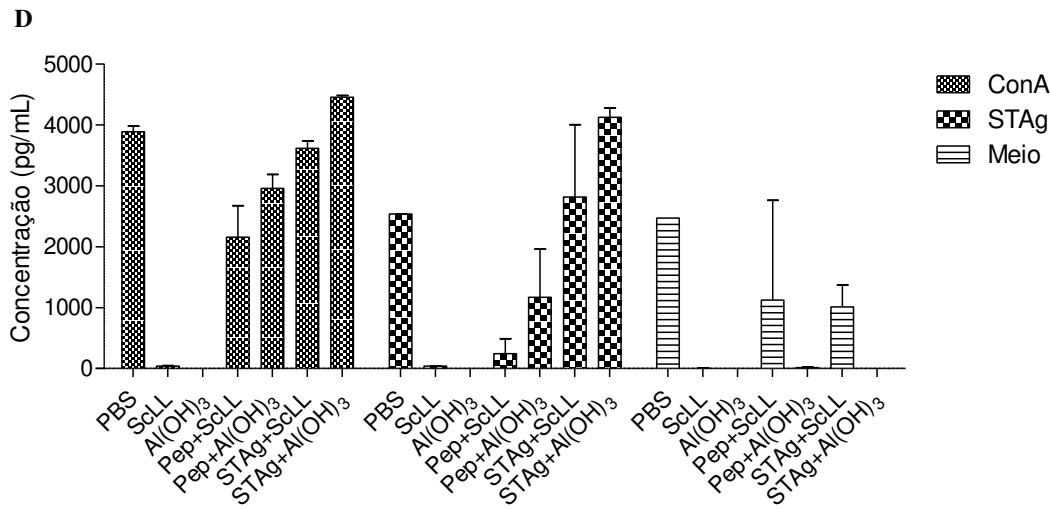
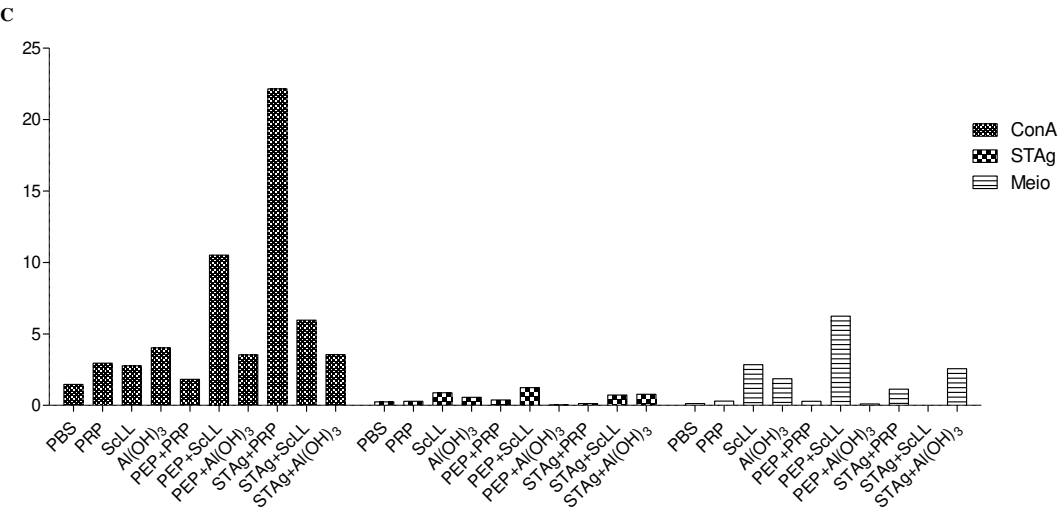
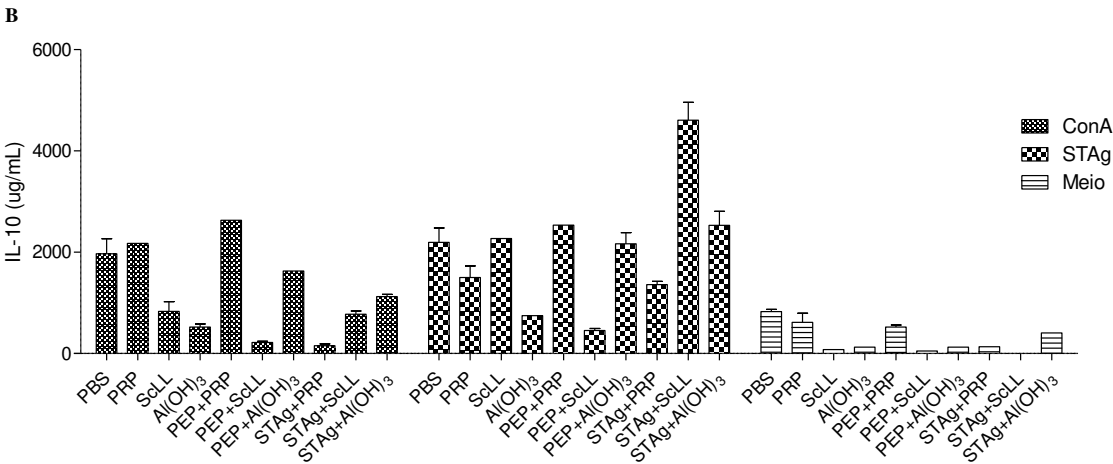
tratadas com os seguintes estímulos: a.) Concanavalina A, como controle positivo não específico, por ser um potente mitógeno; b.) STAg, como controle positivo *T. gondii* específico; c.) RPMI, como controle negativo.

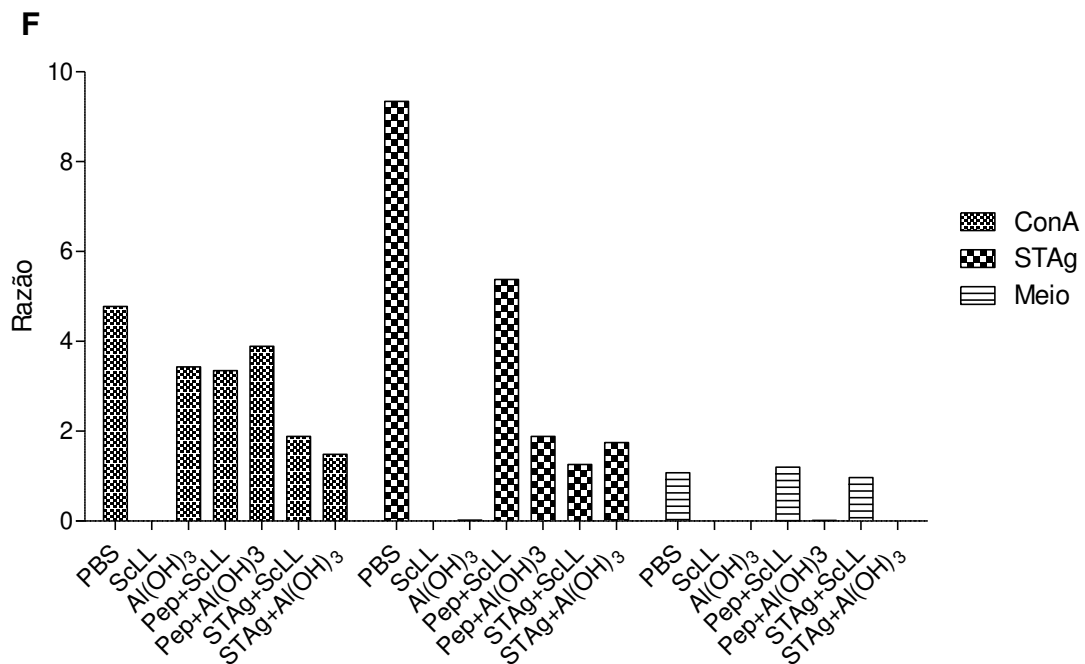
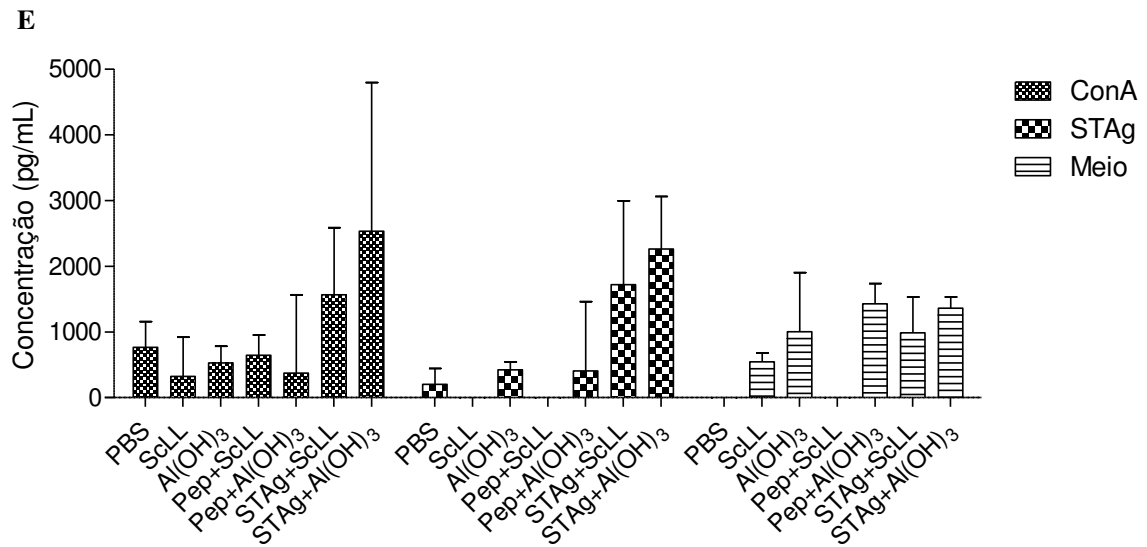
Os resultados observados, a partir de esplenócitos da linhagem C57BL/6 (**Figuras 6A-C**), indicam que o estímulo com ConA resultou em elevada produção de citocinas em todos os grupos, especialmente quando observado a citocina IFN- γ . Ainda observando o estímulo do ConA, vemos que a IL-10 teve um comportamento diverso, com vários grupos de células provenientes de animais imunizados produzindo menos desta citocina que os animais não imunizados. Interessante notar que, ainda que tenha registrado baixas concentrações de ambas citocinas, o grupo PEP+ScLL apresentou as maiores razões IFN- γ /IL-10 em dois estímulos, sendo também o segundo grupo com maior razão no estímulo com ConA.

