

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

**GLICOSILFOSFATIDILINOSITOL COMO ALVO TERAPÊUTICO E VACINAL  
CONTRA DOENÇAS PARASITÁRIAS INTRACELULARES**

Kelem Cristina Pereira Mota

Uberlândia – MG

2020

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

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de Doutor

Aluna: Kelem Cristina Pereira Mota

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana de Almeida Araújo Santos

Uberlândia – MG

2020

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

---

M917g  
2021 Mota, Kelem Cristina Pereira, 1990-  
Glicosilfosfatidilinositol como alvo terapêutico e vacinal contra  
doenças parasitárias intracelulares [recurso eletrônico] / Kelem Cristina  
Pereira Mota. - 2020.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.  
Coorientadora: Fabiana de Almeida Araújo Santos  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.5506>  
Inclui bibliografia.

I. Imunologia. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962-, (Orient.). II.  
Santos. Fabiana de Almeida Araújo, 1983-, (Coorient.). III. Universidade  
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e  
Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU:612.017



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Tese de Doutorado número 1318 do PPIPA				
Data:	vinte e nove de junho de dois mil e vinte	Hora de início:	08h30min	Hora de encerramento:	12h20min
Matrícula do Discente:	11613IPA007				
Nome do Discente:	Kelem Cristina Pereira Mota				
Título do Trabalho:	Glicosilfosfatidilinositol como alvo terapêutico e vacinal contra doenças parasitárias intracelulares				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Epidemiologia e controle de doenças infecciosas e parasitárias				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Helmintos e protozoários de interesse médico e médico veterinário				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Wania Rezende Lima - ICEN/UFMT; Marcelo Arantes Levenhagen - USP; Murilo Vieira da Silva - ICBIM/UFU; Vanessa da Silva Ribeiro - ICBIM/UFU; Luiz Ricardo Goulart Filho - IBTEC/UFU (presidente) orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) 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, 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(as) 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(a).

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

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 Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior, em 05/07/2020, às 22:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 69,



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Murilo Vieira da Silva, Médico(a) Veterinário(a), em 06/07/2020, às 13:50, 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 Vanessa da Silva Ribeiro, Biólogo(a), em 07/07/2020, às 18:11, 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 Wania Rezende Lima, Usuário Externo, em 07/07/2020, às 19:20, 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 MARCELO ARANTES LEVENHAGEN, Usuário Externo, em 08/07/2020, às 08:14, 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

[http://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?](http://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 2118963 e o código CRC C907698C.

**Dedicatória**

***Aos meus pais: Cleuza Maria Pereira Mota e Geraldo Jorcelino Mota***

Pelo amor incondicional!

***Aos meus irmãos: Helen Cristina Pereira Mota e Dyego Pereira Mota***

Que me apoiam sempre!

***Ao meu noivo: Heitor S. N. Liporacci***

Pela paciência e apoio.

**Pensamento**



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

## Agradecimientos

Agradeço a Deus, por ter me proporcionado oportunidades que eu jamais imaginei ter e, principalmente, por me dar sabedoria para crescer e enfrentar os obstáculos que surgiram no caminho. Obrigada Senhor, por me tranquilizar nos momentos de desespero e por olhar por mim sempre!

À minha mãe Cleuza Mota que sempre me apoiou nessa jornada acadêmica, com tanto orgulho, carinho e paciência. Obrigada por ser meu exemplo de fé e força. E por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre com muito amor.

Ao meu pai Geraldo Mota que, mesmo não entendendo por que eu “estudo” até hoje, respeita minhas escolhas e está sempre comigo, me levando e buscando todos os dias, se preciso for. Obrigada por tudo!

Aos meus irmãos Dyego e Helen, que torcem por mim e me ajudam a alcançar meus objetivos.

Ao meu noivo Heitor que sempre me ajuda a compreender os meus objetivos e se preocupa com a minha felicidade. Obrigada pelo companheirismo de cada dia.

Às grandes amigas de Uberlândia: Juliana, Maria Júlia, Camila, Daliane, Marcela, Iasmin, Flávia e Karen que acompanharam toda a jornada de perto. Obrigada por cada risada, cada choro, cada brinde e todos os conselhos. Vocês estão guardadas no meu coração!

À Maria Júlia, pelo grande auxílio durante o início dos experimentos. Obrigada por cada ensinamento, palavras e gestos. Sua presença foi valiosa diante das novidades, dúvidas e desafios.

À Pós-doutoranda e coorientadora Fabiana Santos, que me ajudou a compreender a técnica de *Phage display* (e tantas outras metodologias), auxiliou durante os experimentos e me acompanhou desde o início no Laboratório de Nanobiotecnologia. Obrigada pela atenção, paciência e carinho de sempre.

Às técnicas dos laboratórios de Parasitologia e Nanobiotecnologia, pelo auxílio durante os procedimentos metodológicos. Em especial à Juliana, pela paciência durante os ensinamentos.

À doutoranda Mylla, do Laboratório de Tripanosomatídeos, que contribuiu durante a execução dos experimentos *in vitro*. Obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Tripanosomatídeos e de Imunoparasitologia, que gentilmente doaram extratos de *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, respectivamente.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Belchiolina Beatriz Fonseca, que por um período foi coorientadora, sempre com atenção durante o trajeto.

Ao meu orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luiz Ricardo Goulart Filho, que acreditou em mim e compreendeu todas as minhas dificuldades. Serei eternamente grata à você por ter acreditado no meu potencial e ter me dado a oportunidade de crescer, tanto como profissional quanto como pessoa.

À banca examinadora que se disponibilizou a corrigir o trabalho, contribuindo para a melhoria do mesmo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro à pesquisa durante o período de novembro de 2016 a fevereiro de 2020.

Epígrafe

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

(Albert Einstein)

## **Lista de Abreviações**

BSA: *Bovine serum albumin*, Soro albumina bovina

cm: Centímetro

DAB: 3,3-Diaminobenzidina

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Meio Eagle modificado por Dulbecco

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico

ELISA: *Enzyme linked immunosorbent assay*, Ensaio de imunoabsorbância enzimática

FITC: *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GPI: Glicosilfosfatadilinositol

HCl: Ácido clorídrico

His-Trap: Coluna de sefarose para purificação de proteínas marcadas com histidina

His6: hexa-histidina

HPLC: *High-performance liquid chromatography*, cromatografia líquida de alta eficiência

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IPTG: isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: Quilodalton

L: Litro

LB: *Luria-Bertani*

M: Molar

Mg: miligrana

mL: Mililitro



mM: milimolar

n: Número

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

OD: *Optical density*, Densidade ótica

OPD: orto-fenilenodiamina

*p*: Nível de significância

pIII: Proteína III do capsídeo de bacteriófagos filamentosos

pb: Par de bases

PBS: *Phosphate buffered saline*, salina tamponada com fosfato de sódio

PBS-T: PBS acrescido de Tween-20

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reação em cadeia da polimerase

PEG: Polietilenoglicol

Ph.D: Biblioteca de *Phage display New England Biolabs*

Ph.D-C7C: Biblioteca contendo peptídeos randômicos com 7 resíduos flanqueados por 2 cisteínas

pH: Potencial Hidrogeniônico

rpm: Rotação por minuto

SB: *Superbroth*

scFv: *single-chain variable fragment*; fragmento variável de cadeia única

SDS-PAGE: *Sodium dodecyl sulfate poly-acrilamida gel eletrophoresis*, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

TA: Temperatura Ambiente

TCT Y: tripomastigotas de cultura de tecido da cepa Y de *T. cruzi*

UFU: Universidade Federal de Uberlândia

VH: Região variável da cadeia pesada de anticorpo

VL: Região variável da cadeia leve de anticorpo

X-gal: Substrato cromogênico de  $\beta$ -galactosidase

$\mu$ g: Micrograma

$\mu$ L: Microlitro

$\mu$ M: Micromolar

$^{\circ}$ C: Graus Celsius

%: Por cento/Porcentagem

$\beta$ Gal $f$ :  $\beta$ -D-galactofuranose

2DG: 2-desoxi glicose

## Lista de Figuras

**Figura 1.** Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. (1) Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com o parasito inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam as células do fígado (2) e amadurecem em esquizontes (3), que rompem e liberam merozoítos (4). Após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), os parasitos sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Merozoítos infectam glóbulos vermelhos (5). Os trofozoítos em estágio de anel amadurecem em esquizontes, que se rompem liberando merozoítos (6). Alguns parasitos se diferenciam em estágios eritrocitários sexuais (gametócitos) (7). Os gametócitos, masculino (microgametócitos) e feminino (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante uma refeição de sangue (8). Enquanto estão no estômago do inseto vetor, os microgametas penetram nos macrogametas gerando zigotos (9). Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (ocinetos) (10) que invadem a parede intestinal do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos (11). Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos, que chegam às glândulas salivares do mosquito (12). A inoculação de esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida da malária. Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.....35

**Figura 2.** Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Os hospedeiros definitivos (felídeos) eliminam oocistos não esporulados em suas fezes. Oocistos se tornam infecciosos no ambiente após uma fase de esporulação de 1 a 5 dias. Quando infectados, hospedeiros intermediários (animais homeotérmicos) podem abrigar cistos em seus tecidos. Os felídeos se infectam geralmente pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de suas presas, mas pode ocorrer também pela ingestão de oocistos maduros do ambiente. Hospedeiros intermediários geralmente são infectados através da ingestão de água ou de vegetais contaminados com oocistos, mas também pode ocorrer pela ingestão de cistos se forem carnívoros. Os seres humanos podem ser infectados pela ingestão de cistos em carne ou oocistos em água ou vegetais, por via transplacentária da mãe para o feto, e por transfusão de sangue ou transplante de órgãos. Adaptado de Dard et al., 2016.....38

**Figura 3.** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas quando se alimenta de um indivíduo infectado. (2) As formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas que (3) se multiplicam por divisão binária no intestino médio do inseto. (4) No intestino posterior, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (5), que são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo do barbeiro e penetram no hospedeiro mamífero através de aberturas na pele ou na mucosa, podendo invadir uma variedade de células. Em seguida, as formas tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas (6),

que multiplicam (7), diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula, podendo desta forma, invadir novos tecidos (8, 9). Adaptado de Stuart et al., 2008.....41

**Figura 4.** Estrutura conservada da âncora GPI de eucariotos. Apresentando um núcleo glicano (GlcN) conservado ligado ao fosfatidilinositol (PI). Adaptado de Previato et al. (1995).....52

**Figura 5.** Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso, o qual infecta uma variedade de bactérias Gram-negativas, frequentemente *Escherichia coli* do gênero masculino, utilizando o *pilus* sexual do receptor. Esse vírus apresenta DNA de fita simples envolto por uma capa proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Garg, 2019.....54

**Figura 6.** Esquema representativo do processo de *Biopanning* para seleção de peptídeos (A) e anticorpo (B). Em A, a biblioteca de fagos (1) é adicionada ao alvo imobilizado (2). Os fagos que não se ligarem serão retirados por lavagens sucessivas (3), assim os fagos de interesse (que se ligaram ao alvo) são eluídos (4), titulados (5) e amplificados em *E. coli* ER2738 (6), os quais serão utilizados para um novo ciclo (7). Após três ciclos de seleção, o DNA dos fagos são extraídos e sequenciados (8). Em B, o processo se distingui quando os fagos eluídos são amplificados em *E. coli* XL-1blue (6) e, após o último ciclo de seleção, as bactérias *E. coli* XL1-Blue infectadas são utilizadas para extração do DNA plasmidial (8) e posterior transformação em bactérias *E. coli* TOP10 (9).....55

**Figura 7.** Expressão e reatividade a GPI de *P. falciparum* do sobrenadante de cultura dos clones purificados induzidos por IPTG, após transformação em *E. coli* TOP 10. Oito clones (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8) foram expressos e reativos a GPI de *P. falciparum*. Observa-se maior reatividade do clone G7 à GPI do parasito.....78

**Figura 8.** Purificação do clone G7 em HPLC, utilizando coluna His-Trap (A). Ensaio *dot blot* do scFv purificado (B). SDS-PAGE evidenciando a fração de scFv com peso molecular de aproximadamente 30 Kda (C) e genes de scFv extraído e visualizado em gel de agarose 0,8%, com banda de aproximadamente 3500pb (D).....79

**Figura 9.** Predição da estrutura tridimensional do clone G7. Em (A) o modelo é apresentado evidenciando a composição da estrutura secundária e em (B) mostrando a conformação de superfície. Os domínios de cadeia leve variável (VL) (em vermelho) e de cadeia pesada variável (VH) (em lilás) são destacados estando expostos na superfície proteica.....80

<b>Figura 10.</b> Figura 10. Curva de parasitemia observada a partir do tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> -ANKA-GFP+, foi possível observar que a fração de anticorpo selecionada diminui significativamente a parasitemia dos animais (A), mantendo-os vivos e sem sintomas de malária cerebral por até 30 dias após a infecção (B).....	81
<b>Figura 11.</b> Reatividade do clone G7 com extratos proteicos de diferentes parasitos intracelulares. Observa-se maior reatividade do clone G7 à GPI de <i>T. cruzi</i> .....	82
<b>Figura 12.</b> Ensaio de viabilidade celular e invasão de <i>T. cruzi</i> em células C2C12. O clone G7 não causa morte celular (A) ou parasitária (B).....	83
<b>Figura 13.</b> O clone G7 diminui significativamente a invasão de <i>T. cruzi</i> na célula (A) e, conseqüentemente apresenta menos parasitos no interior das células infectadas (B) ( $p = 0,003$ ). O processo de invasão foi observado em microscópio óptico (aumento de 100x) através da contagem dos parasitos internalizados, comparando o grupo controle (parasitos não tratados previamente com G7) (C) com o grupo tratado (D). As setas indicam a presença do parasito no interior das células...83	83
<b>Figura 14.</b> O clone G7 diminui significativamente a invasão de <i>T. gondii</i> na célula (A) e, conseqüentemente apresenta menos parasitos no interior das células infectadas (B) ( $p = 0,0001$ ). O processo de invasão foi observado em microscópio óptico (aumento de 100x) através da contagem dos parasitos internalizados, comparando o grupo controle (parasitos não tratados previamente com G7) (C) com o grupo tratado (D). As setas indicam a presença do parasito no interior das células...84	84
<b>Figura 15.</b> Painel de pré-validação dos clones reconhecidos por scFv purificado. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.....	86
<b>Figura 16.</b> Ensaio imunoenzimático (ELISA) para validação dos clones mais reativos ao scFv (G7). Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.....	86
<b>Figura 17.</b> Ensaio imunoenzimático (ELISA) para validação da reatividade dos dois clones mais reativos ao scFv (G7) com soro de camundongos Balb/c infectados com <i>P. berghei</i> -ANKA-GFP+ (soro +) e não infectados (soro -) em diferentes diluições (1:50, 1:100 e 1:200). Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.....	87

## **Lista de Tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA utilizando os clones de scFv selecionados.....	78
<b>Tabela 2.</b> Taxa de enriquecimento observada durante as seleções biológicas utilizando biblioteca Ph.D.-C7C.....	85
<b>Tabela 3.</b> Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA na detecção de scFv-G7 anti-GPI de <i>Plasmodium falciparum</i> utilizando os peptídeos miméticos selecionados.....	87