Já na linhagem BALB/c (**Figura 6D-F**), foi observado também aumento na razão IFN- γ /IL-10, no grupo Pep+ScLL, quando comparado ao grupo PBS, no estímulo de STAg.

Figura 6 – Análise da produção de citocinas por esplenócitos de animais imunizados. No 48º dia após a primeira imunização, 1 animal de cada grupo foi eutanasiado, seus baços coletados e as células individualizadas e colocadas em cultura. As células provenientes de cada um dos animais foram separadamente estimuladas com diferentes compostos: Concanavalina A, antígeno solúvel de *Toxoplasma gondii* e não imunizado (meio). Após 24 horas de estímulo, foram mensuradas a citocina IFN- γ (gráfico “A” para C57BL/6; “D” para BALB/c). Após 48 horas, a IL-10 (gráfico “B” para C57BL/6; “E” para para BALB/c). Foi feita ainda a razão IFN- γ /IL-10 (gráfico “C” para C57BL/6 e “F” para BALB/c).





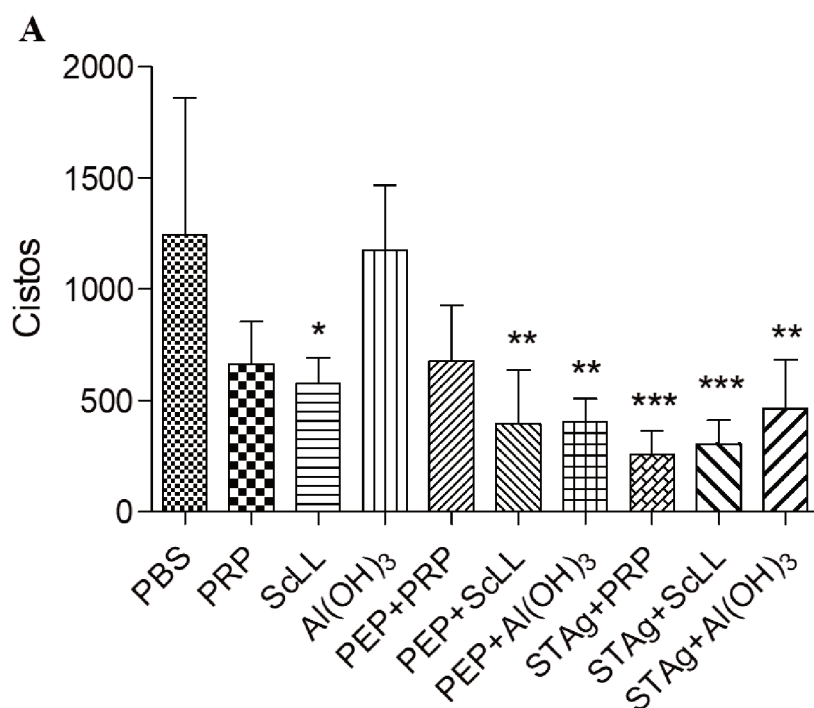


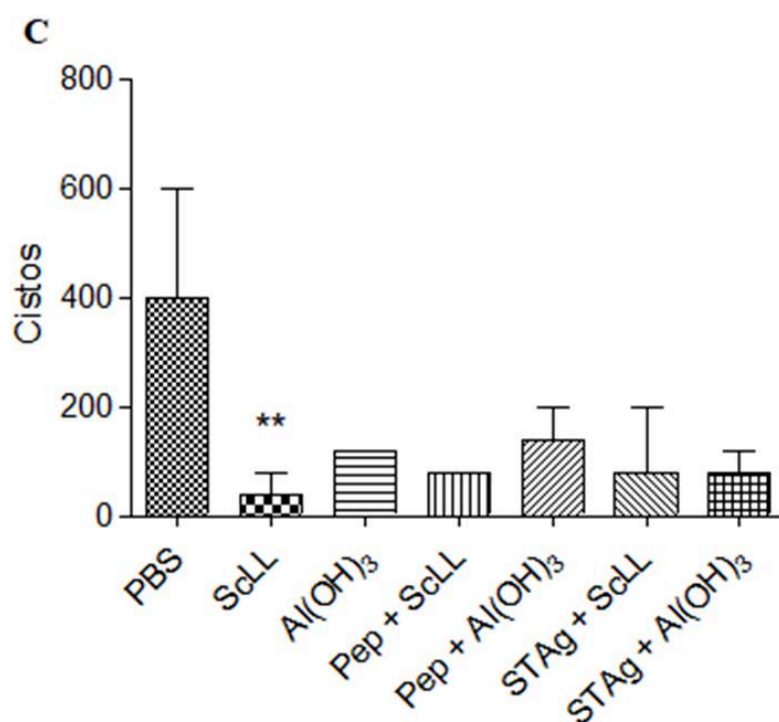
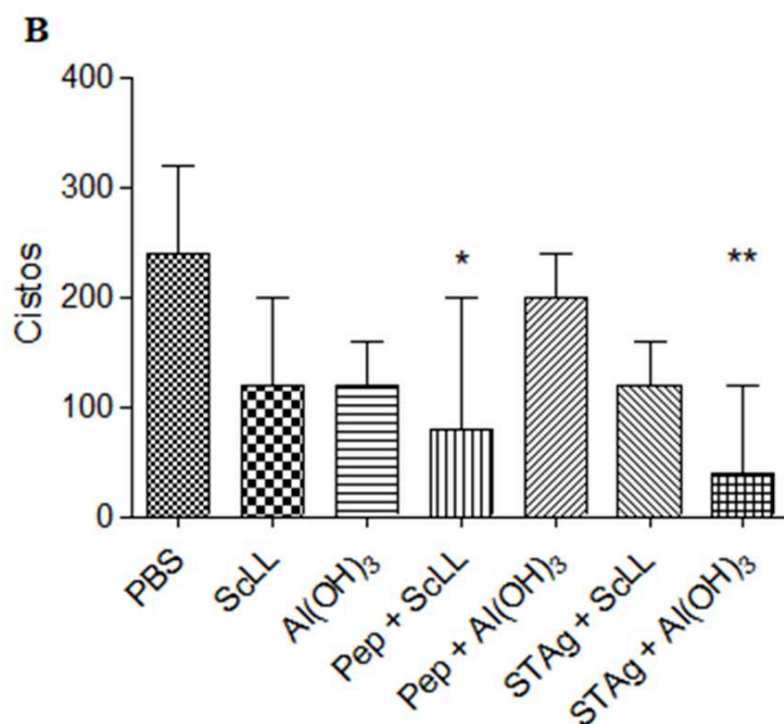
5.5. Contagem de cistos

A contagem de cistos foi realizada a partir de amostras de tecido cerebral coletadas de camundongos imunizados e infectados, 30 dias após a infecção. O método de contagem

escolhido foi a contagem a fresco, realizada em microscopia óptica. Os resultados obtidos na linhagem C57BL/6, representados na **Figura 7A**, indicam que, comparados ao grupo não imunizado, os grupos ScLL, Pep+ScLL, Pep+Al(OH)₃, STAg+PRP, STAg+ScLL e STAg+Al(OH)₃ tiveram redução significativa do número de cistos. Essa diferença tem maior nível de significância nos grupos STAg+PRP e STAg+ScLL, seguido pelos grupos Pep+ScLL, Pep+Al(OH)₃. Os únicos grupos que não reduziram significativamente a quantidade de cistos no período crônico da toxoplasmose foram os grupos imunizados somente com Al(OH)₃ e Pep+PRP.

Figura 7 – Carga parasitária no cérebro de animais imunizados e infectados. Os animais imunizados e infectados foram acompanhados por um período de 30 dias. Os sobreviventes foram eutanasiados, seus cérebros removidos e preparados para contagem dos cistos por microscopia óptica. O gráfico “A” se refere aos C57BL/6, enquanto os gráficos “B” e “C” aos BALB/c infectados com 10 e 20 cistos, respectivamente.