## Sumário

<b>Introdução.....</b>	<b>33</b>
1.1. Protozoários intracelulares de importância na saúde pública .....	34
1.1.1. <i>Plasmodium falciparum</i> e Malária.....	34
1.1.2. <i>Toxoplasma gondii</i> e Toxoplasmose.....	37
1.1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas .....	39
1.2. Resposta imune e Interação parasito-hospedeiro .....	42
1.2.1. <i>Plasmodium falciparum</i> .....	42
1.2.2. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	44
1.2.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	46
1.3. Tratamento e vacina contra parasitos intracelulares.....	48
1.3.1. Malária.....	48
1.3.2. Toxoplasmose.....	49
1.3.3. Doença de Chagas .....	51
1.4. Glicosilfosfatidilinositol .....	52
1.5. Phage display.....	54
1.6. <i>Single-chain variable fragment</i> (scFv) como proposta terapêutica .....	56
1.7. Peptídeos recombinantes como alternativa vacinal .....	58
<b>Objetivos .....</b>	<b>60</b>
2.1. Desenvolvimento de fragmento de anticorpo anti-GPI .....	61
2.1.1. Objetivo Geral .....	61
2.1.2. Objetivos específicos .....	61
2.2. Desenvolvimento de peptídeos ligantes de scFv anti-GPI .....	61
2.2.1. Objetivo Geral .....	61
2.2.2. Objetivos específicos.....	61
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>62</b>
DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTO DE ANTICORPO ANTI-GPI .....	63
3.1. Aspectos éticos.....	63
3.2. Seleção de scFv ligante a GPI de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	63
3.3. Extração de DNA plasmidial e transformação em <i>E. coli</i> TOP10.....	64
3.4. Expressão de scFv.....	64
3.5. Análise da expressão e especificidade dos clones de scFv por ELISA.....	65
3.6. Sequenciamento de DNA .....	65
3.6.1. Análise de bioinformática.....	65

3.7. Expressão de scFv em maior escala e purificação por HPLC .....	66
3.8. Identificação de scFv purificado .....	67
3.9. Ensaio <i>in vivo</i> .....	67
3.9.1. Animais .....	67
3.9.2. Manutenção de <i>Plasmodium berghei</i> .....	67
3.9.3. Determinação da parasitemia .....	68
3.9.4. Curva de mortalidade .....	69
3.10. Ensaio <i>in vitro</i> .....	69
3.10.1 Validação da reatividade do scFv com extratos de parasitos .....	69
3.10.2. Parasitos .....	69
3.10.3. Teste de viabilidade celular .....	70
3.10.4. Ensaio de invasão celular .....	71
DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE SCFV ANTI-GPI .....	71
3.11. Seleção de peptídeos recombinantes .....	71
3.11.1. <i>Biopanning</i> e amplificação de fagos.....	71
3.11.2. Titulação e purificação dos fagos .....	72
3.12. Extração de DNA de fagos .....	73
3.12.1. Sequenciamento.....	74
3.13. <i>Phage-Elisa</i> .....	74
3.14. Validação dos clones selecionados .....	74
3.15. Análise estatística.....	75
<b>Resultados .....</b>	<b>77</b>
DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTO DE ANTICORPO ANTI-GPI .....	78
4.1. Clones que expressam scFv ligante à GPI.....	78
4.2. O clone G7 prolonga a vida de camundongos C57BL/6 infectados com <i>P. berghei</i> -ANKA-GFP+ sem diminuir a parasitemia .....	81
4.3. O clone G7 selecionado contra GPI de <i>P. falciparum</i> reage com extratos de outros parasitos intracelulares.....	81
4.4. O clone G7 selecionado não é tóxico para célula e diminui a invasão celular por <i>T. cruzi</i> e <i>T. gondii</i> .....	83
DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE SCFV ANTI-GPI .....	85
4.5. Peptídeos miméticos à GPI de <i>P. falciparum</i> .....	85
4.5.1. As seleções apresentaram enriquecimento nas etapas finais .....	85
4.5.2. Onze clones de fagos apresentaram sequências distintas .....	86

4.5.3. Quatro clones são mais reativos ao G7 .....	86
<b>Discussão .....</b>	<b>89</b>
5.1. Seleção de fragmento de anticorpo anti-GPI .....	90
5.2. Seleção de peptídeos ligantes de scFv anti-GPI .....	92
<b>Conclusão .....</b>	<b>95</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>97</b>

**Resumo**

Glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um complexo glicolipídico que ancora diversas proteínas e glicoproteínas à membrana celular, considerada essencial para a interação de diversos protozoários com seus hospedeiros. Atribui-se a resistência a parasitos aos indivíduos com altos títulos de anticorpos anti-GPI. Assim, os objetivos deste estudo foram desenvolver anticorpos de fragmento variável de cadeia única (scFv) selecionados por *Phage Display* contra GPI de *Plasmodium falciparum* e avaliar a capacidade em diminuir a mortalidade de camundongos com malária cerebral, bem como neutralizar a invasão celular de parasitos protozoários intracelulares. O sucesso do objetivo primário também levou ao desenvolvimento de peptídeos ligantes ao scFv com maior afinidade ao GPI. A seleção de scFv ligante à GPI de *P. falciparum* foi realizada a partir de uma biblioteca de *Phage Display* contendo uma diversidade aproximada de  $2 \times 10^6$  seqüências combinatórias de scFv. A expressão e especificidade dos clones foram analisadas por ELISA. O DNA extraído do clone com maior reatividade foi submetido ao sequenciamento e posterior análise de bioinformática, com modelagem molecular para prever a estrutura tridimensional, bem como as regiões determinantes de complementariedade (CDRs) e *frameworks* (FWRs). Camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*- cepa ANKA foram tratados com o clone de scFv e análises de parasitemia e curva de mortalidade dos animais foram realizadas. Avaliou-se ainda a reatividade do scFv com extratos de *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, bem como sua capacidade de impedir a invasão celular. Por fim, foi realizado um novo processo de *biopanning* por *Phage Display* para selecionar peptídeos miméticos à molécula GPI de *P. falciparum*. A reatividade dos clones de peptídeos fusionados aos fagos com o scFv selecionado foi avaliada por *Phage-ELISA*, e os clones mais reativos foram validados na presença de soro de camundongos com malária cerebral. Dentre os clones de scFv selecionados, oito (G1-G8) apresentaram seqüência distintas, e expressaram scFv (G7) que se ligou com maior afinidade à GPI de *P. falciparum*. O clone G7 diminuiu a parasitemia dos animais e foi capaz de protegê-los dos sintomas de malária cerebral, impactando significativamente na sobrevivência. O clone G7 também apresenta alta afinidade por *T. cruzi* e *T. gondii*, além de não ser tóxico para a célula nem para o parasito. Após o tratamento *in vitro* houve menos internalização de parasitos quando comparado ao grupo controle. Quanto à seleção de peptídeos miméticos à GPI, 11 clones (F1, E1, F2, D2, C4, E4, D5, H5, A6, H6 e F7) apresentaram seqüências distintas, sendo que quatro (F1, E1, F2 e A6) foram mais reativos ao G7, dos quais dois (E1 e F1) distinguem soro de camundongos com malária dos saudáveis. Em resumo, o scFv-G7 ligante de GPI de amplo espectro foi selecionado apresenta grande potencial como um promissor imunobiológico aplicado ao tratamento de doenças parasitárias, como malária, toxoplasmose e doença de Chagas. Adicionalmente, seus peptídeos ligantes, miméticos à GPI, também apresentam potencial terapêutico, podendo atuar no futuro próximo tanto no diagnóstico quanto como antígenos vacinais.

Palavras-chave: Glicosilfosfatidilinositol, scFv, peptídeos miméticos, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*.

## **Abstract**

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) is a glycolipid complex that anchors several proteins and glycoproteins to the cell membrane, considered an essential molecule for the interaction of several protozoa with their hosts. Parasite resistance is attributed to individuals with high anti-GPI antibody titers. Thus, the objectives of this study were to develop antibodies of single-chain variable fragments (scFv) selected by Phage Display against GPI of *Plasmodium falciparum* and to evaluate their ability to decrease the mortality of mice with cerebral malaria, as well as to neutralize parasitic cell invasion of broad intracellular protozoa. The success of the primary goal also led us to the development of scFv-binding peptides with greater affinity for GPI. The selection of *P. falciparum* GPI-binding scFv was performed from a Phage Display library containing an approximate diversity of  $2 \times 10^6$  scFv combinatorial sequences. The expression and specificity of clones were analyzed by ELISA. The DNA extracted from the highest reactivity clone was subjected to sequencing and subsequent analysis of bioinformatics, with molecular modeling to predict the three-dimensional structure, as well as the complementarity determining regions (CDRs) and frameworks (FWRs). C57BL / 6 mice infected with *P. berghei*-ANKA were treated with the scFv clone and analyzes of parasitemia and mortality curve of the animals were performed. The reactivity of scFv with extracts of *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* was also evaluated, as well as its ability to prevent cell invasion. Finally, a new biopanning process was performed by Phage Display to select mimetic peptides to the GPI molecule of *P. falciparum*. The reactivity of phage-fused peptide clones with the selected scFv was evaluated by Phage-Elisa, and the most reactive clones were validated in the presence of serum from mice with cerebral malaria. Among selected scFv clones, eight (G1-G8) presented different sequences, and the expressed scFv G7 had the highest affinity to the *P. falciparum* GPI. G7 decreased the parasitemia of the animals and was able to protect animals from symptoms of cerebral malaria, significantly impacting survival. The G7 clone also presented high affinity for *T. cruzi* and *T. gondii* extracts, besides not being toxic to cells or to the parasites. After *in vitro* treatment, we have observed a reduction of parasites internalization when compared to the control group. Regarding the selection of mimetic peptides to GPI, 11 clones (F1, E1, F2, D2, C4, E4, D5, H5, A6, H6 and F7) presented different sequences, four of which (F1, E1, F2 and A6) were more reactive to G7, of which two (E1 and F1) distinguished serum from mice with malaria from the healthy ones. In summary, the broad spectrum GPI scFv G7 antibody presents great potential as a promising immunobiological drug that may be applied to the treatment of parasitic diseases, such as malaria, toxoplasmosis and Chagas disease. In addition, its binding peptides, mimetic to GPI, may also have theranostic potential, by acting in the near future both in diagnosis and as vaccine antigens.

Keywords: Glycosylphosphatidylinositol, scFv, mimetic peptides, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*.



# Introdução

## 1.1. Protozoários intracelulares de importância na saúde pública

Protozoários são microrganismos eucariotos unicelulares pertencentes ao reino Protozoa. O grupo é distribuído em sete filos, dos quais quatro são de interesse na saúde pública: Apicomplexa, Sarcomastigophora, Ciliophora e Microspora, sendo que nos dois primeiros estão inseridos os principais gêneros causadores de parasitoses humanas responsáveis por milhares de infecções e mortes em todo o mundo (*Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Trypanosoma*).

Parasitas do filo Apicomplexa (incluindo *Plasmodium* spp e *Toxoplasma gondii*) possuem organelas únicas (roptrias e micronema) na extremidade apical, as quais são fundamentais no processo de invasão celular (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018). Além disto, formam um vacúolo parasitóforo como ambiente replicativo exclusivo do grupo (CLOUGH; FRICKEL, 2017). Já o filo Sarcomastigophora inclui protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma*, os quais parasitam sangue e tecidos de animais vertebrados (SERVICE, 1996).

### 1.1.1. *Plasmodium falciparum* e Malária

O gênero *Plasmodium*, pertencente ao filo Apicomplexa, envolve seis espécies de parasitos intracelulares que infectam o homem causando a malária (*P. ovale curtisi*, *P. ovale wallikeri*, *P. malariae*, *P. knowlesi*, *P. falciparum* e *P. vivax*) (PLEWES et al., 2019). Destas, *P. falciparum* e *P. vivax* são as responsáveis pela maioria dos casos da doença no mundo, sendo *P. falciparum* a espécie mais mortal, pois pode causar anemia, insuficiência renal, malária cerebral e falência múltipla de órgãos (CHURCH et al., 1997). Recentemente, estudos utilizando diagnóstico molecular identificaram humanos infectados com espécies zoonóticas (*P. simium* e *P. cynomolgi*), entretanto ainda não está claro a prevalência e o impacto clínico dessas espécies (TA et al., 2014; BRASIL et al., 2017).

Para completar seu ciclo de vida (Figura 1), o parasito necessita de dois hospedeiros: um hospedeiro definitivo (fêmea do mosquito *Anopheles*) e um intermediário (vertebrado, incluindo o ser humano) (BANNISTER; MITCHELL, 2003). Nesses hospedeiros, o parasito circula em quatro nichos diferentes: intestino médio e glândula salivar do mosquito; células hepáticas e glóbulos vermelhos em humanos (JOSLING; LLINAS, 2015). Durante o repasto sanguíneo, o mosquito inocula esporozoítos do parasito, através da saliva, em um indivíduo. Estas formas evolutivas entram nos hepatócitos, onde se diferenciam em trofozoítos e, após várias divisões por esquizogonia, se transformam em esquizontes, os quais se dividem por reprodução assexuada

gerando milhares de merozoítos, os quais rompem as células do fígado e invadem eritrócitos. Nas células sanguíneas, os merozoítos se diferenciam nos estágios assexuados (trofozoítos e esquizontes). Estes últimos sofrem multiplicação do DNA, formando novos merozoítos, os quais causam a lise celular, caem na circulação e invadem novos eritrócitos (KUHN; McCARTHY, 2006; ENOMOTO et al., 2012). Uma característica fundamental do ciclo de vida assexuado nos glóbulos vermelhos é a capacidade de rápido crescimento populacional (de 16 a 32 merozoítos por esquizonte) (SIMPSON et al., 2002; DEANS et al., 2006; PAYNE et al., 2016; BERI; BALAN; TATU, 2018). Esta etapa marca a fase sintomática da infecção, caracterizada pelos episódios febris recorrentes (JOSLING; LLINAS; 2015; COWMA; HEALER; MARAPANA et al., 2016).

Outra fração dos merozoítos entra no ciclo sexual e formam os gametócitos feminino (macrogametócito) e masculino (microgametócito), os quais são aspirados pela fêmea do mosquito *Anopheles* durante o repasto sanguíneo. Desta forma, os gametócitos (estágio sexual do parasito) são responsáveis pela transmissão do hospedeiro humano para o mosquito. No intestino médio do mosquito, condições ideais de temperatura, pH e metabólitos induzem a maturação de gametócitos em gametas (BILLKER et al., 1998; ARAI et al., 2001; BERI; BALAN; TATU, 2018). No estômago do inseto, os gametas se fundem formando o zigoto, que se desenvolve em oocineto. Esta é uma forma móvel do parasito, a qual atravessa a parede do estômago e migra para as células epiteliais do intestino médio, onde se desenvolvem em oocistos, os quais produzem esporozoítos. Estes rompem os oocistos e migram para a glândula salivar do mosquito que, em seu próximo repasto sanguíneo, inocula esporozoítos em um novo hospedeiro intermediário (KUHN et al., 2006; DELVES et al., 2012; BERI; BALAN; TATU, 2018).

Em áreas endêmicas, populações assintomáticas frequentemente apresentam gametocitemia alta, tornando-se potencial reservatório do parasito (GOUAGNA et al., 2004; OKELL et al., 2012; SUMARI et al., 2017). A transmissão contínua de malária tem sido relatada em 91 países da África, representando 90% do total de casos mundiais e 92% das mortes por malária (WHO, 2015a). Em vários países endêmicos das Américas, embora tenham tido avanços significativos para a eliminação da malária, a doença ainda é uma grande preocupação de saúde pública, principalmente na região Amazônica, onde ocorre a maioria dos casos de malária da América do Sul (RECHT et al., 2017). Sendo que, em 2015, o Brasil era responsável por 24% dos casos de malária nas Américas (WHO, 2016a). No país, a região Amazônica apresenta quase 99% dos casos nacionais, com aumento de casos no estado do Amapá, Mato Grosso e Rondônia no ano de 2019. Nesse mesmo

ano, os estados que reportaram o maior número de casos autóctones foram Amazonas (45% dos casos), Pará (22%) e Roraima (13%) (WHO, 2019a).