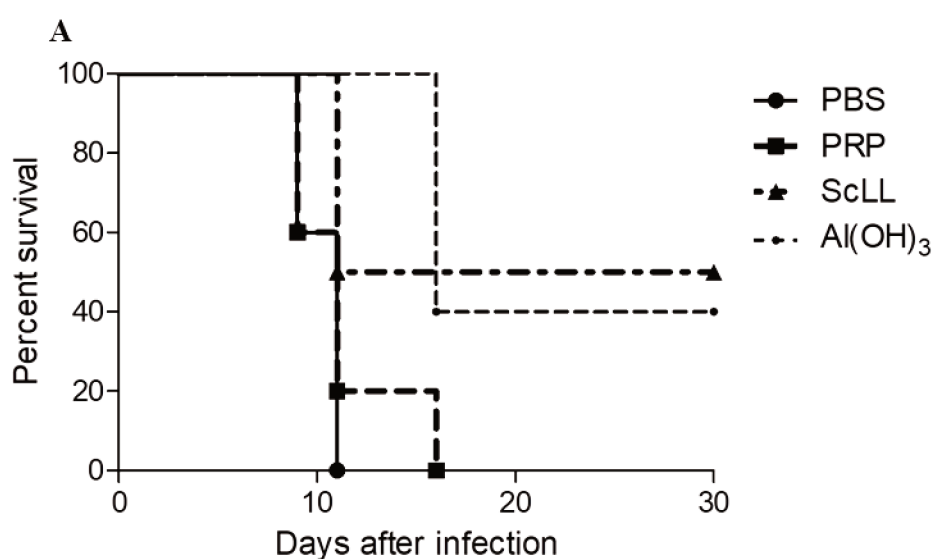
Os camundongos BALB/c foram inoculados com duas quantidades distintas de parasitas, ambas subletais: 10 e 20 cistos. Nos animais infectados com 10 cistos, o que pôde ser observado foi a diminuição significativa do número de cistos nos grupos Pep+ScLL e STAg+Al(OH)₃. (**Figura 7B**). Já com relação à infecção com 20 cistos (**Figura 7C**), foi registrada uma redução significativa do número de cistos nos animais imunizados com ScLL,

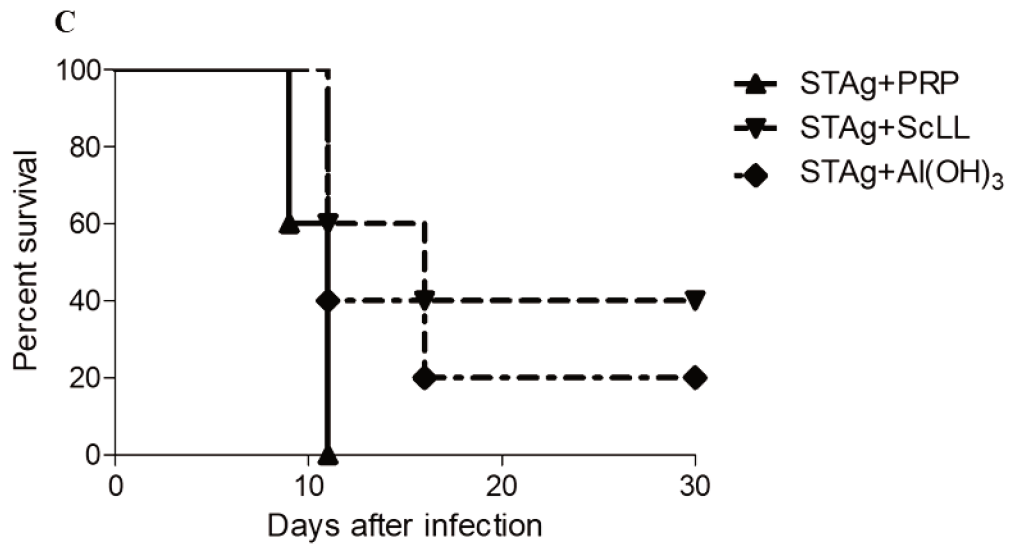
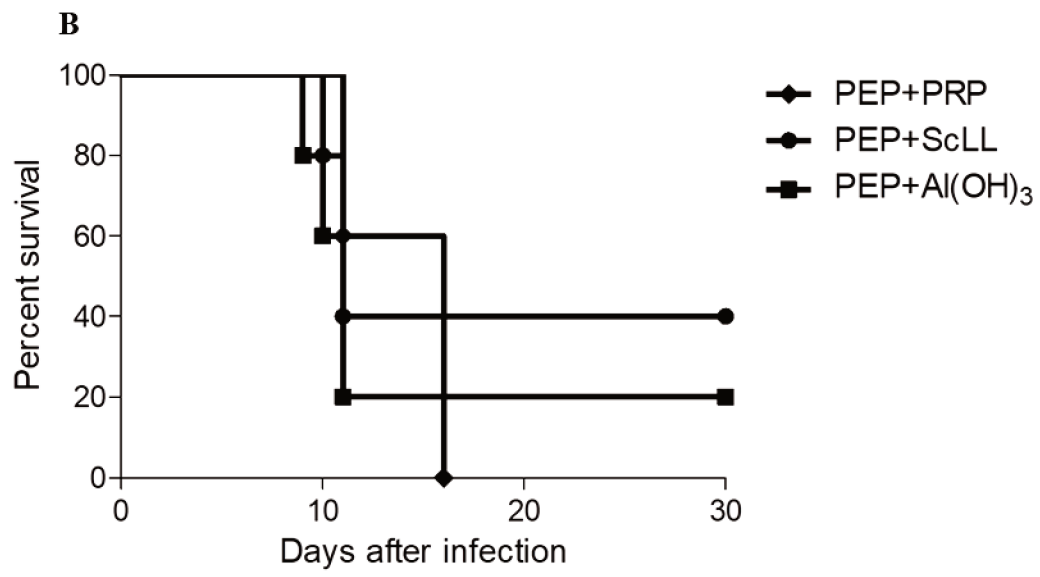
ainda que diversos outros grupos tivessem redução aparente, como o grupo de animais imunizados com peptídeos e ScLL, que registrou redução de 75% do número de cistos.

5.6. Sobrevivência

O teste de sobrevivência foi realizado ao infectarmos os animais imunizados, do grupo desafio, com 20 cistos/animal. Ao longo de 30 dias, as datas de óbitos (ou scores de morbidade) foram registradas e posteriormente representadas (**Figura 8**). O ensaio em animais C57BL/6 não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. Houveram, no entanto, diferenças aparentes na sobrevivência de determinados grupos. Os grupos que receberam antígeno (seja STAg ou peptídeos) acrescido de adjuvante, ou somente adjuvante, tiveram um aumento não significativo de sua sobrevivência, com um número variado de animais sobrevivendo até o 30º dia de infecção. Três exceções importantes foram observadas quando utilizado o PRP como adjuvante. Os grupos que foram imunizados com esse composto não apresentaram animais sobreviventes, mesmo sendo imunizados juntamente com STAg ou peptídeos.

Figura 8 – Curva de sobrevivência de C57BL/6 imunizados e desafiados. Após todo o protocolo de imunização, 5 animais de cada grupo de C57BL/6 foram desafiados com 20 cistos, via oral. Para facilitar a visualização dos resultados, a figura foi dividida em 3, sendo que “A” apresenta os resultados dos grupos PBS e dos animais imunizados somente com adjuvantes; “B” apresenta os resultados dos animais que foram imunizados com peptídeos, associados aos diferentes adjuvantes; “C” apresenta o que foi observado nos animais imunizados com STAg associado aos diferentes adjuvantes.





6. DISCUSSÃO

O protozoário *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar uma ampla variedade de espécies de animais homeotérmicos, incluindo humanos (ZHU et al., 2019). A doença causada pela infecção por esse protozoário intracelular é chamada de toxoplasmose. Essa moléstia foi suficientemente caracterizada a ponto de esclarecer aspectos de sua transmissão, sintomas da fase aguda e alguns da fase crônica (LIMA; LODOEN, 2019). O tratamento atualmente é facilmente realizado em indivíduos imunocompetentes, porém é extremamente pernicioso para os indivíduos dos grupos de risco (DUNAY et al., 2018). Uma alternativa interessante para sanear, ou ao menos amenizar esse problema, seria o desenvolvimento de uma vacina, capaz de evitar ou minimizar a toxoplasmose nesses indivíduos dos grupos de risco. Existe ainda a possibilidade de aplicação desse conhecimento para gerar vacinas que possam abranger outras espécies, como bovinos, galináceos e demais animais usados para o consumo humano.

Uma das ferramentas recentemente desenvolvidas, e que já mostrou ser capaz de gerar resultados interessantes, são as ferramentas de bioinformática usadas na predição de epitopos imunodominantes (GOODSWEN; KENNEDY; ELLIS, 2014; WANG et al., 2014). Estas ferramentas podem ser utilizadas com diversos enfoques, como a predição de estruturas, funções de proteínas e epitopos imunodominantes (ROMANO; GIUGNO; PULVIRENTI, 2011). Os dados obtidos a partir dessas análises tem propiciado o esclarecimento de funções biológicas e a identificação de novos antígenos com potenciais diversos, inclusive vacinais (LU et al., 2015; ZHANG et al., 2014). Neste trabalho, o objetivo foi pesquisar uma alternativa imunoprolática que possa auxiliar a diminuir o número de casos de toxoplasmose, ou amenizar a doença. Para atingir esse objetivo, utilizamos um sistema de escolha e delineamento de antígenos vacinais baseado em análises de bioinformática. Foram selecionados 3 pequenos peptídeos, com 15 resíduos de aminoácidos, 2 deles derivados da proteína MIC8 e 1 derivado da proteína SRS52A. Há trabalhos recentes que vêm demonstrando a validade das ferramentas de bioinformática e a necessidade de se escolher um alvo adequado, especialmente quando se trata de trabalhos de imunizações (ZHANG et al., 2014; ZHOU² et al., 2016; SHADDEL; EBRAHIMI; TABANDEH, 2018). Os trabalhos publicados até hoje demonstraram que utilizar proteínas imunodominantes (ou porções derivadas delas) do *T. gondii* para imunização resulta em diferentes níveis de proteção. Fang e colaboradores (2012) verificaram que antígenos produzidos a partir de utilizando proteínas recombinantes de SAG1 e MIC3. Zheng e colaboradores (2013) investigaram a capacidade de proteínas recombinantes, obtidas a partir da sequência da roptria 5 e SAG1, atuarem como antígenos vacinais, ficando evidente que a

abordagem por eles utilizada aumentou significativamente a sobrevivência dos camundongos desafiados.

Os peptídeos foram triados quanto à capacidade de serem reconhecidos por anticorpos IgG produzidos por animais imunizados. Essa verificação foi realizada utilizando a metodologia de *immunoblotting*, e os resultados demonstraram que houve o reconhecimento específico por parte dos anticorpos desses animais, gerados em resposta à infecção. A triagem foi essencial para confirmar o que havia sido predito *in silico*: a especificidade e a imunodominância dos peptídeos selecionados neste trabalho.

Concomitante à síntese e triagem dos peptídeos, foi feito o preparo dos adjuvantes imunológicos. No presente trabalho, foram utilizados 3 substâncias diferentes como adjuvantes imunológicos: o hidróxido de alumínio, um adjuvante extensivamente usado em formulações vacinais aplicadas em humanos (HE; ZOU; HU, 2015); a ScLL, cuja capacidade de atrair diferentes elementos da resposta imunológica já haviam sido previamente descritas (CARDOSO et al., 2012; SOUZA et al., 2016) e, por fim, o propranolol, cuja capacidade de agir como adjuvante imunológico também foi recentemente demonstrada por Minaei e colaboradores (2018). Foi feito também a imunização de grupos de animais com STAg, associados com diferentes adjuvantes, com o intuito de usar os dados obtidos a partir desses animais como um controle de maior proteção, uma vez que outros trabalhos demonstraram que esse conjunto de moléculas do parasita, rico em antígenos, foi capaz de induzir alta proteção em camundongos desafiados (KHORSHIDVAND et al., 2016). Dessa forma, foi possível comparar os grupos não imunizados, imunizados somente com adjuvante, imunizados com STAg e adjuvante e, por fim, os grupos experimentais deste trabalho, que foram imunizados com peptídeos associados aos demais adjuvantes imunológicos. Além dessas comparações, foram utilizadas duas linhagens distintas de camundongos, C57BL/6 e BALBc, sendo a primeira mais susceptível e a última mais resistente à toxoplasmose, ampliando assim a análise para animais com características diferentes. Utilizando-se todos esses grupos, foi possível verificar a proteção gerada pela imunização e compará-la às demais situações, possibilitando discernir quais efeitos eram causados somente pelos adjuvantes e quais eram gerados a partir da interação antígeno e anticorpo.

Os camundongos foram imunizados, sendo amostras de sangue coletadas antes e durante o processo. Essas amostras foram importantes para realizar o acompanhamento do processo de imunização e checar se o antígeno vacinal foi capaz de produzir anticorpos específicos. Por meio de *immunoblotting*, foi verificado que os grupos experimentais foram capazes de

reconhecer os antígenos nativos presentes no STAg, correspondentes às proteínas das quais os peptídeos foram sintetizados. A produção de IgG específica contra antígeno vacinal é uma característica vista em diversos trabalhos (NABI et al., 2017; KHORSHIDVAND et al., 2016).

Para que uma resposta imunológica contra a toxoplasmose seja considerada como protetora, é necessário que ela tenha determinadas características. Um dos parâmetros que pode informar o estado geral da infecção é a produção de citocinas, especialmente os níveis de produção de citocinas mais associadas aos perfis Th1 ou Th2, como IFN- γ ou IL-10, respectivamente (SASAI et al., 2019). No presente trabalho, a produção de ambas citocinas foi vista *ex-vivo*, por meio de células do baço retirados de animais que passaram por todo o ciclo de imunização, porém não foram infectados. Uma vez que estes grupos celulares, ricos em linfócitos, foram acondicionados em placas de cultura de células, foi realizado o estímulo delas com concavalina A, STAg ou não estimulado. Os esplenócitos de cada um dos animais foram separados em três grupos, sendo que os grupos receberam estímulos diferentes. Essa análise foi importante para podermos comparar o efeito da ativação por um composto conhecido, bem caracterizada, como aquela promovida pela ConA (MA et al., 2019), a resposta celular quando estimulado pelos antígenos presentes no STAg, que é um composto rico em antígenos do parasita e, portanto, um estímulo mais semelhante ao que seria observado durante a infecção, e, por fim, a ausência de estímulo, necessária para fornecer informações a respeito da concentração de produção basal dessas citocinas. Em camundongos da linhagem C57BL/6, as concentrações de citocinas resultantes dos estímulos acima mencionados indicam que não houve um padrão claramente definido pela imunização com peptídeos, adjuvantes ou STAg. Para melhor visualizar o resultado, e também destacar a diferença observada entre os grupos, foi feita a proporção das concentrações de IFN- γ /IL-10 para cada um dos grupos do presente trabalho. A partir dessa análise, foi possível evidenciar diferenças de produção de citocinas entre os grupos. Entre os grupos experimentais, pôde-se destacar o grupo peptídeos + ScLL que, apesar de apresentar concentrações baixas de ambas citocinas, teve a maior proporção entre os grupos experimentais. Essa informação é importante, uma vez que, para esta linhagem de camundongos, a fase inicial da infecção frequentemente leva o animal a óbito devido à intensa resposta imunológica que acontece no intestino, local em que o parasita inicia a infecção, sendo que o óbito é resultado de uma intensa inflamação que resulta na necrose de diversos pontos do intestino (LIESENFELD, 2002). Uma citocina fortemente ativa e presente durante essa etapa é o IFN- γ , sendo que níveis exacerbados desta estão associados com morte precoce em C57BL/6 (LIESENFELD, 2002). No entanto, a ausência dessa citocina também leva o animal a óbito

durante a infecção, como já demonstrado em camundongos geneticamente modificados, para terem produção deficitária desta citocina, e infectados (CORREA et al., 2017). A partir do exposto, e também com dados disponíveis na literatura, é possível concluir que é necessário que citocinas do perfil Th1 sejam mais expressas durante a fase aguda da toxoplasmose. No entanto, citocinas do perfil Th2, como IL-10, também são necessárias para que o animal sobreviva à fase aguda, como demonstrado em outros (LAO et al., 2015). Logo, um balanço entre Th1 e Th2, aqui representados por IFN- γ e IL-10, respectivamente, com dominância do primeiro perfil, é o desejado para uma resposta imunológica protetora e que não vá resultar em uma imunopatologia fatal para o hospedeiro, fazendo assim com que a infecção progrida para a sua fase crônica. Nos animais BALB/c, houve também um predomínio de produção de IFN- γ sobre a IL-10. Nesses animais, a imunização com peptídeos e ScLL apresentou um aumento discreto, quando comparados aos esplenócitos extraídos de camundongos pertencentes ao grupo não imunizado e estimulados com a mesma substância.

A toxoplasmose é uma infecção que pode ser dividida em duas fases distintas, que diferem uma da outra tanto no comportamento do parasita quanto na resposta imunológica do hospedeiro. A fase crônica da toxoplasmose é caracterizada pelo aumento da afinidade de imunoglobulinas da classe G, mudança na produção de citocinas, já assumindo um perfil mais reparador e menos inflamatório (LÜDER; RAHMAN, 2017), entre outras alterações importantes. Já por parte do parasita, o que se observa é a extinção de taquizoítas livres e criação e manutenção de cistos com bradizoítas em diversos tecidos do hospedeiro, como cérebro e musculatura (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Essa fase, anteriormente considerada assintomática, é hoje um objeto de estudo intenso, sendo relacionada a possíveis complicações psicossomáticas e/ou médicas associadas à presença do cisto em determinados tecidos, especialmente tecido nervoso central (KHADEM VATAN et al., 2016). Além dessas possíveis novas complicações causadas pela toxoplasmose crônica, essa fase também pode resultar em uma nova reativação da infecção, decorrente de uma depressão da imunidade do hospedeiro, sendo que a ausência da resposta imunológica saudável leva à saída dos bradizoítas dos cistos, sua transformação em taquizoítas e o consequente aumento intenso da parasitemia (DARD et al., 2018). Com o intuito de verificar, no presente trabalho, se as formulações vacinais foram capazes de influenciar a infecção crônica, foi feita a contagem de cistos de parasitas presentes nos cérebros de todos animais imunizados e infectados que sobreviveram até o 30º dia de infecção. Os resultados indicaram que, comparado ao grupo não imunizado, o grupo experimental que exibiu o menor número de cistos foi o de animais imunizados com peptídeos

+ hidróxido de alumínio ou associados com ScLL. A redução, em ambos grupos, foi de aproximadamente 75%. Na linhagem BALB/c, foram visualizados resultados semelhantes no grupo ScLL, em ambas situações de infecção, com redução de cerca de 75%. Outros autores relataram chegar a resultados semelhantes utilizando outras formulações vacinais. Zhang e colaboradores (2015) estudaram como peptídeos preditos a partir de proteínas imunodominantes do *T. gondii* alterariam a resposta de camundongos imunizados contra a toxoplasmose experimentalmente realizada, e encontraram que houve uma redução de 30 a 40% na carga parasitária destes animais. Picchio e colaboradores (2018), usando um coquetel multi-antigênico como antígeno vacinal, encontrou que essa combinação foi capaz de reduzir em torno de 20 a 30% da carga parasitária. Proteínas originadas do antígenos superficiais e de micronemas são importantes, na dinâmica da infecção, ao atuarem no primeiro contato entre parasita e hospedeiro, promovendo o reconhecimento e a primeira ligação entre ambos (SAG), e logo após essa etapa, fortalecendo a ligação e iniciando o processo de invasão (WANG et al., 2016). Ao utilizar peptídeos vacinais que representem regiões cruciais para a ação dessas proteínas, possivelmente o animal foi capaz de produzir anticorpos mais efetivos na neutralização do parasita, combatendo-o mais efetivamente, como evidenciado pela baixa quantidade de cistos nos animais imunizados.