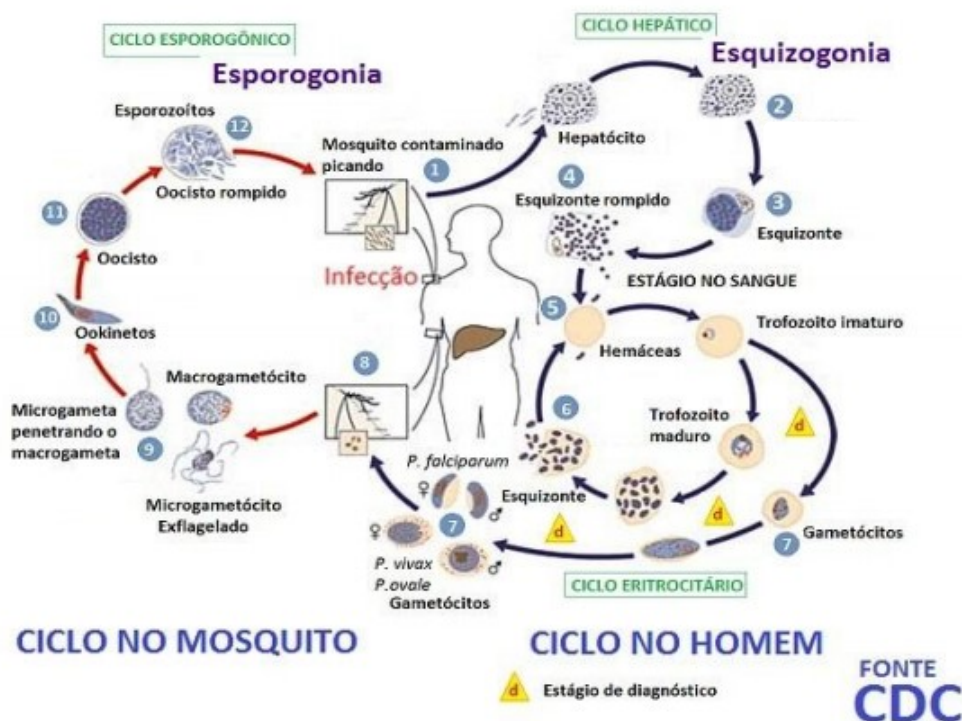


Figura 1. Ciclo de vida de *Plasmodium* sp. (1) Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do mosquito *Anopheles* infectada com o parasito inocula esporozoítos no hospedeiro humano. Os esporozoítos infectam as células do fígado (2) e amadurecem em esquizontes (3), que rompem e liberam merozoítos (4). Após essa replicação inicial no fígado (esquizogonia exo-eritrocítica), os parasitos sofrem multiplicação assexuada nos eritrócitos (esquizogonia eritrocítica). Merozoítos infectam glóbulos vermelhos (5). Os trofozoítos em estágio de anel amadurecem em esquizontes, que se rompem liberando merozoítos (6). Alguns parasitos se diferenciam em estágios eritrocitários sexuais (gametócitos) (7). Os gametócitos, masculino (microgametócitos) e feminino (macrogametócitos), são ingeridos por um mosquito *Anopheles* durante uma refeição de sangue (8). Enquanto estão no estômago do inseto vetor, os microgametas penetram nos macrogametas gerando zigotos (9). Os zigotos, por sua vez, tornam-se móveis e alongados (ookinetos) (10) que invadem a parede intestinal do mosquito, onde se desenvolvem em oocistos (11). Os oocistos crescem, rompem e liberam esporozoítos, que chegam às glândulas salivares do mosquito (12). A inoculação de esporozoítos em um novo hospedeiro humano perpetua o ciclo de vida da malária. Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).

A forma mais grave da doença é a malária cerebral, a qual é mais prevalente em crianças menores de cinco anos que vivem em ambientes endêmicos, apresentando mortalidade de 10% a 20%. As manifestações clínicas podem começar com uma apresentação típica da malária e levar a convulsões generalizadas, as quais são observadas em 80% das crianças e 15% dos adultos, podendo progredir para estágios epiléticos e degenerar para um estado de coma (DONDORP et al., 2005; DONDORP et al., 2010; SEYDEL et al. 2015). Além de haver possíveis complicações como insuficiência respiratória, renal e hepática agudas (HORA et al., 2016).

Neste contexto, a Organização Pan-Americana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde recomendam que, em áreas endêmicas os serviços de saúde intensifiquem a vigilância, melhorando a cobertura do diagnóstico de casos e fornecendo tratamento completo com antimaláricos com início imediato (WHO, 2019a).

### **1.1.2. *Toxoplasma gondii* e Toxoplasmose**

Ainda no filo Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, descrito em 1909 por Nicolle e Manceaux, é parasito intracelular obrigatório que infecta a maioria das células nucleadas de animais endotérmicos, com alguns relatos de evidência sorológica em animais de sangue frio (CLOUGH; FRICKEL, 2017; FEITOSA et al., 2017; FERREIRA et al., 2020). Tal parasito causa a toxoplasmose e possui distribuição mundial, permanecendo cronicamente em 30-50% dos seres humanos (TORGERSON; MASTROIACOVO, 2013).

*T. gondii* apresenta ciclo de vida heteróximo, tendo hospedeiros definitivos (felinos) e intermediários (aves, roedores e outros mamíferos – incluindo o homem), com presença de três formas evolutivas infectantes (taquizoítos, bradizoítos e oocistos) (Figura 2). Taquizoíto é a forma móvel, de replicação rápida, encontrada na fase aguda da infecção, apresentando formato semelhante à banana ou meia-lua, com uma das extremidades mais arredondada e a outra mais afilada (KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018). Bradizoítos são encontrados dentro de vacúolos parasitóforos em células de vários tecidos, geralmente na fase crônica da doença. Oocisto é a forma parasitária resistente às condições do meio ambiente, já que são eliminados imaturos nas fezes dos felídeos.

A reprodução sexuada ocorre apenas no epitélio intestinal de gatos e outros felídeos. Após ingestão de cistos, oocistos ou taquizoítos, os parasitos penetram nas células do epitélio intestinal deste hospedeiro, onde se multiplicam, dando origem a vários merozoítos, os quais se diferenciam em gametócitos masculino e feminino. Após a fecundação e formação de oocistos (contendo esporozoítos resistentes em seu interior), os mesmos são eliminados nas fezes destes animais. O hospedeiro intermediário é infectado ao ingerir oocistos maduros contendo esporozoítos junto com alimentos e/ou água contaminada; ou cistos contendo bradizoítos em carnes; ou mais raramente taquizoítos eliminados no leite; além da transmissão congênita (da mãe para o feto); ou através de transplantes de órgãos contendo o parasito (CLOUGH; FRICKEL, 2017; KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018). Tais formas evolutivas passam por intensa multiplicação intracelular formando novos taquizoítos, os quais disseminam livremente pela linfa ou sangue, podendo ser eliminados

pelo sistema imune do hospedeiro ou atingir os tecidos. Taquizoítos nos tecidos, se diferenciam em bradizoítos e formam cistos (formas resistentes que isolam os bradizoítos da ação dos mecanismos imunológicos do hospedeiro), podendo persistir de forma latente por toda a vida do ser humano no sistema nervoso central (SNC) (cérebro é o principal órgão de encistamento), músculos cardíaco e esquelético (KIM; BOOTHROYD, 2005; HARKER; UENO; LODOEN, 2015; MENDEZ; KOSHY, 2017; KOCHANOWSKY; KOSHY, 2018).

Apesar de a maioria das infecções por este parasito serem assintomáticas, em indivíduos imunocomprometidos pode desencadear quadros graves de encefalite, miocardite, coriorretinite, entre outros, podendo levar a morte (ŠTAJNER et al., 2013). Em fetos, a partir da transmissão congênita, pode ocorrer sequelas oculares, desordens neurológicas ou psicomotoras, além de morte fetal e abortamento (ANDRADE et al., 2010).

A soroprevalência de toxoplasmose em humanos varia de acordo com as características ambientais e socioeconômicas da região, sendo que em regiões tropicais como o Brasil a severidade da doença tende a ser mais evidente (DUBEY et al., 2012; FLEGR et al., 2014). E a soroprevalência varia de acordo com a região, apresentando 53.2% de testes sorológicos positivos para *T. gondii* em população rural no sul do Rio Grande do Sul (ARAÚJO et al., 2018), 62.3% em Ribeirão Preto-SP, (PASSOS et al., 2018), 66.2% no interior Rio Grande do Norte (ALOISE et al., 2017), chegando a mais de 80% em um município rural do estado do Pará (CARMO et al., 2016).

Observa-se que adolescentes apresentam altos índices de soroprevalência para a toxoplasmose, justificando a alta proporção de mulheres jovens em idade fértil com anticorpos específicos contra *T. gondii*. Esta incidência pode ser esclarecida devido a condições precárias de saneamento, exposição ambiental e hábitos inadequados de higiene. O que evidencia que os métodos de prevenção contra a doença, bem como de outras com transmissão fecal-oral, precisam ser implementados desde os anos iniciais do Ensino Fundamental (MACRE et al., 2019).

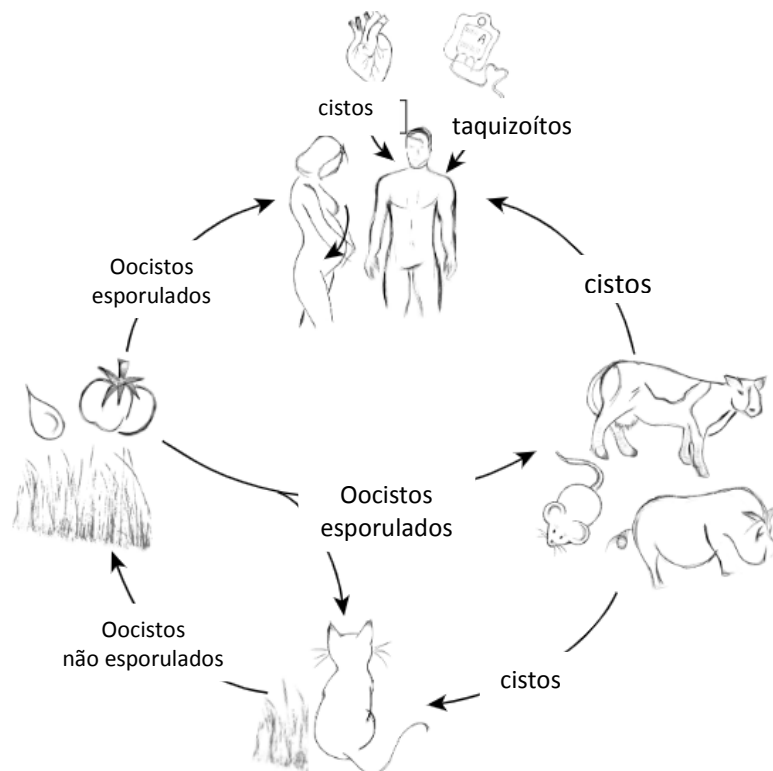


Figura 2. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. Os hospedeiros definitivos (felídeos) eliminam oocistos não esporulados em suas fezes. Oocistos se tornam infecciosos no ambiente após uma fase de esporulação de 1 a 5 dias. Quando infectados, hospedeiros intermediários (animais homeotérmicos) podem abrigar cistos em seus tecidos. Os felídeos se infectam geralmente pela ingestão de cistos presentes nos tecidos de suas presas, mas pode ocorrer também pela ingestão de oocistos maduros do ambiente. Hospedeiros intermediários geralmente são infectados através da ingestão de água ou de vegetais contaminados com oocistos, mas também pode ocorrer pela ingestão de cistos se forem carnívoros. Os seres humanos podem ser infectados pela ingestão de cistos em carne ou oocistos em água ou vegetais, por via transplacentária da mãe para o feto, e por transfusão de sangue ou transplante de órgãos. Adaptado de Dard et al., 2016.

### 1.1.3. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado parasito intracelular obrigatório, pertencente ao filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. É caracterizado pela existência de um flagelo único e do cinetoplasto, uma organela que contém DNA, relacionada ao fornecimento de energia para movimentação do flagelo (BRENE, 1973; PEREZ MOLINA; MOLINA, 2018).

O ciclo de vida do parasito (Figura 3) é heteroxênico, alternando entre o inseto vetor (triatomíneo hematófago) e os hospedeiros reservatórios (incluindo humanos) (GROOM et al., 2017). *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas distintas: tripomastigota, amastigota e epimastigota. A forma tripomastigota não possui capacidade replicativa, e corresponde às formas infectantes extracelulares, localizadas em ambos os hospedeiros (vertebrado e invertebrado). Morfologicamente os tripomastigotas apresentam forma alongada, com cinetoplasto posterior ao

núcleo e o flagelo forma uma extensa membrana ondulante. Os amastigotas correspondem a forma infectante intracelular, assim são encontradas apenas nos hospedeiros vertebrados. Essas formas se caracterizam por apresentar morfologia arredondada ou oval, com a presença de um flagelo curto que não se exterioriza. Já a forma epimastigota é encontrada no trato digestório de triatomíneos. A morfologia dos epimastigotas é alongada, com cinetoplasto justa nuclear e anterior ao núcleo, com flagelo e membrana ondulante disposta lateralmente. O desenvolvimento entre os estágios é um processo complexo, com modificações antigênicas e fisiológicas dependentes da interação com os hospedeiros (BRENE, 1973; DE SOUZA, 1984; NOGUEIRA et al., 2007).

No inseto vetor, as formas epimastigotas (replicativas e não infectivas) se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (não replicativas e infectivas), que são transmitidas ao hospedeiro mamífero, após o repasto sanguíneo. Neste hospedeiro, as formas metacíclicas podem invadir diversos tipos de células nucleadas, transformando-se em amastigotas que sofrem vários ciclos de divisão binária no citoplasma celular. Após 3-5 dias, as formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas no sangue ou nos tecidos adjacentes e podem iniciar um novo ciclo de infecção das células hospedeiras (BRENE, 1973; BARRETT et al., 2003). Além da transmissão mediada por diferentes espécies de insetos triatomíneos popularmente conhecidos como “barbeiros”, a infecção por *T. cruzi* também pode ocorrer por meio de transfusão sanguínea (YOUNG et al., 2007), transplante de órgãos, transmissão vertical (GÜRTLER; SEGURA; COHEN, 2003) e por ingestão de comida ou bebida contaminadas com o inseto ou as fezes do mesmo, infectados (BENCHIMOL BARBOSA, 2006).

*T. cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas (Tripanossomíase Americana). Estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas com *T. cruzi* em todo o mundo, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica, causando incapacidade em indivíduos infectados e mais de 10.000 mortes por ano (WHO, 2019b). No mundo, cerca de 40 milhões de pessoas vivem sob risco de infecção, constituindo assim grande problema de saúde pública (SCHOFIELD; JANNIN; SALVATELLA, 2006; WHO, 2019b).

No Brasil, vários surtos da infecção por *T. cruzi* tem ocorrido nas últimas décadas, principalmente, na região Norte do país. Em 2016 a Divisão de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado de Saúde do Acre (Sesacre) divulgou dados, os quais mostram que, em apenas 7 meses, o número de casos comprovados de Doença de Chagas no Acre aumentou mais de 200% em relação ao registrado durante todo o ano de 2015 (INST.BIO.FIOCRUZ, 2016).



A infecção por *T. cruzi* possui manifestação clínica variável. O início da infecção, chamada de fase aguda, é caracterizada por grande número de parasitos circulantes no sangue que pode perdurar por cerca de 6 a 8 semanas. Nesta fase, os sintomas podem ser moderados ou atípicos como dores no corpo, febre, poliadenia, e mais raramente hepatomegalia, esplenomegalia e insuficiência cardíaca, podendo assim, serem confundidos com diversas outras infecções (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; ANDRADE et al., 2011). Por essa razão a Doença de Chagas não é frequentemente diagnosticada neste estágio (WHO, 2019b). Após a fase aguda, os sobreviventes entram na fase crônica da doença, podendo o indivíduo permanecer na chamada “forma indeterminada” por vários anos ou persistir indefinidamente (PEREIRA NUNES, et al., 2013). A manifestação da forma indeterminada é caracterizada pela positividade de exames sorológicos ou parasitológicos, ausência de sintomas clínicos relevantes, baixa ou nenhuma parasitemia (parasitos ficam ocultos, principalmente no coração, e tubo digestório) (ANDRADE et al., 2011; PEREIRA NUNES, et al., 2013). Dessa forma, pessoas infectadas vivendo em áreas endêmicas constituem importantes reservatórios do parasito, podendo transmitir as formas infectantes para insetos vetores e assim disseminar a doença (CUCUNUBÁ et al., 2016).