A toxoplasmose é uma doença que raramente leva um humano saudável a óbito durante a fase aguda. Ainda que indivíduos saudáveis não desenvolvam patologias graves causadas por este protozoário, indivíduos imunossuprimidos e fetos de gestantes podem sofrer consequências mais severas (CONTIERO-TONINATO et al., 2014). Rebanhos ovinos e caprinos também fazem parte dos possíveis hospedeiros de *T. gondii*, possivelmente resultando em perdas de gestações, animais adultos e intensificando a transmissão do parasito através de carne malcozida, gerando grande prejuízo econômico (INNES et al., 2009; TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013). No presente trabalho, foi feita a verificação da capacidade das formulações vacinais em proteger os animais dos grupos desafio, que receberam um número de cistos maior do que aqueles do grupo subletal, com um número de parasitas suficiente para causar óbito em todos animais da linhagem mais susceptível usada nesse trabalho (C57BL/6). O desafio foi realizado utilizando a via natural de infecção por esse parasita, que é a oral com cistos. Após acompanhar os animais da linhagem C57BL/6 por 30 dias, o que pode ser visto dos resultados é que nenhum grupo de imunização foi capaz de aumentar significativamente a sobrevida dos animais imunizados, ainda que alguns grupos tenham um índice de sobrevida aparentemente maior. Dentre os grupos que apresentaram a sobrevida maior (ainda que não

estatisticamente significativa), os 3 grupos imunizados com ScLL se destacam, exibindo o maior número de animais vivos no final do período. Estas diferenças registradas nos grupos ScLL podem ter ocorrido devido à capacidade desse adjuvante em estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, preparar mais adequadamente o animal para a fase aguda da doença (SOUZA et al., 2016). Resultados semelhantes foram vistos em outro trabalho: Chen e colaboradores (2014) realizaram ciclos de imunização com uma proteína recombinante obtida a partir de TgCDPK1 (*Toxoplasma gondi calcium-dependent protein kinase 1*) em camundongos, que posteriormente foram submetidos ao desafio. Os animais do trabalho mencionado não sobreviveram até o 30º dia. Vários outros trabalhos tiveram abordagens e resultados semelhantes (TAN et al., 2011; ZHENG et al., 2013), registrando diferentes tempos de sobrevivência, variados graus de proteção crônica também foram vistos nestes trabalhos, porém em todos eles os animais não sobreviveram até o final do experimento. No presente trabalho, foi possível ainda verificar a sobrevivência de uma parcela dos grupos experimentais de animais susceptíveis à fase aguda, sugerindo que a utilização do ScLL e peptídeos pode ser um auxílio para aprimorar a resposta do animal durante essa fase da toxoplasmose. Em outro estudo do nosso grupo (SOUZA et al., 2016), foi verificado que a ScLL, usada com fins terapêuticos em camundongos infectados, também aumentou a sobrevivência destes, além de levar a uma mudança em diversas citocinas, favorecendo o perfil Th1.

No presente trabalho, apresentamos dois peptídeos, preditos a partir de um freeware disponível online, e outro originado de software experimental de um colaborador. Esses peptídeos foram preditos a partir de proteínas imunodominantes do parasita, e que já haviam sido alvo de estudo em outros estudos do nosso grupo. Sabendo da possível capacidade de proteção que esses peptídeos poderiam garantir ao animal imunizado, resolvemos estudar mais a fundo essa questão, utilizando duas linhagens de camundongos distintas: os C57BL/6 e os BALB/c. A primeira linhagem, como já mencionado anteriormente, é mais susceptível à imunopatologia intestinal resultante das etapas iniciais de infecção do parasita, momento em que os bradizoítas penetram nas células da superfície intestinal, se transformam em taquizoítas e, a partir dessa porta de entrada, penetram no sistema do hospedeiro. Por meio dessa linhagem, foi possível verificar o que a imunização pode realizar em animais susceptíveis, fornecendo dados importantes para estudos futuros que estudem formas de evitar e/ou combater a infecção por *T. gondii*. Adicionalmente, acrescentamos uma série de informações que podem ser essenciais para trabalhos de imunização futuros, que são os parâmetros normalmente observados em camundongos C57BL/6 imunizados com a solução de antígenos solúveis de *T.*

gondii. Essas informações são fundamentais por serem pouco vistas na literatura, visto que esses animais são pouco utilizados em trabalhos dessa natureza. Os animais da linhagem BALB/c foram utilizados para ampliar a significância dos nossos resultados ao verificar resultados semelhantes em modelos diferentes. Além de utilizarmos uma abordagem recente para a seleção e delineamento dos antígenos vacinais, selecionamos dois adjuvantes que já haviam sido outrora descritos, mas que ainda não haviam sido associados com peptídeos de proteínas imunodominantes derivadas de *T. gondii*. Ao longo do trabalho, o que foi possível observar é que a imunização foi capaz de provocar algumas mudanças no animal, como demonstrado nas citocinas e, principalmente, na diminuição intensa do número de cistos no cérebro, após os 30 dias de infecção. Acreditamos ainda que o resultado não estatisticamente significativo no experimento de desafio letal em C57BL/6 pode ser alterado utilizando diferentes metodologias de imunização, como a imunização através de mucosas, pela via nasofaríngea, já descrita em outros trabalhos e que alcançou resultados interessantíssimos. Por fim, o presente trabalho contribuiu para o aumento do conhecimento a respeito da imunoprofilaxia contra toxoplasmose em diferentes linhagens de camundongos, entregando à comunidade acadêmica e científica de todo o mundo informações importantes de modelos de predição de antígenos vacinais, comprovações de uma nova substância como adjuvante e uma formulação vacinal capaz de estimular o sistema imunológico dos animais imunizados, tornando-os capazes de combater mais efetivamente a infecção e, conseqüentemente, causando o estabelecimento de menor número de cistos ao final de 30 dias de infecção.

7. CONCLUSÕES

- Os três peptídeos sintetizados a partir da predição de epitopos de duas sequências da molécula de micronema MIC8 e de uma sequência relacionada ao antígeno de superfície SRS52A apresentaram potencial como marcadores de infecção, uma vez que foram reconhecidos por amostras de soros de animais infectados por *T. gondii*;
- O protocolo de imunização com os peptídeos juntamente com o adjuvante ScLL resultou em alterações relevantes na produção de citocinas associadas a uma diminuição significativa da carga parasitária, evidenciando que há potencialidade para estes peptídeos e adjuvante serem utilizados como antígenos vacinais.

8. REFERÊNCIAS

- AFONSO-CARDOSO, S.; SILVA, C.; FERREIRA, M.; SOUZA, M. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, Uberlândia, v. 128, n. 1, p. 61-67, 2011. <https://www.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.02.006>.
- AGUIRRE, A.; LONGCORE, T.; BARBIERI, M.; DABRITZ, H.; HILL, D.; KLEIN, P.; LEPCZYK, C.; LILY, E.; MCLEOD, R.; MILCARSKY, J.; MURPHY, C.; SU, C.; VANWORMER, E.; YOLKEN, R.; SIZEMORE, G. The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. **Ecohealth**, Fairfax, v. 16, p. 378-390, 2019. <https://www.doi.org/10.1007/s10393-019-01405-7>.
- ANDRADE, W.; MDO, C.; RAMOS-MARTINÉZ, E.; NAGPAL, K.; DUTRA, M.; MELO, M.; BARTHOLOMEU, D.; GHOSH, S.; GOLENBOCK, D.; GAZZINELI, R. Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. **Cell Host & Microbe** Worcester, v. 13, n. 1, p. 42-53, 2013. <https://www.doi.org/10.1016/j.chom.2012.12.003>.
- ARAB-MAZAR, Z.; FALLAHI, S.; KOOCHAKI, A.; MIRAHMADI, H.; JAVAD, S.; TABAEI, S. Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant *Toxoplasma gondii* GRA5 protein. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 8, n. 5, p. 331-337, 2016.
- AREFKHAH, N.; GOODARZI, R.; REZAEI, Z.; GIGLOO, A.; SARKARI, B. Low prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among children in a rural community in Fars province, southern Iran. **Le Infezioni in Medicina**, Shiraz, v. 27, n. 3, p. 322-327, 2019.
- BARROS, H.; SANTANA, S.; PAJUABA, A.; BARROS, P.; CARVALHO, F.; PAIVA, V.; MINEO, T.; MINEO, J. C57BL/6 mice immunized with synthetic peptides from *Toxoplasma gondii* surface and microneme immunodominant antigens are able to decrease parasite burden in the brain tissue. **Acta Tropica**, Uberlândia, v. 196, n. 1, p. 1-6, 2019. <https://www.doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.05.003>.

BELA, S.; SILVA, D.; CUNHA-JUNIOR, J.; PIROVANI, C.; CHAVES-BORGES, F.; CARVALHO, F.; OLIVEIRA, T.; MINEO, J.. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Uberlândia, v. 62, n. 3, p. 245-254, 2008. <https://www.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.05.017>.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, Oklahoma, v. 117, n. 5, p. 458-476, 2009. <https://www.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02453.x>.

BOOTHROYD, J. Expansion of host range as a driving force in the evolution of *Toxoplasma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Stanford, v. 104, n. 2, p. 179-184, 2009. <https://www.doi.org/10.1590/s0074-02762009000200009>.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Athens v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CARDOSO, M.; MOTA, C.; RIBEIRO, D.; NOLETO, P.; ANDRADE, W.; SOUZA, M.; SILVA, N.; MINEO, T.; MINEO, J.; SILVA, D. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Veterinary Research**, Uberlândia, v. 43, n.1, p.76-89, 2012. <https://www.doi.org/10.1186/1297-9716-43-76>.