Até 20 anos após a infecção, aproximadamente 35% dos pacientes apresentam sinais clínicos característicos da fase crônica da doença de Chagas, como cardiomiopatia ou cardiomegalia, danos no sistema nervoso periférico ou disfunção no trato digestório podendo levar ao desenvolvimento de megacólon e/ou megaesôfago (WHO, 2019b).

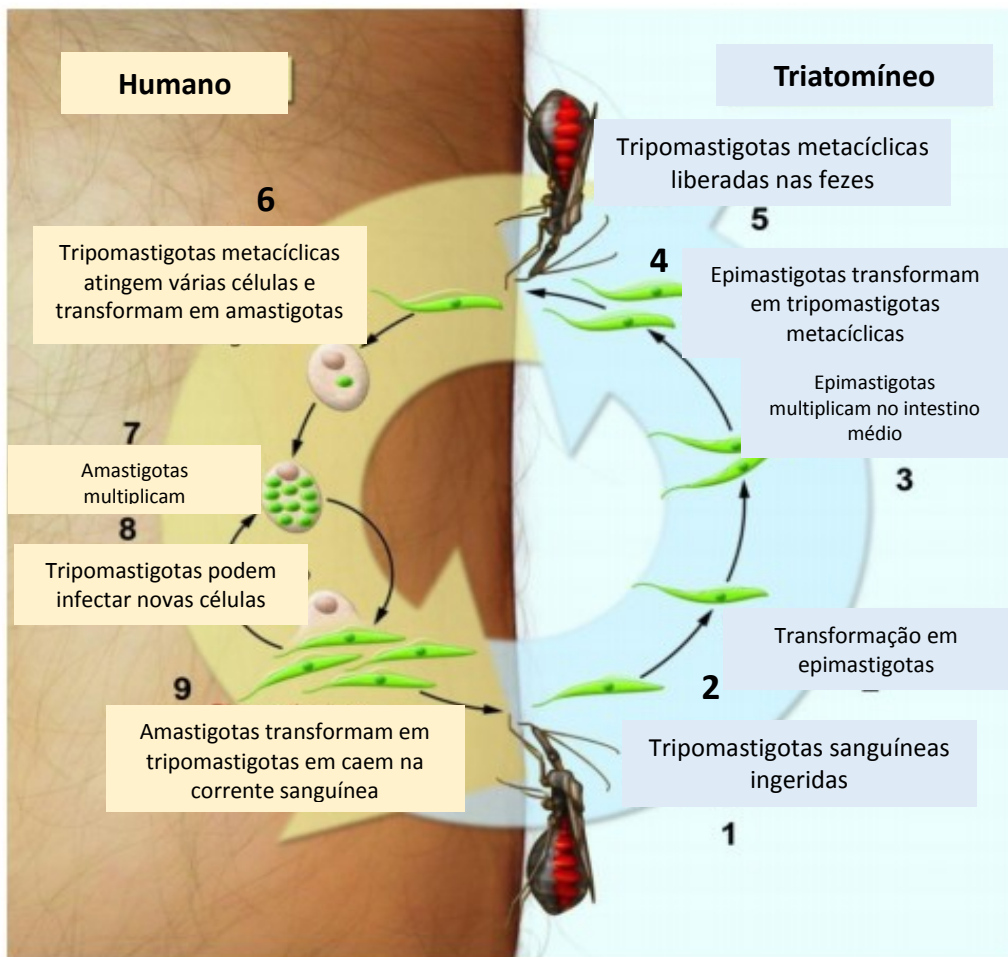


Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. (1) O inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas quando se alimenta de um indivíduo infectado. (2) As formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas que (3) se multiplicam por divisão binária no intestino médio do inseto. (4) No intestino posterior, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (5), que são liberadas nas fezes durante o repasto sanguíneo do barbeiro e penetram no hospedeiro mamífero através de aberturas na pele ou na mucosa, podendo invadir uma variedade de células. Em seguida, as formas tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigotas (6), que multiplicam (7), diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas e rompem a célula, podendo desta forma, invadir novos tecidos (8, 9). Adaptado de Stuart et al., 2008.

## 1.2. Resposta imune e Interação parasito-hospedeiro

### 1.2.1. *Plasmodium falciparum*

Em todo indivíduo infectado por *Plasmodium spp.*, apresentando sintomas ou não, o parasito passa por todas as interações parasito-hospedeiro e todas as mudanças morfológicas do ciclo de vida. As manifestações clínicas e a evolução do parasito vão depender tanto da virulência da espécie de *Plasmodium* quanto da imunidade inata e adquirida do hospedeiro. A doença é então resultado

da exacerbação dessa interação, o que não é benéfico nem para o hospedeiro nem para o parasito (GARRIDO-CARDENAS et al., 2019; MILNER JR, 2018)

Ao infectar o hospedeiro, o parasito modifica a superfície dos eritrócitos, criando um fenótipo cito-aderente que faz com que estas células se liguem ao endotélio, plaquetas ou glóbulos vermelhos não infectados, removendo grande quantidade do parasito da circulação (FAIRHURST; WELLEMS 2006; KRAEMER; SMITH 2006; GRAU; CRAIG 2012).

Poucos estudos tem elucidado os fatores imunológicos da infecção por *Plasmodium* em crianças, as quais são mais susceptíveis à doença. O que se sabe é que em crianças assintomáticas infectadas com *P. falciparum* os níveis de células T e Tregs são comparáveis aos indivíduos não infectados, mas o nível é muito menor quando comparado as crianças infectadas sintomáticas (FRIMPONG et al., 2018). Em adultos, a resposta celular do tipo Th1 parece ser crucial para resolver a infecção. Este mecanismo mediado por células inclui a ativação de células TCD8<sup>+</sup> para inibir o desenvolvimento do parasito no fígado e de macrófagos para aumentar a fagocitose de células vermelhas infectadas (PIERROT et al., 2011).

Indivíduos infectados apresentam células T que proliferam e regulam positivamente a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que parece estar associado a baixos níveis de parasitos no sangue. Enquanto que altos níveis de TNF- $\alpha$ , com baixos níveis de IL-10, foram associados a anemia grave. Em alguns estudos, foi possível observar aumento na produção de citocinas como IFN- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , correlacionado com a diminuição da parasitemia e a incapacidade de gametócitos infectarem o mosquito vetor (NAOTUNNE et al., 1991; KARUNAWEERA et al., 1992; OTHORO et al., 1999).

A imunidade adquirida se desenvolve após exposições repetidas ao parasito, desta forma, a aquisição é mais rápida em áreas com maior taxa de transmissão (MARSH e KINYANJUI, 2006; MUELLER et al. 2013). Anticorpos do tipo IgG parecem estar associados ao aumento da resistência à infecção e do desenvolvimento dos sinais clínicos (STANISIC et al., 2009). Tais anticorpos agem predominantemente contra os estágios assexuais do parasito, incluindo merozoítos que invadem os eritrócitos bem como antígenos expressos na superfície das células infectadas (MUELLER et al. 2013; CHAN; FOWKES; BEESON, 2014).

Os anticorpos contra os estágios sanguíneos do parasito podem agir tanto bloqueando diretamente a invasão e conseqüente multiplicação do parasito, quanto atuando em conjunto com o sistema complemento para inibir a invasão e a lise celular (DUTTA et al. 2009; DUNCAN; HILL; ELLIS, 2012; BOYLE et al. 2015). Além de auxiliar na eliminação de merozoítos através de

mecanismos celulares dependentes de anticorpos e na fagocitose opsônica, reduzindo assim a densidade parasitária e os sinais clínicos (HILL et al. 2013; CHAN; FOWKES; BEESON, 2014; OSIER et al. 2014; FOWKES; BOEUF; BEESON, 2016).

Outros alvos contra *Plasmodium* spp. incluem anticorpos contra esporozoítos pré-eritrocíticos e gametócitos. Porém, evidências sugerem que a aquisição da imunidade contra esta primeira forma evolutiva pode ser limitada (MICHON et al. 2007; TRAN et al. 2013). Já os anticorpos contra gametócitos poderiam prevenir a propagação da infecção entre humanos e o mosquito vetor (BOUSEMA et al. 2006, 2010a,b).

O potencial infeccioso dos gametócitos de *P. falciparum* é influenciado por sua prevalência e densidade, grau de maturidade e resposta imune tanto do mosquito vetor quanto do hospedeiro humano (TARGETT et al., 2001; BOUSEMA et al., 2006, 2010a,b; SCHNEIDER et al., 2007). Além disso, a eficiência da transmissão também depende do nível de infectividade e dose de esporozoítos transmitida (STONE et al., 2016). Quando os gametócitos morrem eles liberam proteínas intracelulares na circulação do hospedeiro (ALANO, 1991; SINDEN, 2010). Tais proteínas funcionam como antígenos, os quais são processados e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), podendo promover resposta imune humoral, que podem bloquear o desenvolvimento do parasito no mosquito (MENDIS et al., 1987; MENDIS; DAVID; CARTER, 1990).

### **1.2.2. *Toxoplasma gondii***

Estima-se que 95% da população mundial esteja infectada com *T. gondii* sem desenvolver nenhum sintoma, pois o sistema imunológico do hospedeiro impede que o parasito cause a doença. No entanto, o parasito permanece em um estado inativo, podendo ser reativado em casos de imunossupressão (WHO, 2015b).

As diferentes formas evolutivas de *T. gondii* causam efeitos distintos nos diferentes hospedeiros, pois diferem bioquímica e celularmente (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; JEROME et al., 1998; FRITZ et al., 2012). Os mecanismos de invasão transcelular ou penetração ativa são bem descritos para *T. gondii*, principalmente para os bradizoítos e esporozoítos, a partir do uso de técnicas de biologia celular e molecular (MORISAKI; HEUSER; SIBLEY, 1995). Sabe-se que os esporozoítos estão presentes em eritrócitos 30 minutos após a infecção, com aumento das vilosidades a nível ultraestrutural (DUBEY et al., 1997; SPEER; DUBEY, 1998; COOMBES et al.,

2013; GREGG et al., 2013). Já a infecção por oocistos, parecem aumentar as células intestinais produtoras de muco (TREVIZAN et al., 2016).

Foram propostas duas vias de como *T. gondii* migra para o tecido epitelial intestinal. A primeira indica uma transmigração paracelular, na qual os parasitos se movem, sem alterar a integridade da barreira, através das junções intercelulares (BETANCOURT et al., 2019). Outra via descrita é pela penetração da membrana celular apical para alcançar a lâmina própria (BARRAGAN; BROSSIER; SIBLEY, 2005; LAMBERT; BARRAGAN, 2010). Para tanto, taquizoitos promovem a perda da polaridade do epitélio intestinal, além de causar alterações no citoesqueleto de actina, ou seja promovem a perda da união das proteínas que compõem a junção de oclusão, garantindo a invasão (BRICEÑO et al., 2016).

Após a infecção das células epiteliais intestinais, os neutrófilos são rapidamente recrutados e infectados pelo parasito, facilitando a disseminação do mesmo para outros tecidos (COOMBES et al., 2013).

A infecção por *T. gondii* ativa a resposta imune humoral e celular do hospedeiro. A resposta imune mediada por células está associada ao desenvolvimento de linfócitos T CD4 e CD8, que produzem principalmente IFN- $\gamma$ , capaz de solucionar a infecção aguda (pois controla o rápido crescimento do parasito) e controlar a infecção crônica (SUZUKI et al., 1988, 1989). Além disso foi observada expressão de interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-12) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) no cérebro e baço de camundongos infectados (HUNTER, et al., 1992; ARSENIJEVIC, et al., 1997; TOSH et al., 2016). É visto ainda que IFN- $\gamma$  aumenta a degradação de triptofano nos fibroblastos, inibindo a replicação do parasito (PFEFFERKORN, 1984). Outro mecanismo de defesa dependente de IFN- $\gamma$  envolve proteínas de ligação ao guanilato, as quais são direcionadas para a membrana do vacúolo parasitóforo, eliminando o parasito a partir da ruptura da membrana vacuolar ou mesmo sem causar danos à mesma (YAMAMOTO et al., 2012; DEGRANDI et al., 2013; SELLECK et al., 2013; JOHNSTON et al., 2016; LIMA; LODOEN, 2019). Além disso, a ubiquitinação do vacúolo também surgiu como um mecanismo chave para o controle do parasito, já que leva à autofagia do mesmo, desordem na multiplicação e sua remoção de células endoteliais (SELLECK et al., 2015; CLOUGH et al., 2016).

A resposta humoral induzida pela infecção resulta em níveis aumentados de anticorpos específicos circulantes. Sendo que IgM e IgA aparecem durante a primeira fase da infecção e diminuem para níveis indetectáveis após algumas semanas, quando a IgG aparece pela primeira vez. Após 2-3 meses essa imunoglobulina diminui constantemente para um nível residual ao longo

da vida. Três meses após a infecção, os níveis de IgE atingem o pico e diminuem rapidamente (MURAT et al. 2015; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Embora o hospedeiro humano desenvolva mecanismos de defesa contra o parasito, *T. gondii* também desenvolveu estratégias para driblar esse sistema imunológico, a fim de manter a produtividade da infecção e conservar um ambiente ideal de replicação. Para tanto, o parasito libera proteínas efetoras que manipulam as vias de sinalização responsáveis pela indução da produção de citocinas (LIMA; LODOEN, 2019). *T. gondii* age na célula hospedeira ativando o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 e 6 (STAT3 e STAT6), a fim de diminuir a produção de IL-12 (SAEIJ et al., 2007). Além de inibir a atividade transcricional do STAT1, dificultando sua reciclagem e outros ciclos de transcrição mediada por STAT1. Isto ocorre devido a capacidade do parasito de inibir a expressão de genes responsivos a IFN- $\gamma$ , bloqueando a dissociação de STAT1 do DNA (ROSOWSKI et al., 2011; ROSOWSKI e SAEIJ, 2012; ROSOWSKI et al., 2014).

Recentemente foi descoberto um fator conservado em *T. gondii*: uma proteína granular densa que se liga a STAT1 ativado no núcleo da célula e também ao complexo Mi2/NuRD (modificador de cromatina), originando em bloqueio da transcrição dependente de IFN- $\gamma$  e uma cromatina alterada, respectivamente (GAY et al., 2016; OLIAS et al., 2016).

Outro mecanismo desenvolvido pelo parasito para evadir do sistema imune do hospedeiro é a desregulação da via NF- $\kappa$ B (responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias). *T. gondii* limita a ativação de NF- $\kappa$ B, por exemplo através da inibição da produção de IL-1 $\beta$  em neutrófilos (SHAPIRA, et al., 2005; LIMA; LODOEN, 2019). Além disso, o parasito também inibe a clivagem e a ativação da caspase-1 em neutrófilos infectados (LIMA; GOV; LODOEN, 2018), porém este mecanismo não é realizado em monócitos (GOV et al., 2013, 2017).

É visto que, mesmo que a infecção induza resposta imune no hospedeiro, o parasito desenvolveu estratégias para preservar o ambiente intracelular, a replicação e evitar a eliminação pela resposta humoral (LIMA; LODOEN, 2019).

### **1.2.3. *Trypanosoma cruzi***

A resposta imune contra *T. cruzi* é uma complexa rede de interação constituída pela imunidade inata e adaptativa, onde a supressão de qualquer aspecto pertencente a cada uma pode resultar na sobrevivência do parasita e conseqüentemente, na cronificação da doença (ESCH; PETERSON, 2013).

Após a entrada no hospedeiro vertebrado, tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* rapidamente infectam macrófagos locais, fibroblastos, células musculares e adipócitos (ESCH; PETERSON, 2013). Além disso, o parasito induz uma intensa resposta inflamatória que possui um papel crucial na patogênese da doença com recrutamento de células NK (*natural killer*), macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B (BASSO, 2013).

Um evento crítico durante o período inicial da doença é a resposta imune inata mediada por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como, os macrófagos e as células dendríticas. O reconhecimento de *T. cruzi* por estes tipos celulares ocorre através dos numerosos receptores *Toll-like* (TLRs), tais como, TLR2 e TLR9, presentes nestas células que reconhecem glicoconjugados de membrana do parasito e/ou DNA e assim tornam-se ativadas (OUAISSI et al., 2002; BAFICA et al., 2006). Após ativação, estas células secretam citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, expressam receptores co-estimulatórios, e aumentam a endocitose e morte intracelular do parasita através da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (BASSO, 2013; CUNHA -NETO; CHEVILLARD, 2014).

Inicialmente, macrófagos ativados produzem IL-12, que atua nas células NK induzindo a produção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez aumenta a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO (óxido nítrico) nos macrófagos, contribuindo assim para a eliminação de *T. cruzi*. No mesmo momento, ambas as células sintetizam citocinas reguladoras, tais como, IL-10 e IL-4, afim de reduzir os efeitos nocivos da resposta imune exacerbada (SATHLER-AVELAR et al., 2009). Assim, os macrófagos além de terem um papel indispensável na resposta imune primária, eliminando o parasito, participam do processo de homeostase tecidual, controlando a intensidade da resposta inflamatória.

Após 15 dias de infecção, inicia-se a imunidade humoral com a ativação policlonal de linfócitos B e a hipergamaglobulinemia, principalmente de IgM (ANTAS et al., 1999). Diferentes isotipos de imunoglobulinas, principalmente da classe IgG, estão envolvidos na eliminação local e sistêmica do parasito através de mecanismos como fixação do complemento, aglutinação e citotoxicidade. Assim, o papel protetor dos anticorpos na eliminação de *T. cruzi* está associado à capacidade de reconhecerem antígenos do parasito, formarem agregados que fixam o complemento, aumentarem a opsonização e os mecanismos citotóxicos (TAKEHARA; MOTA, 1991).

APCs, tais como, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B têm um papel essencial na geração de linfócitos T efetores, que produzem diferentes citocinas envolvidas na polarização das respostas imunes Th1 ou Th2 (TARLETON, 2015). Células Th1 são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto células Th2 possuem função anti-inflamatória e são

envolvidas na resposta mediada por anticorpos (BASSO, 2013). A produção adequada de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-18, é essencial ao controle da infecção promovida por *T. cruzi*. Já a citocina IL-17 e as células T regulatórias (Treg) controlam a resposta imune exacerbada na doença de Chagas, já que regulam a diferenciação de células de perfil Th1, o recrutamento de células inflamatórias e a miocardite induzida pelo parasito no tecido cardíaco (MARIANO et al., 2008; GUEDES et al., 2010).

As características da fase aguda são o resultado do controle parasitário realizado pelas respostas imune humoral e celular e pela interação de suas citocinas. Entretanto, a defesa do hospedeiro contra *T. cruzi* pode diminuir ao longo do tempo ou ser suprimida por elementos provenientes do próprio parasito. Esta imunossupressão inespecífica que ocorre durante os primeiros estágios de infecção e a capacidade do parasito em se adaptar e evadir desta resposta, impede a completa erradicação parasitária, resultando na fase crônica da doença (CARDOSO; CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016).

Embora o estágio agudo da infecção por *T. cruzi* seja geralmente controlado por uma resposta imune altamente eficaz, esta não é capaz de excluir totalmente o parasito, resultando em uma infecção crônica ao longo da vida do hospedeiro (GROOM; PROTOPAPAS; ZOCHIOS, 2017).

Na fase crônica, caracterizada pela patologia cardíaca, a intensa resposta inflamatória é observada e relacionada à altos níveis das citocinas de perfil Th1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (ABEL et al., 2001; ABEL et al., 2014). Tal resposta é atribuída à ação direta do parasito e/ou à reações autoimunes induzidas por *T. cruzi* no tecido (BASSO, 2013).

### **1.3. Tratamento e vacina contra parasitos intracelulares**

#### **1.3.1. Malária**

A primeira droga utilizada para o tratamento da malária foi o quinino, através de lenta infusão intravenosa. Porém este medicamento apresenta várias desvantagens incluindo meia-vida curta e dolorosas reações locais após administração, além de poder causar efeitos adversos ao paciente como hipoglicemia, hiperinsulinemia, cardiotoxicidade e hipotensão (WHO,1990; BOULOS et al., 1997; LOOAREESUWAN et al., 2002; WHO 2014).

Após o aparecimento de cepas resistentes a diversas drogas, o tratamento da infecção por *Plasmodium* sp. tornou-se ainda mais difícil, fazendo-se necessário o uso de drogas alternativas.



Diante disto, derivados de artemisininas passaram a ser utilizados no tratamento da malária (ALECRIM et al., 2000).

Atualmente, a utilização de artesunato intravenoso é o tratamento imediato indicado em todos os indivíduos com malária grave em todo o mundo (WHO, 2015). A droga apresenta vantagens por matar o parasito no estágio inicial, antes de atingir a microvasculatura (UDOMSANGPETCH et al., 1996). Após um período de administração mínima de 24 horas com artesunato, o tratamento deve ser concluído com derivados de artemisinina via oral, os quais são eliminados mais lentamente (WHO, 2015; PLEWES et al., 2019). Entre as desvantagens do tratamento com artemisinina estão a necessidade de combinação de drogas, bem como a dificuldade de adesão aos regimes longos de tratamento.

Ainda não foi desenvolvida uma vacina eficaz contra *Plasmodium*, possivelmente devido ao complexo ciclo de vida e variabilidade genética do parasito, pouco conhecimento sobre as respostas imunes desencadeadas pelo mesmo e por falta de modelos experimentais adequados (GARRIDO-CARDENAS et al., 2019).

Além de não existir vacina eficaz contra a malária, têm-se observado cepas de *P. falciparum* no sudeste da Ásia, na África e em algumas regiões da América Central resistentes a vários medicamentos. Bem como cepas resistentes de *P. vivax* em países endêmicos como Nova Guiné, Grécia, Tailândia, Índia e Indonésia (KLEMOLA, 1988; GETHING et al., 2012; GONCALVES et al., 2014; WAHEED et al., 2015). Estudos indicam que *P. falciparum* geneticamente distintos (em relação a enzimas, sensibilidade a drogas e padrões cromossômicos) que infectam o mesmo hospedeiro podem sofrer recombinações genéticas durante a reprodução sexuada, levando ao desenvolvimento de parasitos geneticamente resistentes a condições desfavoráveis e a medicamentos (WALLIKER et al., 1987; CONWAY et al., 1999; MU et al., 2005; BRIGHT et al., 2014; MILES et al., 2016).

Por outro lado, a transferência passiva de soro com anticorpos contra *Plasmodium* em crianças com malária, reduziu a parasitemia e os sintomas na maioria dos indivíduos, demonstrando que anticorpos específicos podem controlar efetivamente o número de hemácias parasitadas, embora mecanismos precisos não tenham sido esclarecidos (COHEN; MC; CARRINGTON, 1961; AKTER et al., 2019).

### **1.3.2. Toxoplasmose**

Desde 1995, o tratamento para toxoplasmose aconselhado pela Organização Mundial da Saúde foi a combinação de primetamina com uma sulfonamida (geralmente sulfadiazina), que agem para matar os taquizoítos. Porém, é preciso que os pacientes se mantenham bem hidratados, pois a sulfadiazina é pouco solúvel na urina e as sulfonamidas mais solúveis parecem ser menos eficazes (WHO, 1995).

Os poucos tratamentos contra a doença ainda consistem na combinação das duas drogas supracitadas. Porém, estes medicamentos podem falhar no tratamento da encefalite toxoplasmática e coriorretinite, devido à intolerância, baixa absorção ou resistência do parasito (BAATZ H et al., 2006; MENECEUR et al., 2008; DOLIWA et al., 2013; SPALENKA et al., 2018). Além disso, esta terapia pode causar hipersensibilidade, supressão da medula óssea e efeitos teratogênicos (PETERSEN, 2007).

O tratamento da doença é indicado para grávidas e indivíduos imunocomprometidos (MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Em mulheres infectadas durante a gravidez, tem sido utilizada espiramicina para prevenir a infecção fetal (KAYE, 2011). Caso ocorra a infecção fetal, a mãe deve ser tratada com uma combinação de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico (MONTOYA; REMINGTON, 2008; ANTCZAK; DZITKO; DŁUGOŃSKA, 2016). Tais drogas são altamente utilizadas, porém causam efeitos adversos devido sua toxicidade, além disso, podem não ser capazes de reduzir o parasitismo, pois o parasito já se mostrou resistente em estudos *in vitro* (KAYE, 2011; MONTOYA; REMINGTON, 2008; MENECEUR, et al., 2008).

Alguns estudos recentes têm investigado a utilização de azitromicina para tratar a toxoplasmose congênita e demonstraram que há redução na replicação do parasito após o tratamento, sem efeitos aparentes às células (COSTA, et al., 2009; FRANCO, et al., 2011; RIBEIRO et al., 2017). Porém, mais estudos devem ser realizados a fim de confirmar a eficácia e vantagens da utilização desta droga.

O tratamento da toxoplasmose é difícil, visto que os medicamentos disponíveis apresentam efeitos colaterais graves e a reativação do parasito pode ocorrer a qualquer momento (MONTOYA; LIESENFELD, 2004; SERRANTI; BUONSENSO; VALENTINI, 2011). Diante disto, uma vacina eficaz contra a toxoplasmose é de grande importância.

Atualmente não existe vacina licenciada disponível para uso em humanos. A única vacina comercial disponível é licenciada apenas para evitar infecção congênita em ovelhas (BUXTON; INNES, 1995). Porém é uma vacina cara, possui curto prazo de validade e causa efeitos adversos.

Além disso, esta vacina não é indicada para uso em humanos, pois a cepa utilizada (S48) pode reverter para uma cepa patogênica (KUR et al., 2009).

Diante deste contexto, vários estudos têm sido realizados em animais para avaliar os efeitos imunológicos de vacinas contra toxoplasmose, incluindo vacina ativada, atenuada, de subunidade, geneticamente modificada e de DNA. Os resultados das pesquisas indicam que é possível desenvolver uma vacina eficaz contra a doença (LIU; SINGLA; ZHOU, 2012).

### **1.3.3. Doença de Chagas**

Atualmente, o tratamento da doença de Chagas é baseado na utilização de dois agentes terapêuticos, o Benzonidazol e o Nifurtimox, eficazes apenas se empregados durante a fase aguda da doença para a eliminação do parasito. Sem eles, a persistência parasitária ao longo da vida é mantida e a doença progride para a fase crônica, estágio no qual a grande maioria dos pacientes é diagnosticada e os tratamentos não são eficazes (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017). O tratamento também é indicado para aqueles em que a infecção foi reativada (por exemplo em imunossuprimidos), para crianças com infecção congênita e para os pacientes durante a fase crônica precoce. Adultos infectados, especialmente os assintomáticos, devem ser tratados já que o tratamento antiparasitário pode prevenir ou parar a progressão da doença (WHO, 2019b).

Porém, um número crescente de linhagens de *T. cruzi* resistente a essas drogas tem sido relatado, com poucos pacientes responsivos ao tratamento (URBINA; DOCAMPO, 2003; WILKINSON et al., 2008; MOLINA-GARZA et al., 2014; Maguire, 2015; KANSIIME et al., 2018). Além disso, as drogas existentes apresentam alta toxicidade, manifestada no fígado e reações alérgicas, principalmente após administração a longo prazo. Assim, os benefícios potenciais da medicação em prevenir ou retardar o desenvolvimento da doença de Chagas devem ser avaliados em relação a longa duração do tratamento (30 – 60 dias) e as possíveis reações adversas, que ocorrem em até 40% dos pacientes tratados. Estes fármacos são contra-indicados para mulheres gestantes e para pessoas com insuficiência renal ou hepática (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017).

Cento e onze anos após a descoberta da doença, do agente etiológico e do ciclo de vida completo do parasito por Carlos Chagas, não existem ferramentas para combater efetivamente o patógeno, sendo que o método mais eficaz de prevenção ainda é o controle vetorial, embora a triagem dos bancos de sangue tenha reduzido substancialmente a transmissão de *T. cruzi* por

transfusão sanguínea e transplante de órgãos (VÁZQUEZ-CHAGOYÁN; GUPTA; GARG, 2011; ESCH; PETERSEN, 2013; DUMONTEIL et al., 2012).

Há décadas não são produzidos novos fármacos que apresentem maior eficácia e menores efeitos colaterais, embora vários estudos estejam sendo realizados com este intuito. Além disso, até o momento, nenhuma vacina está disponível para a prevenção da doença (BENZIGER; DO CARMO; RIBEIRO, 2017; WHO, 2019b).

#### 1.4. Glicosilfosfatidilinositol

Glicosilfosfatidilinositol (GPI) é um complexo glicolípídico, o qual ancora diversas proteínas e glicoproteínas por meio de sua porção C terminal à membrana celular (FERGUSON; WILLIAMS, 1988; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993; FERGUSON, 1994). As chamadas âncoras GPI são ubíquas entre eucariotos, tendo sido descritas nos gêneros *Plasmodium* (NAIK et al., 2000; DELORENZI et al., 2002), *Toxoplasma* (TOMAVO et al., 1989), *Trypanosoma* (SERRANO et al., 1995; FERGUSON et al., 1999) e *Leishmania* (Mcconville et al., 1990; ILGOUTZ et al., 1999), bem como em leveduras e mamíferos (PITTET; CONZELMANN, 2007; ORLEAN; MENON, 2007). Apesar de ser onipresente, as GPIs estão em concentrações extremamente baixas nas membranas plasmáticas da maioria dos organismos, exceto nos protozoários parasitas, nos quais são muito abundantes (IKEZAWA, 2002; MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

GPIs possuem um núcleo glicano (GlcN) conservado ligado ao fosfatidilinositol (PI) entre todas as espécies de eucariotos. Entretanto, são observadas variações nas cadeias laterais adicionadas às âncoras de GPI, dependendo da espécie e da proteína ancorada (FUJITA; KINOSHITA, 2010). Em cada caso, a porção C terminal da proteína é ligado via fosfoetanolamina ao núcleo glicano com a sequência de três manoses, que por sua vez está ligado ao PI (Figura 4) (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993). Por exemplo, os parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* possuem grande similaridade em suas GPIs, e basicamente possuem uma única diferença num grupamento acil da porção lipídica (GOWDA, 2002).

Nas âncoras GPI de *T. cruzi*, um quarto resíduo de manose é adicionado ao núcleo glicano. Além disso, a âncora GPI deste parasito pode apresentar variações na estrutura, como adição de  $\beta$ -D-galactofuranose ( $\beta$ Gal $f$ ), 2-aminoetilfosfonato (2-AEP) e modificações na composição lipídica, dependendo da cepa ou do estágio de vida do parasito (PREVIATO et al., 1995). Enquanto que em

GPI de *Toxoplasma* sp. foi relatada uma modificação, com um resíduo de N-acetilgalactosamina (GalNAc) ligada à terceira manose (AZZOUZ et al., 2006).