CHEN, J.; ZHOU, D.; LI, Z.; PETERSEN, E.; HUANG, S.; SONG, H.; ZHU, X. *Toxoplasma gondii*: protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, Lanzhou v. 139, n. 1, p. 42-48, 2014. <https://www.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.016>.

COCCARO, E.; LEE, R.; GROER, M.; CAN, A.; COUSSONS-READ, M.; POSTOLACHE, T. *Toxoplasma gondii* infection: relationship with aggression in psychiatric subjects. **Journal of Clinical Pathology**. Chicago, v. 77, n. 3, p. 334-341, 2016. <https://www.doi.org/10.4088/JCP.14m09621>.

CONTIERO-TONINATO, A.; CAVALLI, H.; MARCHIORO, A.; FERREIRA, E.; CANIATTI, M.; BREGANO, R.; NAVARRO, I.; FALAVIGNA-GUILHERME, A. Toxoplasmosis: an examination of knowledge among health professionals and pregnant women in a municipality of the state of Parana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Maringa, v. 47, n. 2, p. 198-203, 2014. <https://www.doi.org/10.1590/0037-8682-0016-2014>.

CORREA, G.; LINDENBERG, C.; MOREIRA-SOUZA, A.; SAVIO, L.; TAKIYA, C.; MARQUES-DA-SILVA, C.; VOMMARO, R.; COUTINHO-SILVA, R. Inflammatory early events associated to the role of P2X7 receptor in acute murine toxoplasmosis. **Immunobiology**, Maringa v. 222, n. 2, p. 198-203, 2017. <https://www.doi.org/10.1016/j.imbio.2016.12.007>.

COSTA, F.; MOTA, C.; SANTIAGO, F.; SILVA, M.; FERREIRA, M.; FONSECA, D.; SILVA, J.; MINEO, J.; MINEO, T. GITR activation positively regulates immune responses against *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, Uberlândia, v. 11, n. 3, p. e0152622, 2016. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0152622>.

CUNHA-JUNIOR, J.; SILVA, D.; SILVA, N.; SOUZA, M.; SOUZA, G.; PRUDENCIO, C.; PIROVANI, C.; CEZAR, M.; BARBOSA, B.; GOULART, L.; MINEO, J. A 4D12 monoclonal antibody recongnizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. **Immunobiology**, Uberlândia, v. 215, n. 1, p. 26-37, 2010. <https://www.doi.org/10.1016/j.imbio.2009.01.008>.

CUTCHINS, E.; WARREN, J. Immunity patterns in the guinea pig following *Toxoplasma* infection and vaccination with killed *Toxoplasma*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Chicago, v. 5, n. 2, p. 197-207, 1956. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1956.5.197>.

DARD, C.; MARTY, P.; BRENIER-PINCHART, M.; GARNAUD, C.; FRICKER-HIDALGO, H.; PELLOUX, H.; POMARES, C. Management of toxoplasmosis in transplant recipients: an update. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Nice, v. 16, n. 6, p.447-460, 2018. <https://www.doi.org/10.1080/14787210.2018.1483721>.

DUBEY, J. The history of *Toxoplasma gondii* – the first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Maryland, v. 55, n. 6, p. 467-475, 2008. <https://www.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x>.

DUNAY, I.; GAJUREL, K.; DHAKAL, R.; LIESENFELD, O.; MONTOYA, J. Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. **Clinical Microbiology Reviews**. Magdeburg, v. 31, n. 4, p. 1-33, 2018. <https://www.doi.org/10.1128/CMR.00057-17>.

DUPONT, C.; CHRISTIAN, D.; HUNTER, C. Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Seminars in Immunopathology**, Philadelphia, v. 34, n. 6, p. 793-813, 2012. <https://www.doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>.

EL BISSATI, K.; LEVIGNE, P.; LYKINS, J.; ADLAOUI, E.; BARKAT, A.; BERRAHO, A.; LABOUDI, M.; EL MANSOURI, B.; IBRAHIMI, A.; RHAJAOU, M.; QUINN, F.; MURUGESAN, M.; SEGHROUCHNI, F.; GOMEZ-MARIN, J.; PEYRON, F.; MCLEOD, R. Global initiative for congenital toxoplasmosis: an observational comparative clinical analysis. **Emerging Microbes & Infection**, Richmond, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2018. <https://www.doi.org/10.1038/s41426-018-0164-4>.

ESSHILI, A.; THABET, S.; JEMLI, A.; TRIFA, F.; MECHRI, A.; ZAAFRANE, F.; GAHA, L.; JUCKEL, G.; BABBA, H.; JRAD, B. *Toxoplasma gondii* infection in schizophrenia and associated clinical features. **Psychiatry Research**, Monastir, v. 245, n. 1, p. 327-332, 2016. <https://www.doi.org/10.1016/j.psychres.2016.08.056>.

FANG, R.; FENG, H.; HU, M.; KHAN, M.; WANG, L.; ZHOU, Y.; ZHAO, J. Evaluation of immune responses induced by SAG1 and MIC3 vaccine cocktails against *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, Hubei, v. 187, n. 1, p. 140-146, 2012. <https://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.007>.

FLEGR, J. How and why *Toxoplasma* makes us crazy. **Trends in Parasitology**, Prague, v. 29, n. 4, p. 156-163, 2013. <https://www.doi.org/10.1016/j.pt.2013.01.007>.

FREPPEL, W.; FERGUSON, D.; SHAPIRO, K.; DUBEY, J.; PUECH, P.; DUMÈTRE, A. Structure, composition, and roles of the *Toxoplasma gondii* oocyst and sporocyst walls. **The Cell Surface**, Marseille, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2018. <https://www.doi.org/10.1016/j.tcs.2018.100016>.

FUKUMOTO, J.; YAMANO, A.; MATSUZAKI, M.; KYAN, H.; MASATANI, T.; MATSUO, T.; MATSUI, T.; MURAKAMI, M.; TAKASHIMA, Y.; MATSUBARA, R.; TAHARA, M.; SAKURA, T.; TAKEUCHI, F.; NAGAMUNE, K. Molecular and biological analysis revealed genetic diversity and high virulence strain of *Toxoplasma gondii* in Japan. **PLoS One**, Tokyo, v. 15, n. 2, p. e0227749, 2020. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0227749>.

GAZZINELI, R.; WY SOCKHA, M.; HIENY, S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; CHEEVER A.; KUHN, R.; MULLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4⁺ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 157, n. 2, p. 798-805, 1996.

GAZZINELI, R.; MENDONÇA-NETO, R.; LILUI, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. **Cell Host & Microbe**, Bethesda, v. 15, n. 2, p. 138-138, 2014. <https://www.doi.org/10.1016/j.chom.2014.01.004>.

GHAFFARIFAR, F.; JAFARIMODREK, M.; VAZINI, H.; SHARIFI, Z.; DALIMI, A.; DAYER, M. Assessment of DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* microneme complete gene and IL-12 as adjuvant in BALB/c mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Tehran, v. 22, n. 8, p.901-907, 2019. <https://www.doi.org/10.22038/ijbms.2019.34872.8276>.

GOODSWEN, KS.; KENNEDY, P.; ELLIS, J. Enhancing in silico protein-based vaccine discovery for eukaryotic pathogens using predicted-MHC binding and peptide conservation scores. **PLoS One**, Sydney, v. 9, n. 12, p. e115745, 2014. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0115745>.

GONDIM, L.; MINEO, J.; SCHARES, G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp. and *Besnoitia besnoiti*. **Parasitology**, Salvador, v. 144, n. 7, p. 851-868, 2017. <https://www.doi.org/10.1017/S0031182017000063>.

HALONEN, S.; WEISS, L. Toxoplasmosis. **Handbook of Clinical Neurology**, Bozeman, v. 114, n. 1, p. 125-145, 2013. <https://www.doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>.

HE, P.; ZOU, Y.; HU, Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Beijing, v. 11, n. 2, p. 477-488, 2015. <https://www.doi.org/10.1080/21645515.2014.1004026>.

HERWALDT, B. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, Atlanta, v. 14, n. 4, p. 659-688, 2001. <https://www.doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; GATKOWSKA, J.; GRZYBOWSKI, M.; DLUGONSKA, H. Veterinary vaccines against toxoplasmosis. **Parasitology**, Lodz, v. 141, n. 11, p. 1365-1378, 2014. <https://www.doi.org/10.1017/S0031182014000481>.

HUNTER, C.; SIBLEY, L. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, Philadelphia, v. 10, n. 11, p. 766-778, 2012. <https://www.doi.org/10.1038/nrmicro2858>.

JONES, J.; DUBEY, J. Foodborne toxoplasmosis. **Clinical Infectious Disease**, Atlanta, v. 55, n. 6, p. 845-851, 2012. <https://www.doi.org/10.1093/cid/cis508>.

KHADEM VATAN, S.; IZDI-MAZIDI, M.; SAKI, J.; KHAJEDDIN, N. Mental health and latent toxoplasmosis: comparison of individuals with and without anti-*Toxoplasma* antibodies. **World Health & Population**, Ahvaz, v. 17, n. 1, p. 39-46, 2016.

KHORSHIDVAND, Z.; SHAHABI, S.; MOHAMADZADE, H.; DARYANI, A.; HAZRATI TAPPEH, K. Mixture of Alum-Naloxone and Alum-Naltrexone as a novel adjuvant elicits responses for *Toxoplasma gondii* lysate antigen in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, Urmia, v. 162, n. 1, p. 28-34, 2016. <https://www.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.01.001>.