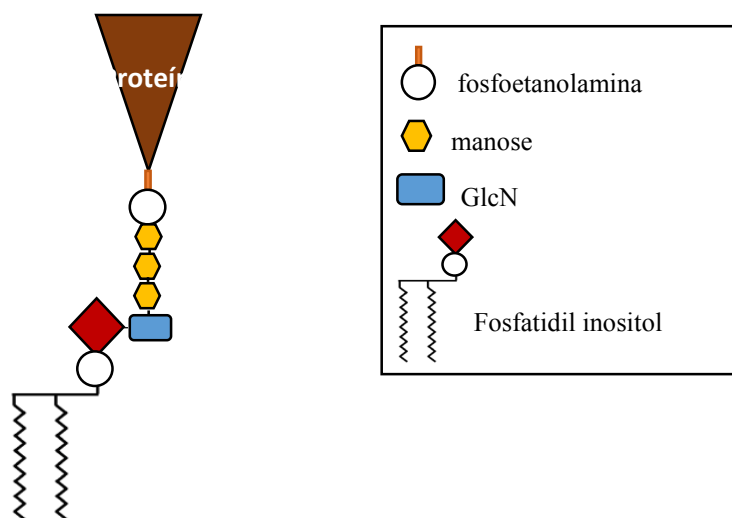


Figura 4. Estrutura conservada da âncora GPI de eucariotos. Apresentando um núcleo glicano (GlcN) conservado ligado ao fosfatidilinositol (PI). Adaptado de Previato et al. (1995).

De acordo com estudos, GPIs são tão ativos quanto lipopolissacarídeos de bactérias e lipopeptídeos de *Mycoplasma*, o que os coloca entre as mais importantes moléculas pro-inflamatórias microbianas conhecidas (ALMEIDA et al., 2000). Apesar desse tipo de âncora não ser exclusiva aos protozoários, estes parecem usá-la com muito mais frequência do que os eucariontes superiores, apresentando diferenças funcionais significativas entre esses grupos de organismos (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993). Em diferentes parasitos intracelulares, estas moléculas estão envolvidas em dois aspectos fundamentais da interação parasito-hospedeiro: a invasão de células e a evasão da resposta imune do hospedeiro (YOSHIDA, 2006; ALVES; COLLI, 2008). Desempenhando um papel crucial na sobrevivência e infectividade do parasito (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

GPIs de *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, têm sido identificados como potentes indutores de moléculas inflamatórias, como NO, IL-12 e TNF- $\alpha$ , quando apresentadas a macrófagos (NAIK et al., 2000). Assim como GPI de *T. gondii* induz a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003). Além disso, estudos prévios apresentaram GPIs de *Plasmodium falciparum* como importantes fatores de patogenicidade da malária, baseado na capacidade dessas moléculas de induzir citocinas em macrófagos e células endoteliais e causar sintomas de infecção aguda em animais experimentais (NAIK et al., 2000).

É visto que GPIs são comprovadamente fatores de patogenicidade em *Plasmodium falciparum* (NAIK et al., 2000), *Toxoplasma gondii* (DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003), *Trypanosoma cruzi* (GARG et al., 1997; ALMEIDA et al., 2000) e *Leishmania* sp (ILGOUTZ et al., 1999). E tem sido demonstrado que pessoas que vivem em áreas endêmicas para malária, apresentam uma resposta IgG específica para GPI de *Plasmodium falciparum*. Embora adultos e crianças mais velhas apresentem níveis elevados de anticorpos, crianças suscetíveis não possuem ou apresentam níveis muito baixos de anticorpos. Além disso foi verificada ausência de anticorpos anti-GPI em pacientes com febre e anemia, sugerindo que os anticorpos promovem proteção contra as formas clínicas da malária (NAIK et al., 2000). Desta forma, GPI se torna importante candidato a alvo para produção de moléculas a serem utilizadas em alternativas terapêuticas contra doenças parasitárias.

### **1.5. Phage display**

*Phage display* é uma técnica eficiente para identificar peptídeos ou proteínas que se ligam a outras moléculas com diversas aplicabilidades, como desenvolvimento de imunoterápicos e vacinas para diferentes enfermidades (AGHEBATI-MALEKI et al., 2016; WANG; LIN; LV, 2019). A tecnologia é baseada no princípio de que polipeptídeos podem ser expressos na superfície de bacteriófagos filamentosos pela inserção de um segmento de DNA codificante no genoma dos mesmos, de modo que o peptídeo ou proteína expressado fique exposto na superfície da partícula viral fusionado a uma proteína viral naturalmente expressa no bacteriófago (SMITH, 1985; RUIZ et al., 2015).

A possibilidade de expressão de uma proteína de fusão no capsídeo de bacteriófagos, de maneira acessível ao reconhecimento por um ligante, demonstrada em 1985 por Smith, abriu caminho para a construção de bibliotecas conformacionais apresentadas na superfície destas partículas virais (SMITH, 1985).

Os bacteriófagos M13, utilizados na técnica, possuem uma fita simples de DNA envolta por uma capa proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) (Figura 5). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2.800 cópias da pVIII e três a cinco cópias da pIII (RUSSEL, 1991). Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas da cápsula proteica do fago (BRATKOVIČ, 2009). A pIII é a mais utilizada na técnica de *Phage display* pois, devido à sua

baixa representatividade em relação à pVIII, as bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados na pIII são mais indicadas para a descoberta de ligantes com alta afinidade (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

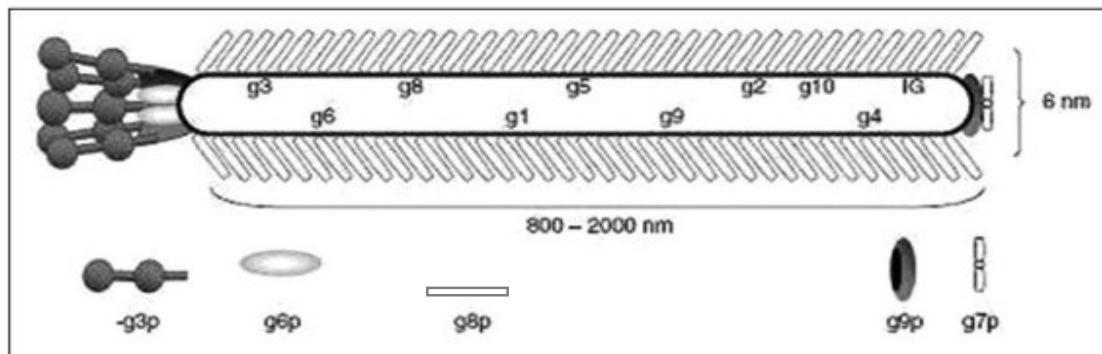


Figura 5. Esquema representativo de um bacteriófago filamentosso, o qual infecta uma variedade de bactérias Gram-negativas, frequentemente *Escherichia coli* do gênero masculino, utilizando o *pilus* sexual do receptor. Esse vírus apresenta DNA de fita simples envolto por uma capa proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Garg, 2019.

Uma das vantagens do uso do bacteriófago é que eles não geram uma infecção lítica em *Escherichia coli*, mas preferencialmente induzem um estado no qual a bactéria infectada produz e secreta partículas de fago sem sofrer lise (TIKUNOVA; MOROZOVA, 2009).

Visando a abreviação do tempo requerido para seleção de populações moleculares compostas pelo maior número possível de variantes, desenvolveu-se a construção de bibliotecas conformacionais, que são definidas como uma população de ligantes em potencial, composta por (bio)moléculas de formas variáveis. Cada membro da biblioteca apresenta uma forma distinta, que determinará a capacidade de interação deste com a molécula alvo. Quanto maior o número de formas representadas na biblioteca, mais facilmente será encontrado um ligante afim (POSNER et al., 1994).

A seleção de sequências baseada na afinidade de ligação do fago a uma molécula alvo é feita por um processo de seleção *in vitro* denominado *biopanning*. O *biopanning* (Figura 6) consiste na incubação da biblioteca de peptídeos ou proteínas expostos em fagos contra o alvo. Os fagos não ligantes ou menos específicos são eliminados por lavagens sucessivas e os fagos específicos permanecem ligados para posterior eluição. O *pool* de fagos específicos é amplificado para os ciclos posteriores de seleção. Após três ou quatro ciclos de seleção os clones individuais são caracterizados por sequenciamento de DNA e *Ensaio de Imunoabsorbância Enzimática* (ELISA) (SMITH, 1985).

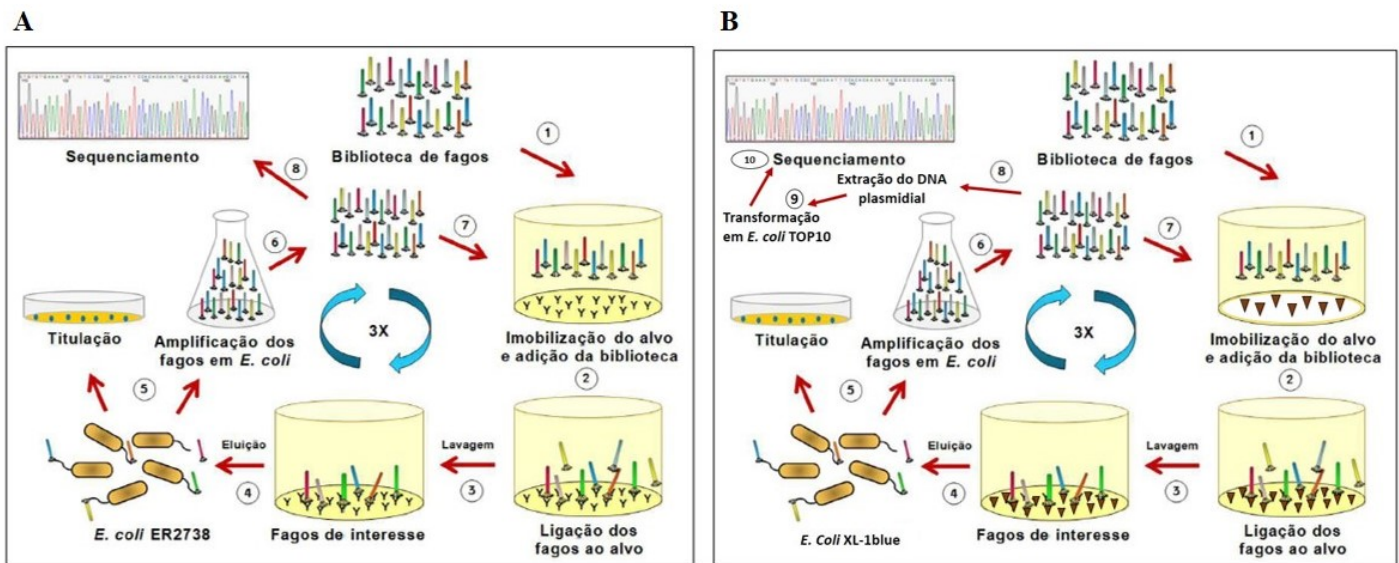


Figura 6. Esquema representativo do processo de *Biopanning* para seleção de peptídeos (A) e anticorpo (B). Em A, a biblioteca de fagos (1) é adicionada ao alvo imobilizado (2). Os fagos que não se ligarem serão retirados por lavagens sucessivas (3), assim os fagos de interesse (que se ligaram ao alvo) são eluídos (4), titulados (5) e amplificados em *E. coli* ER2738 (6), os quais serão utilizados para um novo ciclo (7). Após três ciclos de seleção, o DNA dos fagos são extraídos e sequenciados (8). Em B, o processo se distingue quando os fagos eluídos são amplificados em *E. coli* XL1-blue (6) e, após o último ciclo de seleção, as bactérias *E. coli* XL1-Blue infectadas são utilizadas para extração do DNA plasmidial (8) e posterior transformação em bactérias *E. coli* TOP10 (9).

A técnica de *Phage Display* tornou-se um método alternativo para o estudo de interações moleculares, incluindo interações antígeno-anticorpo. Sabe-se que epítopos lineares, bem como mimetopos que imitam epítopos descontínuos de um antígeno, podem ser identificados por rastreamento de bibliotecas de fagos com anticorpos monoclonais ou policlonais (COSTA et al, 2014; TOLEDO-MACHADO et al, 2015). Este método possui vantagens devido a ligação direta que existe entre o fenótipo experimental e o genótipo encapsulado, mostrando a evolução dos ligantes selecionados até moléculas otimizadas (AZZAZY; HIGHTSMITH, 2002). Além disso, é uma técnica que não requer equipamentos especiais, tem possibilidade de realizar seleção *in vitro*, é rápida e apresenta um elevado número de peptídeos e proteínas diferentes que podem ser expressos (WILLATS, 2002).

### 1.6. *Single-chain variable fragment* (scFv) como proposta terapêutica

Uma alternativa terapêutica no combate de diversas doenças é a construção de moléculas recombinantes de anticorpos artificiais que são normalmente produzidos na forma de fragmentos polipeptídicos, com capacidade de se comportarem de forma idêntica ao anticorpo original (ZHOU et al., 2017). A forma mais utilizada nesse contexto é o fragmento variável de cadeia única de



anticorpo (*single-chain variable fragment*; scFv), que contém os domínios variáveis das cadeias leves e pesadas unidas por um peptídeo conector (*linker*), e apresentam peso molecular de cerca de 30 kDa (BARBAS; BURTON; SCOTT, 2001; AHMAD et al. 2012).

Esse tipo de engenharia tornou-se possível devido a divisão dos anticorpos em subunidades funcionais, que podem ser combinados artificialmente para criar novas moléculas, gerada pela estrutura em domínio dos anticorpos. Nesse sentido, tornou-se peça chave no tratamento de diversas doenças, o desenvolvimento de novas imunoglobulinas recombinantes, visto que, a sua especificidade característica faz com que elas atuem em um alvo específico, elevando a eficácia do tratamento (AHMAD et al., 2012).

Os scFvs têm sido utilizados no diagnóstico e imunoterapia de diversos tipos de câncer, doenças virais e parasitárias, e têm mostrado vantagens sobre anticorpos monoclonais e convencionais (VUKOVIC et al., 2002; BAKHSHINEJAD; SADEGHIZADEH, 2014; CHEN et al., 2017; KESSLER et al., 2017; WANG; LIN; LV, 2019).

A utilização dessas moléculas tem apresentado certas vantagens em relação à utilização de uma molécula de anticorpo inteira em aplicações terapêuticas: a) os fragmentos menores permitem a penetração de forma mais rápida e uniforme em tumores e outros tecidos em comparação com os anticorpos inteiros, b) apresentam circulação sanguínea rápida. Estudos anteriores demonstraram que pacientes tratados com scFv apresentavam boa localização das moléculas em apenas uma hora após a sua injeção; c) boa penetração nos tecidos; d) baixa retenção nos rins e outros órgãos não-alvo; e) maior facilidade de manipulação gênica, por tratar-se de uma construção monocistrônica; f) custo comercial baixo em grande escala de produção; g) podem ser acoplados com drogas e radionuclídeos, a fim de resultar em baixa exposição do tecido saudável (AHMAD et al., 2012; WANG; LIN; LV, 2019).

É visto que, as âncoras GPI estão envolvidas em muitos aspectos da interação parasito-hospedeiro, além de serem capazes de induzir resposta inflamatória. Neste contexto, GPI se torna importante candidata a alvo para a seleção de clones de scFv, os quais poderão ser utilizados como alternativas terapêuticas contra doenças. Desta forma, o presente trabalho propôs selecionar e caracterizar fragmentos (scFv) de anticorpo monoclonal selecionado frente a GPI de *Plasmodium falciparum*, e avaliar sua capacidade em neutralizar a invasão e replicação celular do parasito. Interessantemente, vimos que tais fragmentos de anticorpos também são capazes de neutralizar *T. cruzi* e *T. gondii* em ensaios *in vitro*, sendo assim essa investigação explora as ligações de um scFv

específico, contra diferentes parasitos e seu potencial de neutralização da infecção, o que será mostrado a seguir.

### **1.7. Peptídeos recombinantes como alternativa vacinal**

Como alternativa vacinal para o combate de diversas doenças, têm-se observado a utilização de peptídeos miméticos a epítomos ou determinantes antigênicos de patógenos (regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos). Tais moléculas também podem ser identificadas através da metodologia de *Phage display* utilizando bibliotecas de peptídeos apresentados em fagos, a qual tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade de uma infinidade de enfermidades, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e auto-imunes (STEPHEN; HELMINEN; LANE, 1995).

As bibliotecas de peptídeos randômicos, utilizadas nessa metodologia, compreendem um vasto número de peptídeos, os quais possuem sequências geradas aleatoriamente por uma variedade de resíduos de aminoácidos em cada posição. Os peptídeos expressos, em forma linear ou circular, são capazes de mimetizar estruturas conformacionais e epítomos contínuos ou descontínuos (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002). Essas bibliotecas podem ser adquiridas comercialmente o que garante melhor manutenção da variabilidade.

Pequenos peptídeos que se ligam especificamente a um sítio de ligação do alvo e que mimetizam o epítomo natural sem apresentar similaridade com a sequência original de aminoácidos do alvo são conhecidos como mimetopos. Esta definição também abrange os casos em que o ligante natural não seja proteínas (SMITH e PETRENKO, 1997).

Quando o alvo utilizado para uma seleção por afinidade é um anticorpo, os peptídeos selecionados a partir de bibliotecas de peptídeos randômicos são chamados miméticos antigênicos dos epítomos naturais correspondentes ao determinante antigênico que provoca a seleção específica. Quando esses peptídeos são usados para imunizar animais *naive*, alguns são capazes de gerar novos anticorpos que apresentam reatividade cruzada com o epítomo natural, mesmo sem nunca haver contato prévio direto com o alvo. Tais peptídeos são considerados miméticos imunogênicos bem como miméticos antigênicos (FOLGORI et al, 1994; PASQUALINI; KOIVUNEN; RUOSLAHTI, 1995; SMITH; PETRENKO, 1997; CARDOSO et al., 2009).

Os miméticos antigênicos apresentam vantagens sobre os antígenos naturais pois são produzidos de forma mais simples e mais barata, além da possibilidade de enfatizar uma especificidade em particular. Possibilitando assim, o desenvolvimento de testes de diagnóstico mais

específicos, além de poderem ser utilizados como componentes de vacinas (SMITH; PETRENKO, 1997; PRUDENCIO et al., 2009).

A possibilidade do uso de peptídeos obtidos através do mapeamento de epítomos apresenta grande potencial para a formulação de vacinas sintéticas. Já que miméticos antigênicos, que também são miméticos imunogênicos, apresentam potencial vacinal por serem protetores e capazes de gerar anticorpos reativos a um epítomo natural do patógeno (SMITH; PETRENKO, 1997).

Desta forma, a seleção e caracterização de peptídeos recombinantes (ou mesmo sintetizados quimicamente) induziria uma resposta imunológica e protetora contra a infecção, com fins vacinais e de diagnóstico.

# Objetivos

## **2.1. Desenvolvimento de fragmento de anticorpo anti-GPI**

### **2.1.1. Objetivo Geral**

Avaliar o potencial protetor de clones de scFv selecionados contra GPI de *P. falciparum*, em infecção *in vivo* por *P. berghei*-ANKA GFP+ e *in vitro* por *T. gondii* e *T. cruzi*.

### **2.1.2. Objetivos específicos**

- Selecionar e caracterizar moléculas de scFv, obtidas por *Phage Display*, frente a GPI purificado de *P. falciparum*;
- Avaliar a reatividade das moléculas de scFv selecionadas a diferentes parasitos protozoários (*P. falciparum*, *T. cruzi* e *T. gondii*), por meio de ensaios de ELISA;
- Determinar a dose de tratamento de scFv, através de teste de viabilidade celular;
- Avaliar, *in vitro*, o efeito das moléculas de scFv no processo de invasão celular, utilizando parasitos previamente tratados com a fração de anticorpo selecionada;
- Monitorar a parasitemia em camundongos C57 BL/6 infectados com *P. berghei*- cepa ANKA, previamente tratados ou não com scFv selecionado;
- Avaliar a taxa de mortalidade de modelos murinos previamente infectados com *P. berghei*- cepa ANKA, tratados ou não com o clone scFv selecionado;

## **2.2. Desenvolvimento de peptídeos ligantes de scFv anti-GPI**

### **2.2.1. Objetivo Geral**

Selecionar peptídeos antigênicos miméticos à molécula GPI de *P. falciparum* a partir do clone de scFv selecionado na proposta terapêutica, para futuramente serem utilizados em uma formulação vacinal.

### **2.2.2. Objetivos específicos**

- Selecionar e caracterizar peptídeos miméticos ao GPI de *P. falciparum*, obtidos por *Phage Display*, utilizando o clone de scFv como alvo;
- Avaliar a reatividade dos clones de fagos selecionados ao scFv (G7);
- Avaliar a capacidade dos clones de fagos em diferenciar soro de camundongos infectados com *P. berghei*- cepa ANKA.

## **Material e Métodos**

## DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTO DE ANTICORPO ANTI-GPI DE *P. falciparum*

### 3.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados em animais foram autorizados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) sob número de protocolo 153/16. Os animais foram mantidos na Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

### 3.2. Seleção de scFv ligante a GPI de *Plasmodium falciparum*

Para seleção de clones de scFv, foram utilizadas moléculas de GPI de *P. falciparum* previamente purificadas (NAIK et al., 2000). De maneira simplificada,  $3 \times 10^6$  parasitos foram submetidos à três ciclos de extração com 15 mL de clorofórmio/metanol (2:1, v/v). O sedimento foi extraído cinco vezes com 10 mL de clorofórmio/metanol/água (10:10:3, v/v/v), seco e então adicionado n-butanol 9%. A camada orgânica foi seca e o resíduo foi extraído com n-propanol aquoso a 80%.

A seleção das frações de anticorpos foi realizada utilizando uma biblioteca de fagos contendo aproximadamente  $2 \times 10^6$  sequências combinatórias de scFv, desenvolvida em nosso laboratório, por CARNEIRO et al., 2014. Foram realizados dois ciclos de seleção, sendo precedidos pela reamplificação da biblioteca de scFv em *Escherichia coli* XL1-Blue competentes e infecção do fago auxiliar VCSM13 para a montagem e replicação das proteínas virais (BARBAS; BURTON; SCOTT, 2001). Um poço de uma placa de microtitulação (*Nunc MaxiSorp™*, eBioscience, San Diego, CA, EUA) foi sensibilizado com 50  $\mu$ L de GPI de *P. falciparum* em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 8,6) e incubado por 18 horas a 4°C. O poço foi então bloqueado com 250  $\mu$ L de PBST 0,05%/BSA 5% [salina tamponada com fosfato acrescida de Tween 20 0,05% (v/v) e soro albumina bovina 5% (p/v)] durante 1 hora a 37°C, e lavado três vezes com PBS. Em seguida, 100  $\mu$ L da biblioteca de fagos-scFv foram adicionados ao poço e a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Posteriormente, o poço foi lavado 10 vezes com PBST [0,1% (v/v) Tween 20]. Os fagos ligados às moléculas de GPI foram eluídos com 100  $\mu$ L de glicina-HCl 100mM (pH 2,2) durante 15 minutos à temperatura ambiente (TA). A suspensão foi neutralizada com 16,5  $\mu$ L de Tris 2M (pH 9,1). Os fagos resultantes desta primeira seleção foram amplificados em *E. coli* XL1-Blue. Um segundo ciclo de seleção foi realizado como descrito acima.

### 3.3. Extração de DNA plasmidial e transformação em *E. coli* TOP10

Bactérias *E. coli* XL1-Blue infectadas a partir do 2º ciclo de seleção foram utilizadas para extração do DNA plasmidial e posterior transformação em bactérias *E. coli* TOP10, uma linhagem não supressora. A extração de DNA plasmidial foi realizada utilizando o *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden, DS, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado (*Nanodrop Spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e posteriormente analisado em gel de agarose a 0,8% com padrão de peso molecular de 1kb (*Plus DNA Ladder*, Thermo Fisher Scientific).

Bactérias *E. coli* TOP10 foram preparadas com CaCl<sub>2</sub> para se tornarem quimiocompetentes. Aproximadamente 50 ng de DNA plasmidial foram adicionados cuidadosamente em 10 µL de bactérias TOP10. A mistura foi mantida em gelo durante 30 minutos e, em seguida, submetida a um choque térmico durante 90 segundos a 42°C e 60 segundos em banho de gelo. Posteriormente, 800 µL de meio SOC foram adicionados e a suspensão foi incubada a 37°C por 45 minutos. Alíquotas das bactérias transformadas foram plaqueadas em ágar *Luria-Bertani* (LB) contendo carbenicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas, overnight a 37°C, para o crescimento das colônias recombinantes, que continham o inserto.

### 3.4. Expressão de scFv

Cada colônia com o inserto foi transferida e cultivada em uma placa *deep well* contendo 1 mL de meio *Superbroth* (SB), carbenicilina (100 µg/mL) e 2% de glicose 2M (v/v). A placa foi incubada overnight sob agitação a 250 rpm e 37°C. Em seguida, foram transferidos 50 µL de cada clone bacteriano para uma nova placa contendo 1 mL de meio SB/carbenicilina (100 µg/mL) / 2% de glicose 2M (v/v) e incubados a 250 rpm a 37°C durante 4,5 horas. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C e o *pellet* foi ressuscitado em 1,5 mL de meio SB/carbenicilina (100 µg/mL). A expressão de scFv solúvel foi induzida com isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MI, EUA) a uma concentração final de 2,5 mM, *overnight* sob agitação a 250 rpm e 30°C. A placa *deep well* foi centrifugada a 3.700 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo o scFv solúvel foi transferido para outra placa de 96 poços e armazenado a 4°C. O volume remanescente da primeira placa foi centrifugado, e o *pellet* de bactérias foi utilizado para a extração do DNA e posterior sequenciamento.



### 3.5. Análise da expressão e especificidade dos clones de scFv por ELISA

Para análise da especificidade dos clones de scFv, placas de microtitulação de alta afinidade (*Nunc MaxiSorp™*, *eBioscience*, San Diego, CA, EUA) foram sensibilizadas com 10 µg/mL GPIs extraídos de *P. falciparum* em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6), bloqueadas e adicionadas da suspensão de clones de scFv. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com PBS/BSA 5%. Foram adicionados 50 µL de anti-HA/peroxidase (1:1000) (Roche, Basel, Suíça) diluídos em PBS/BSA 5% e as reações foram reveladas pela adição de orto-fenilenodiamina, (OPD - C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MI, EUA) em tampão citrato fosfato (0,1M; pH 5,0) a 0,4mg/mL com 0,4% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) e a leitura realizada a 492 nm em leitora de ELISA Titertek Multiscan (*Flow Laboratories*, Rockville, MD, EUA).

As etapas de bloqueio e conjugado foram realizadas a 37°C por 1 hora e entre cada etapa foram realizadas três lavagens com PBS 1X por 1 minuto.

A partir desde ensaio, para seguir com os testes *in vitro* e *in vivo*, foi escolhido o clone que apresentou maior reatividade com GPI de *P. falciparum*.

### 3.6. Sequenciamento de DNA

Os clones de scFv capazes de reconhecer o alvo, a partir do ELISA, foram submetidos ao sequenciamento do DNA plasmidial.

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o DNA extraído do *pellet* de bactérias previamente separado. As reações foram realizadas de acordo com o *kit DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (*GE Healthcare Life Sciences*, Waukesha, WI, EUA). Foram utilizados os seguintes *primers*: MMB4 (5'- GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG T-3') para a cadeia leve e MMB5 (5'-CGT TTG CCA TCT TTT CAT AAT C-3') para a cadeia pesada, em um volume final de 10 µL. As amostras foram enviadas à empresa responsável pelo sequenciamento e submetidas ao sequenciador ABI3730 *Platform* (*Life Technologies/Thermo Fisher Scientific*).

#### 3.6.1. Análise de bioinformática

Análises *in silico* de modelagem molecular foram realizadas para predizer a estrutura tridimensional (3D) do clone de scFv e localizar espacialmente as Regiões Determinantes de Complementariedade (CDR's). As sequências adquiridas através do sequenciamento foram analisadas pelo IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast>) e VBASE2 (<http://www.vbase2.org>) (Retter et al., 2005) para identificação das cadeias leve e pesada das moléculas de scFv, assim como de suas regiões conservadas (*Framework Regions*, FRs) e variáveis (*Complementarity Determining Regions*, CDRs). As sequências de aminoácidos deduzidas pelo *Expasy translate* (<https://web.expasy.org/translate>) foram submetidas ao programa de bioinformática I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) para obtenção da estrutura 3D da molécula de scFv. A melhor predição foi escolhida com base nas pontuações obtidas pelos verificadores internos de cada preditor e ferramentas *online*, sendo estas últimas, os *softwares* *Verify3D* (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>), *SAVES* v5.0 (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/SAVES/>), e *RAMPAGE: Ramachandram Plot Assessment* (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage2.php>) os quais avaliam a coerência espacial e a compatibilidade entre a sequência linear (1D) e o modelo predito (3D). O modelo melhor avaliado foi gerado pelo I-TASSER. O *Software PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.0 Schrödinger, LLC* foi utilizado para visualização, análise, edição e exportação das imagens.

O clone selecionado após as análises de bioinformática foi submetido à expressão de scFv em maior escala e purificado em cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC).

### **3.7. Expressão de scFv em maior escala e purificação por HPLC**

A expressão dos clones de scFv foi induzida como descrito no item “Expressão de scFv”, para produção em maior escala (600 mL). Após produção, o sobrenadante contendo o scFv foi purificado por cromatografia de afinidade utilizando a coluna *HisTrap™ HP* (*GE Healthcare Life Sciences, Waukesha, WI, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante, em sistema HPLC (*AKTATM purifier, GE Healthcare Life Sciences*). Após imobilização de níquel na coluna e da adição de tampão de ligação (Imidazol 50mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4), foi adicionado o sobrenadante da cultura de bactérias, obtido após centrifugação e filtração. As moléculas de scFv ligadas ao níquel pela cauda de hexa-histidina (His6) foram eluídas por competição com tampão de eluição (Imidazol 500mM, NaCl 0,5M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20mM, pH 7,4). O

scFv purificado foi concentrado utilizando tubo Amicon de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA, EUA) e a concentração proteica foi determinada utilizando *kit BCA TM* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA).

### **3.8. Identificação de scFv purificado**

O ensaio *Dot blot* foi realizado com adição inicial de 8µg de scFv purificado à membrana de nitrocelulose 0,2 µm (GE Healthcare Life Sciences, Germany). Após secagem a temperatura ambiente (TA), a membrana foi bloqueada com PBS/leite em pó desnatado 5% por 1 hora sob agitação a TA e, em seguida lavada três vezes com PBS 1X. Posteriormente, o anticorpo secundário anti-HA/peroxidase (Roche, Basel, Suíça), diluído a 1:1000 em PBS/leite em pó desnatado 1% foi adicionado e a membrana foi incubada por 1 hora a TA, sob agitação. Após 2 lavagens com PBS-T 0,05% e 1 lavagem com PBS1X, a reação foi revelada pela adição do substrato DAB (3,3'-diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA) por 30min e interrompida com água corrente.

Para a verificação da integridade das moléculas de scFv purificadas, as mesmas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) com padrão de peso molecular de 10 a 250kda.

### **3.9. Ensaios *in vivo***

#### **3.9.1. Animais**

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas para realização dos experimentos e Balb/c para manutenção da cepa *P. berghei* – ANKA - GFP+ (SANCHEZ et al 2007). Todos com idade entre 6-8 semanas, mantidos com alimento e água *ad libitum*, nascidos e mantidos durante todo o período experimental na REBIR/UFU.

#### **3.9.2. Manutenção de *Plasmodium berghei***

Para manutenção da cepa *P. berghei*-ANKA-GFP+ foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c. A cada sete dias, coletou-se uma amostra de sangue do animal infectado e

inoculou-se em outro animal durante o período em que se necessitou de parasitos para realização de experimentos. Para infecção experimental, uma amostra de aproximadamente 200 µL foi coletada do plexo retro-orbital de camundongos infectados com *P. berghei*-ANKA (parasitemia entre 8 e 12%). Posteriormente realizou-se a determinação da porcentagem de hemácias parasitadas através de citometria de fluxo e a quantidade  $1 \times 10^6$  hemácias parasitadas foram inoculadas em animais a serem desafiados.