LAEMMLI, U.. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Cambridge, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAO, K.; ZHAO, M.; LI, Z.; LIU, X.; ZHANG, H.; JIANG, Y.; WANG, Y.; HU, X. IL-10 regulate decidual Tregs apoptosis to the abnormal pregnancy with *Toxoplasma gondii* infection. **Microbial Pathogenesis**, Binzhou, v. 89, n. 1, p. 210-216, 2015. <https://www.doi.org/10.1016/j.micpath.2015.10.002>.

LARSEN, J.; LUND, O.; NIELSEN, M. Improved method for predicting linear B-cell epitopes. **Immunome Research**, Lyngby, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2006. <https://www.doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>.

LIESENFELD, O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? **The Journal of Infectious Disease**, Berlin, v. 185 Suppl 1, n. 1, p. S96-S101, 2002. <https://www.doi.org/10.1086/338006>.

LIMA, T.; LODOEN, M. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Irvine, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2019. <https://www.doi.org/10.3389/fcimb.2019.00103>.

LIU, Q.; WANG, Z.; HUANG, S.; ZHU, X. Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & Vectors**, Yangzhou, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2015. <https://www.doi.org/10.1186/s13071-015-0902-6>.

LU, G.; WANG, L.; ZHOU, A.; HAN, Y.; GUO, J.; SONG, P.; ZHOU, H.; CONG, H.; ZHAO, Q.; HE, S.. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, Jinan, v. 146, n. 1, p. 66-72, 2015. <https://www.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.03.013>.

LUDER, C.; RAHMAN, T. Impact of the host on *Toxoplasma* stage differentiation. **Microbial Cell**, Goettingen, v. 4, n. 7, p. 203-211, 2017. <https://www.doi.org/10.15698/mic2017.07.579>.

MA, W.; LIU, Q.; NING, M.; QI, Y.; REHMAN, S.; CHEN, D. Development and applications of a monoclonal antibody against caprine interferon-gamma. **BMC Biotechnology**, Yangling, v. 19, n. 1, p. 1-7, 2019. <https://www.doi.org/10.1186/s12896-019-0596-5>.

MAENZ, M.; SCHLUTER, D.; LIESENFELD, O.; SCHARES, G.; GROSS, U.; PLEYER, U. Ocular toxoplasmosis past, present and new aspects of an old disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, Berlin, v. 39, n. 1, p. 77-106, 2014. <https://www.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.005>.

MAHMOUDVAND, H.; SHEIBANI, V.; SHOJAEI, S.; MIRBADIE, S.; KESHAVARZ, H.; ESMAEELPOUR, K.; KEYHANI, A.; ZIAALI, N. *Toxoplasma gondii* infection potentiates cognitive impairments of Alzheimer's disease in the BALB/c mice. **Journal of Parasitology**, Khorramabad, v. 102, n. 6, p. 629-635, 2016. <https://www.doi.org/10.1645/16-28>.

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. *Toxoplasma* secretory granules: one population or more? **Trends in Parasitology**, Grenoble, v. 31, n. 2, p. 60-71, 2015. <https://www.doi.org/10.1016/j.pt.2014.12.002>.

MINAEI, S.; SHAHABI, S.; SEYVEDI, S.; ZIAALI, N.; MOHAMMADZADEH HAJIPIRLOO, H. Propranolol efficacy as a novel adjuvant for immunization against *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Experimental Parasitology**, Urmia, v. 194, n. 1, p. 60-66, 2018. <https://www.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.09.014>.

MINEO, J.; CAMARGO, M.; FERREIRA, A. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINUZZI, C.; PORTELLA, L.; BRAUNIG, P.; LUDWIG, A.; RAMOS, L.; PACHECO, L.; SILVA, C.; PACHECO, F.; MENEGOLLA, I.; FARINHA, L.; KIST, P.; BREGANO, R.; NINO, B.; MARTINS, F.; MONICA, T.; FERREIRA, F.; BRITTO, I.; SIGNORI, A.; MEDICI, K.; FREIRE, R.; GARCIA, J.; NAVARRO, I.; DIFANTE, C.; VOGEL, F. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from placental tissues of pregnant women who received toxoplasmosis treatment during an outbreak in southern Brazil. **PLoS One**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2020. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0228442>.

MONTOYA, J.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, Stanford, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004. [https://www.doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://www.doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X).

MONTOYA, J.; ROSSO, F. Diagnosis and management of toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, Stanford, v. 32, n. 3, p. 705-726, 2005. <https://www.doi.org/10.1016/j.clp.2005.04.011>.

MORAIS, R.; CARMO, L.; BICHARA, C.; SANTOS, B.; SILVEIRA, K.; POVOA, M. Seroprevalence and risk factors associated with *T. gondii* infection in pregnant individuals from a Brazil Amazon municipality. **Parasite Epidemiology and Control**, Ananindeua, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2020. <https://www.doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00133>.

NABI, H.; RASHID, I.; AHMAD, N.; DURRANI, A.; AKBAR, H.; ISLAM, S.; BAJWA, A.; SHEHZAD, W.; ASHRAF, K.; IMRAN, N. Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, Lahore, v. 116, n. 1, p. 359-370, 2017. <https://www.doi.org/10.1007/s00436-016-5298-5>.

NAM, H. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 47 Suppl, n. 1, p. S29-S37, 2009. <https://www.doi.org/10.3347/kjp.2009.47.S.S29>.

NICOLLE, C.; MANCEAUX, L. Sur une infection à corps de Leishman (ou organisms voisins) du gondi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, v. 147, p. 763-766, 1908.

PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ARRANZ-SOLÍS, D.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; HEMPHILL, A.; GARCÍA-CULEBRAS, A.; CUEVAS-MARTÍN, C.; ORTEGA-MORA, L. A vaccine formulation combining rhoptry proteins NcROP40 and NcROP2 improves pup survival in a pregnant mouse model of neosporosis. **Veterinary Parasitology**, Madrid, v. 207, n. 3, p. 203-215, 2015. <https://www.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.009>.

PICCHIO, M.; SANCHEZ, V.; ARCON, N.; SOTO, A.; SIBILIA, M.; ALDIRICO, M.; URRUTIA, M.; MORETTA, R.; FENOY, I.; GOLDMAN, A.; MARTIN, V. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. **Experimental Parasitology**, Buenos Aires, v. 185, n. 1, p. 62-70, 2018. <https://www.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.01.006>.

PINTO-FERREIRA, F.; CALDART, E.; PASQUALI, A.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; FREIRE, R.; NAVARRO, I. Patterns of transmission and sources of infection in outbreaks of human toxoplasmosis. **Emerging Infectious Disease**, Londrina, v. 25, n. 12, p. 2177-2182, 2019. <https://www.doi.org/>

PITTMAN, K.; KNOLL, L. Long-term relationships: the complicated interplay between the host and the developmental stages of *Toxoplasma gondii* during acute and chronic infections. **Microbiology and Molecular Reviews**, Wisconsin, v. 79, n. 4, p. 387-401, 2015. <https://www.doi.org/10.1128/MMBR.00027-15>.

PLATTNER, F.; YAROVISNKY, F.; ROMERO, S.; DIRDRY, D.; CARLIER, M.; SHER, A.; SOLDATI-FAVRE, D. *Toxoplasma* profiling is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. **Cell Host & Microbe**, Geneva, v. 3, n. 2, p. 77-87, 2008. <https://www.doi.org/10.1016/j.chom.2008.01.001>.

RAETZ, M.; KIBARDIN, A.; STURGE, C.; PIFER, R.; LI, H.; BURSTEIN, E.; OZATO, K.; LARIN, S.; YAROVINSKY, F. Cooperation of TLR12 and TLR11 in the IRF8-dependent IL-12 response to *Toxoplasma gondii* profiling. **Journal of Immunology**, Dallas, v. 191, n. 9, p. 4818-4827, 2013. <https://www.doi.org/10.4049/jimmunol.1301301>.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDE, M. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Rennes, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012. <https://www.doi.org/10.1128/CMR.05013-11>.

ROMANO, P.; GIUGNO, R.; PULVIRENTI, A. Tools and collaborative environments for bioinformatics research. **Briefings in Bioinformatics**, Genoa, v. 12, n. 6, p. 549-561, 2011. <https://www.doi.org/10.1093/bib/bbr055>.

ROSTAMI, A.; KARANIS, P.; FALLAHI, S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Infection**, Khorramabad, v. 46, n. 3, p. 303-315, 2018. <https://www.doi.org/10.1007/s15010-017-1111-3>.

ROUATBI, M.; ARMAIRIA, S.; AMDOUNI, Y.; BOUSSAADOUN, M.; AYADI, O.; AL-HOSARY, A.; REKIK, M.; BEN ABDALLAH, R.; AOUN, K.; DARGHOUTH, M.; WIELAND, B.; GHARBI, M. *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis in North Africa: a review. **Parasite**, Sidi Thabet, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2019. <https://www.doi.org/10.1051/parasite/2019006>.

SÁNCHEZ-SANCHEZ, R.; FERRE, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; GUTIERREZ-EXPOSITO, D.; FERRER, L.; ARTECHE-VILLASOL, N.; MORENO-GONZALO, J.; MULLER, J.; AGUADO-MARTINEZ, A.; PEREZ, V.; HEMPHILL, A.; ORTEGA-MORA, L.; BENAVIDES, J. Virulence in mice of a *Toxoplasma gondii* type II isolate does not correlate with the outcome of experimental infection in pregnant sheep. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Madrid, v. 8, n. 8, p. 1-18, 2019. <https://www.doi.org/10.3389/fcimb.2018.00436>.

SANTANA, S.; GEBRIM, L.; CARVALHO, F.; BARROS, H.; BARROS, P.; PAJUABA, A.; MESSINA, V.; POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; REICHE, E.; NAVARRO, I.; GARCIA, J.; POZIO, E.; MINEO, T.; SPANO, F.; MINEO, J. CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infection in humans and domestic animals. **Frontiers in Microbiology**, Uberlândia, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2015. <https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2015.01305>.

SANTANA, S.; SILVA, D.; VAZ, L.; PIROVANI, C.; BARROS, G.; LEMOS, E.; DIETZE, R.; MINEO, J.; CUNHA-JUNIOR, J. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patient with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, Uberlândia, v. 143, n. 1, p. 193-201, 2012. <https://www.doi.org/10.1016/j.imlet.2012.02.008>.

SASAI, M.; YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine**, Osaka, v. 51, n. 12, p. 1-10, 2019. <https://www.doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal of Immunology**, Atlanta, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Perugia, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006. <https://www.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01444.x>.

SHADDEL, M.; EBRAHIMI, M.; TABANDEH, M. Bioinformatic analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine against *Toxoplasma gondii*. **Journal of Parasitic Diseases**, Ahvaz, v. 42, n. 2, p. 269-276, 2018. <https://www.doi.org/10.1007/s12639-018-0996-9>.

SHAPIRO, K.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; DIXON, B.; DUMÈTRE, A.; WIT, L.; VANWORMER, E.; VILLENA, I. Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: oocysts in water, soil and food. **Food and Waterborne Parasitology**, Davis, v.12, n. 1, p. 1-19, 2019. <https://www.doi.org/10.1016/j.fawpar.2019.e00049>.

SHARMA, P.; CHITNIS, C. Key molecular events during host cell invasion by Apicomplexan pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, New Delhi, v. 16, n. 4, p. 432-437, 2013. <https://www.doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.004>.

SIBLEY, L. Intracellular parasite invasion strategies. **Science**, St. Louis, v. 304, n. 5668, p. 248-253, 2004. <https://www.doi.org/10.1126/science.1094717>.

SONAIMUTHU, P.; CHING, X.; FONG, M.; KALYANASUNDARAM, R.; LAU, Y. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with *Toxoplasma gondii* rhoptry-1. **Frontiers in Microbiology**, Chicago, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016. <https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00808>.

SOUZA, L.; RAMOS, E.; SANTANA, S.; SILVA, M.; SANTIAGO, F.; MINEO, T.; MINEO, J. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus integrifolia* (ArtinM) are able to induce beneficial immunomodulatory effects in a murine model for treatment of *Toxoplasma*

gondii infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Uberlândia, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016. <https://www.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00164>.

SOUZA, M.; AMÂNCIO-PEREIRA, F.; CARDOSO, C.; SILVA, A.; SILVA, E.; ANDRADE, L.; PENA, J.; LANZA, H.; AFONSO-CARDOSO, S. Isolation and partial characterization of a D-galactose-binding lectin form the latex of *Synadenium carinatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Uberlândia, v. 48, n. 1, p. 705-716, 2005. <https://www.doi.org/10.1590/S1516-89132005000600005>.

SPLENDORE, A. Un nuovo protozoa parasita dei conigh. Incontrato nelle lesioni Anatomiche d'una malattia che Ricorda in molti punti il kala-azar dell'uomo. **Revista da Sociedade de Ciências de São Paulo**, São Paulo, v. 167, n. 5, p. 1, 1908.

TAN, F.; HU, X.; LUO, F.; PAN, C.; CHEN, X. Induction of protective Th1 immune responses in mice by vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase-II. **Vaccine**, Guangdong, v. 29, n. 15, p. 2742-2748, 2011. <https://www.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.089>.

TENTER, A.; HECKEROTH, A.; WEISS, L. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, Hannover, v. 30, n. 12, p. 1217-1258, 2000.

TORGERSON, P.; MASTROIACOVO, P.. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, Zurich, v. 91, n. 7, p. 501-508, 2013. <https://www.doi.org/10.2471/BLT.12.111732>.

TRIER, N.; GUVEN, E.; SKOGSTRAND, K.; CIPLYS, E.; SLIBINSKAS, R.; HOUEN, G.. Comparison of immunological adjuvants. **APMIS**, Copenhagen v. 127, n. 9, p. 635-641, 2019. <https://www.doi.org/10.1111/apm.12976>.

VERMA, R.; KHANNA, P. Development of *Toxoplasma gondii* vaccine: a global challenge. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, Rohtak, v. 9, n. 2, p. 291-293, 2013. <https://www.doi.org/10.4161/hv.22474>.

VON KLITZING, E.; EKMEKCIU, I.; KUHL, A.; BERESWILL, S.; HEIMESAAT, M. Intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of *Toxoplasma gondii* induced acute ileitis in mice harboring a human gut microbiota. **PLoS One**, Berlin, v. 12, n. 4, p. 1-19, 2017. <https://www.doi.org/10.1371/journal.pone.0176144>.

WANG, J.; LIANG, Q.; LI, T.; HE, J.; BAI, M.; CAO, X.; ELSHEIKHA, H.; ZHU, X. *Toxoplasma gondii* tk11 deletion mutant is a promising vaccine against acute, chronic, and congenital toxoplasmosis in mice. **Journal of Immunology**, Lanzhou, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2020. <https://www.doi.org/10.4049/jimmunol.1900410>.

WANG, J.; ZHANG, N.; LI, T.; HE, J.; ELSHEIKHA, H.; ZHU, X. Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. **Trends in Parasitology**, Lanzhou, v. 35, n. 3, p. 239-253, 2019. <https://www.doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.005>.

WANG, T.; RAVETCH, J. Functional diversification of IgGs through Fc glycosylation. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 129, n. 9, p. 3492-3498, 2019. <https://www.doi.org/10.1172/JCI130029>.

WANG, Y.; WANG, G.; OU, J.; YIN, H.; ZHANG, D. Analyzing and identifying novel B cell epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA4. **Parasites & Vectors**, Lanzhou, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2014. <https://www.doi.org/10.1186/s13071-014-0474-x>.

WANG, Y.; WANG, G.; CAI, J.; YIN, H. Review on the identification and role of *Toxoplasma gondii* antigenic epitopes. **Parasitology Research**, Lanzhou, v. 115, n. 2, p. 459-468, 2016. <https://www.doi.org/10.1007/s00436-015-4824-1>.

WANG, Y.; WANG, G.; CAI, J.; YIN, Y. Review on the identification and role of *Toxoplasma gondii* antigenic epitopes. **Parasitology Research**, Lanzhou, v. 115, n. 2, p. 459-468, 2016. <https://www.doi.org/10.1007/s00436-015-4824-1>.

WILHELM, C.; YAROVINSKY, F. Apicomplexan infections in the gut. **Parasite Immunology**. V. 36, 2014. <https://www.doi.org/10.1111/pim.12115>.

ZHANG, N.; HUANG, S.; ZHOU, D.; XU, Y.; HE, J.; ZHU, X. Identification and bioinformatics analysis of a putative calcium-dependent protein kinase (CDPK6) from *Toxoplasma gondii*. **Genetics and Molecular Research: GMR**, Lanzhou, v. 13, n. 4, p. 10669-10677, 2014. <https://www.doi.org/10.4238/2014.December.18.9>.

ZHANG, T.; YIN, L.; LI, R.; WANG, H.; MENG, X.; YIN, G. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T-and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. **Parasites & Vectors**, Taiyuan, v. 8, n. 1, p.1-9, 2015. <https://www.doi.org/10.1186/s13071-015-0636-5>.

ZHENG, B.; LU, S.; TONG, Q.; KONG, Q.; LOU, D. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. **Vaccine**, Hangzhou, v. 31, n. 41, p. 4578-4584, 2013. <https://www.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.058>.

¹ZHOU, J.; WANG, L.; LU, G.; ZHOU, A.; ZHU, M.; LI, Q.; WANG, Z.; ARKEN, M.; WANG, A.; HE, S. Epitope analysis and protection by a ROP19 DNA vaccine against *Toxoplasma gondii*. **Parasite**, Jinan, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2016. <https://www.doi.org/10.1051/parasite/2016017>.

²ZHOU, J.; WANG, L.; ZHOU, A.; LU, G.; LI, Q.; WANG, Z.; ZHU, M.; ZHOU, H.; CONG, H.; HE, S. Bioinformatics analysis and expression of a novel protein ROP48 in *Toxoplasma gondii*. **Acta Parasitologica**, Jinan, v. 61, n. 2, 2016. <https://www.doi.org/10.1515/ap-2016-0042>.

ZHU, W.; LI, J.; PAPPOE, F.; SHEN, J.; YU, L. Strategies Developed by *Toxoplasma gondii* to survive in the host. **Frontiers in Microbiology**. V. 10, 2019. <https://www.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00899>.

ZIMMERMANN, S.; MURRAY, P.; HEEG, K.; DALPKE, A. Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by *Toxoplasma gondii* contributes to immune evasion in macrophages by blocking IFN-gamma signaling. **Journal of Immunology**, Marburg, v. 176, n. 3, p. 1840-1847, 2006. <https://www.doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1840>.

ZORGI, N.; COSTA, A.; GALISTEO, A.; NASCIMENTO, N.; ANDRADE, H. Humoral responses and immune protection in mice with irradiated *T. gondii* tachyzoites and challenged with three genetically distinct strains of *T. gondii*. **Immunology Letters**, São Paulo, v. 138, n. 2, p. 187-196, 2011. <https://www.doi.org/10.1016/j.imlet.2011.04.007>.