### **3.9.3. Infecção com *P. berghei*-ANKA-GFP+ e Tratamento com clone de scFv selecionado**

Camundongos C57BL/6 fêmeas, com idade de sete semanas, foram agrupados da seguinte forma: não infectados e tratados com PBS (grupo 1), não infectados e tratados com o clone de scFv (grupo 2), infectados com *P. berghei*-ANKA e tratados com PBS (grupo 3), infectados com *P. berghei*-ANKA e tratados com o clone de scFv (grupo 4). Os animais tratados com PBS receberam 150 µL da solução e os tratados com o fragmento de anticorpo receberam uma composição farmacêutica compreendendo o fragmento de anticorpo scFv e um carreador farmacologicamente aceito, compreendendo 100 µg do scFv e diluídos em 150 µL de PBS. Os animais dos grupos 3 e 4 foram infectados via intraperitoneal, no dia 0, com 10<sup>5</sup> hemácias infectadas por animal e no mesmo dia foi iniciado o tratamento de todos os grupos. Nos dias 3 e 6 os animais receberam novamente o tratamento (PBS ou scFv) via intraperitoneal. Para análise de sobrevivência, os animais foram acompanhados durante 30 dias. Para as demais análises (parasitemia, peso corporal e Escala Rápida e Quantitativa de Coma e Comportamento Murino-RMCBS) os animais foram acompanhados e então eutanasiados no 7º dia pós infecção (dpi), já que é neste tempo que os animais infectados com dose letal de *P. berghei*- Anka geralmente apresentam quadros clínicos de malária cerebral, seguido de morte.

Os animais foram eutanasiados sob plano anestésico (Cetamina 90 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) seguido por deslocamento cervical.

### **3.9.4. Determinação da parasitemia**

Uma gota de sangue (aproximadamente 3  $\mu$ L) obtida através de punção da cauda de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*-ANKA-GFP+ tratados ou não com o clone selecionado foi diluída em 300  $\mu$ L de solução salina (PBS) para análises de citometria de fluxo. Todas as amostras foram lidas em aparelho BD Accuri C6 (*Becton Dickinson*, São José, California) com excitação pelo laser de 488nm. Eritrócitos foram primeiramente identificados por suas especificidades de tamanho e granulosidade e um total de 50.000 eventos foram adquiridos de cada amostra.

### **3.9.5. Curva de mortalidade**

Camundongos C57BL/6 fêmeas infectadas com *P. berghei*-ANKA-GFP+ tratadas com o clone selecionado e grupo controle (infectadas, não tratadas) foram acompanhadas diariamente por trinta dias. Para análise de morbidade, foram realizadas pesagens dos animais dos dias 0 a 6 pós-infecção. Para verificação dos sinais clínicos relacionados à malária cerebral, os animais foram observados quanto à manifestação de ataxia, paralisia, desvio de cabeça e convulsões. Quando determinado grau de sofrimento (sinais de dor, inanição, perda de mais de 20% do peso corporal), os animais foram eutanasiados sob plano anestésico (Cetamina 90 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg) seguido por deslocamento cervical.

## **3.10. Ensaio *in vitro***

### **3.10.1 Parasitos**

Formas tripomastigotas de cultura de tecido da cepa Y de *T. cruzi* (TCT Y) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia. Já as formas taquizoítas e extrato proteico de *Toxoplasma gondii* (cepa RH) nos foram doados pelo Laboratório de Imunoparasitologia da mesma universidade.

### **3.10.2. Validação da reatividade do scFv com extratos de parasitos**

Diante da similaridade das moléculas de GPI entre diferentes parasitos, investigamos a reatividade do scFv com extratos proteicos de outros parasitos protozoários intracelulares (*Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*).

Para tanto, uma placa de microtitulação de 96 poços de alta afinidade (*Nunc MaxiSorp™*, *eBioscience*, San Diego, CA, EUA) foi sensibilizada com 1 µg/poço de extrato dos parasitos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6), *overnight* à 4 °C. Após este período foi feita 1 lavagem com PBS 1X e posteriormente foi realizado o bloqueio com PBS/BSA 5% por 1 hora à 37°C, seguido de 2 lavagens com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado 1 µg/poço de scFv purificado, incubando por 1 hora à 37°C. Após 3 lavagens com PBS 1X, foram adicionados 50 µL de anti-HA/peroxidase (1:1000) (Roche, Basel, Suíça) diluídos em PBS/BSA 5% e a reação foi revelada pela adição de OPD (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MI, EUA) em tampão citrato fosfato por 30 minutos. A reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) e a leitura realizada a 492 nm em leitora de ELISA *Titertek Multiscan* (*Flow Laboratories*, Rockville, MD, EUA).

### **3.10.3. Teste de viabilidade celular**

Para avaliação da citotoxicidade do clone de scFv selecionado, foi utilizado o teste de Alamar Blue em placa de 96 poços. Na realização de cada teste foi preparada uma solução contendo 10<sup>6</sup> células C2C12 (mioblastos murino) em 10 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado. Desta, foram transferidos 100 µL para cada poço da microplaca, que foi então incubada por 6 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo aderência das células ao fundo do poço. Na sequência, o meio de cultura de cada poço foi retirado e adicionado o tratamento com scFv nas concentrações testadas (1,562 à 200 µg/mL; Fator de diluição = 2). O volume final de cada poço foi de 100 µL e a quantidade de células presentes em cada poço foi de 10<sup>4</sup>. Foi preparado controle positivo de morte celular (0% de viabilidade celular) em meio DMSO a 30%.

Após ser preparada, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foi adicionado 10 µL de solução de resazurina a 3 mM em PBS. A placa foi submetida a outra incubação por 24 horas nas mesmas condições. Em seguida foi realizada leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro de microplaca (*SpectraMax*, *Molecular Device*, Sunnyvale, CA, EUA). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A partir das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em relação ao controle de crescimento.

Para analisar a citotoxicidade do clone para o parasito, o teste descrito acima foi realizado a partir da aderência de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, seguida de adição do scFv nas diferentes concentrações.

Com os resultados desse teste foi escolhida a dose de tratamento para os testes de invasão celular.

#### **3.10.4. Ensaio de invasão celular**

Para avaliar o processo de internalização durante a cinética de invasão, foram utilizadas formas tripomastigotas de *T. cruzi* e taquizoítos de *T. gondii* tratadas previamente ou não com scFv. Para isto, mioblastos murinos (C2C12) foram plaqueados em concentração de  $5 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. As células em DMEM suplementado com 10% de SFB, foram incubadas *overnight* a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, para completa aderência. No dia seguinte, os poços foram lavados três vezes com PBS. As células foram então desafiadas com as formas parasitárias, na proporção de 10 parasitos/célula, sendo um grupo tratado previamente com scFv (por 1 hora) e o outro não tratado (controle). Após duas horas de incubação, os poços foram cuidadosamente lavados três vezes com PBS para a retirada de parasitos que não internalizaram. As lamínulas foram fixadas com solução Bouin (73,4% de ácido pícrico, 23,8% de formaldeído e 4,8% de ácido acético) durante 15 minutos em TA, lavadas e então coradas com *Giemsa* (1:20) por 40 minutos. Para a avaliação da invasão celular realizou-se a contagem do número de parasitos internalizados em um total de 300 células/lamínula.

### **DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE SCFV ANTI-GPI**

#### **3.11. Seleção de peptídeos recombinantes**

##### **3.11.1. *Biopanning* e amplificação de fagos**

Foram utilizados 10 µL ( $1 \times 10^{11}$  partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da *NEW ENGLAND BioLabs® Inc.*), diluída em 140 µL de PBS-T 0,1% para a seleção de peptídeos miméticos ao GPI de *P. falciparum*.

A seleção foi realizada utilizando como alvo o scFv purificado. Para tanto, 10µL (aproximadamente 8µg) do scFv foram incubados *overnight* a 4°C em placa de 96 poços de alta

afinidade. No dia seguinte, o poço foi lavado com PBS-T 0,1% e então foi realizado bloqueio com PBS/BSA 5%, por 1 hora à TA sob agitação. Após seis lavagens com PBS-T 0,1%, 10µL da biblioteca de fagos foram adicionados e incubados por 1 hora à 37°C. Após dez lavagens, os fagos ligantes foram recuperados por uma eluição ácida, com 150µL de glicina pH 2, incubando por 10 minutos a TA sob agitação, retirou-se então o sobrenadante, o qual foi neutralizado com 22,5 µl de Tris pH 9. Esses passos foram repetidos duas vezes, totalizando três ciclos de seleção.

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi feita pela inoculação em meio *Luria Bertani* (LB - Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina (20 mg/mL), com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37°C até a fase *early-log* (OD<sub>600</sub> ~0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 150 µL de eluato dos fagos e incubados a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação (250 rpm). Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo estéril contendo solução de PEG/NaCl (20% de polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada *overnight* a 4°C para a precipitação dos fagos e posteriormente, centrifugada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi então suspenso em 1 mL de PBS e precipitado novamente com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200µL de PBS, obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C.

### 3.11.2. Titulação e purificação dos fagos

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*.

Para todas as titulações foram utilizados 1 µL dos fagos, diluídos em 9 µL de meio de cultura LB. As diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup> foram feitas para eluatos não amplificados e de 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-11</sup>, para fagos amplificados. As diluições foram incubadas com 200 µL de *E. coli* (ER2738) em fase *mid-log* (OD<sub>600</sub>~0,5) por 5 minutos e plaqueadas em meio LB contendo IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 µg/mL), juntamente com 3mL de Agarose Top (10g de Bacto-Triptona, 5g de extrato de levedura, 5g de NaCl, 1g de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O / litro).

Após a incubação em estufa por 18 horas à 37°C, as colônias azuis foram contadas para a



obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis x fator de diluição).

As colônias que apresentaram coloração azul, demonstrando a hidrólise do substrato X-Gal e a expressão do gene da  $\beta$ -galactosidase dos fagos pelas bactérias ER2738, foram reamplificadas separadamente em placas *deepwell* para o armazenamento dos clones selecionados. Para isso, cada colônia isolada obtida do 3º ciclo não amplificado foi adicionada a um poço da *deepwell* contendo 1 mL de meio de cultura com *E. coli* em fase de crescimento inicial ( $OD_{600} \sim 0,3$ ). A placa foi incubada por 24 horas à 37°C, sob agitação e então centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm, para a retirada do sobrenadante da cultura. Seu conteúdo foi transferido para outra placa *deepwell* e então foi adicionado 1/6 do volume de PEG/NaCl (20% de polietileno glicol-8000, NaCl 2,5 M) incubando-a por 12 horas à 4°C. A placa foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado, e o precipitado suspenso em 200 $\mu$ L de PBS.

### 3.12. Extração de DNA de fagos

As colônias provenientes das placas tituladas no 3º ciclo do *biopanning* foram isoladas e transferidas para poços de placas *deepwell*, contendo 1,2 mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* ( $OD_{600} \sim 0,3$ ) para a extração do DNA dos fagos. A placa foi vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob agitação (250 rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700 rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 800  $\mu$ L do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350 $\mu$ L de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos.

Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100  $\mu$ L de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. A placa foi agitada vigorosamente por 40 segundos e 250  $\mu$ L de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos à TA a placa foi centrifugada (3700 rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500 $\mu$ L de etanol 70% e recentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado foi diluído em 20 $\mu$ L de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com *gel red*.

### 3.12.1. Sequenciamento

Na reação de sequenciamento, foram utilizados 5 pmol do *primer* -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - *Biolabs*). As amostras foram enviadas a uma empresa responsável para sequenciamento e submetidas ao sequenciador ABI3730 *Platform* (*Life Technologies/Thermo Fisher Scientific*).

Após o sequenciamento, as sequências de DNA foram traduzidas pelo *ExPasy translate* (<https://web.expasy.org/translate>).

### 3.13. Phage-ELISA

Para analisar a reatividade dos peptídeos selecionados com o scFv, foi realizado o ensaio de ELISA. As placas de microtitulação foram sensibilizadas com 0,5 µg/poço de scFv diluído em tampão carbonato-bicarbonato 50mM (pH 9,6) *overnight* a 4°C. Após uma lavagem com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), foi realizado bloqueio com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados quatro vezes com PBS-T 0,05% e então incubados com 10<sup>11</sup>/poço dos fagos selecionados purificados e do fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) para controle das reações, por 1 hora a 37°C. Posteriormente, foram feitas seis lavagens e, em seguida, fez-se a incubação com anti-M13 conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05%, durante 1 hora a 37°C. Após seis lavagens, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

Após a realização deste ensaio foram escolhidos os fagos com maior reatividade para serem testados.

### 3.14. Validação dos clones selecionados

A fim de avaliar a reatividade dos peptídeos selecionados com o soro de camundongos BALB/c infectados ou não com *P. berghei*-ANKA-GFP+, foi realizado o teste ELISA. A placa de microtitulação foi sensibilizada com 1x10<sup>11</sup> de fagos/poço diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 50mM (pH 9,6) *overnight* a 4°C. Após duas lavagens com PBS1X, foi realizado

bloqueio com PBS-BSA 5% por 1 hora a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS1X e então incubados com soro de camundongos infectados ou não com *P. berghei*-ANKA-GFP+ nas diluições 1:50, 1:100, 1:200, por 1 hora a 37°C. Posteriormente, foram feitas seis lavagens e, em seguida, fez-se a incubação com anti-IgG mouse conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:1000 em PBS-BSA 5%, durante 1 hora a 37°C. Após seis lavagens, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm.

### 3.15. Análise estatística

Todos os dados dos testes ELISA foram analisados usando o programa *Graph Pad Prism 7.0* (*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA*). Análises múltiplas foram realizadas pelo método ANOVA. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

A sensibilidade, especificidade e a acurácia foram determinados de acordo com Mineo et al., (2005). Sendo que a sensibilidade é a capacidade de um teste ser positivo (detectar os extratos dos parasitos ou anticorpos de animais infectados) e a especificidade é a capacidade de um teste ser negativo (detectar a ausência de extrato proteico ou anticorpo).

Foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Acurácia (\%)} = \text{Índice de validade} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \times 100$$

Onde:

a = verdadeiros positivos no teste

b = falso positivo no teste

c = falso negativo no teste

d = verdadeiros negativos no teste

## Resultados

## DESENVOLVIMENTO DE FRAGMENTO DE ANTICORPO ANTI-GPI DE *P. falciparum*

### 4.1. Clones que expressam scFv ligante à GPI

Após dois ciclos de seleção no processo de *Phage display*, verificou-se a eficiência do processo de seleção de clones de scFv específicos a moléculas de GPI de *P. falciparum*. A quantidade de fagos selecionados durante os dois ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos que expressam scFv com maior afinidade ao GPI de *P. falciparum* ficaram ligados por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens.

Dos clones sequenciados, oito apresentaram sequência válidas (sem erros de sequenciamento) e distintas (sequências foram omitidas, pois estão sob sigilo de patente). Os resultados do ELISA demonstraram que estes oito clones analisados expressaram scFv que se ligou a GPI de *P. falciparum*. Esses clones foram denominados G1-G8 (Figura 7). Porém, pode-se observar que o clone G7 ligou-se mais significativamente a GPI do parasito, desta forma, os demais testes foram realizados apenas com este clone. A tabela 1 apresenta os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia para os clones reativos.

O clone escolhido (G7) foi submetido à produção em grande escala e ao processo de purificação em HPLC, utilizando coluna de sefarose para purificação de proteínas marcadas com histidina (His-Trap) (Figura 8A). O ensaio *dot blot* confirmou a expressão e eficiência do processo de purificação das moléculas de scFv (Figura 8B). A partir da eletroforese em gel de poliacrilamida foi possível observar as proteínas scFv com peso molecular aproximado de 30 Kda (Figura 8C). Além disso, pode-se observar a banda de DNA plasmidial extraído, de aproximadamente 3500pb, corresponde aos clones de scFv (Figura 8D).

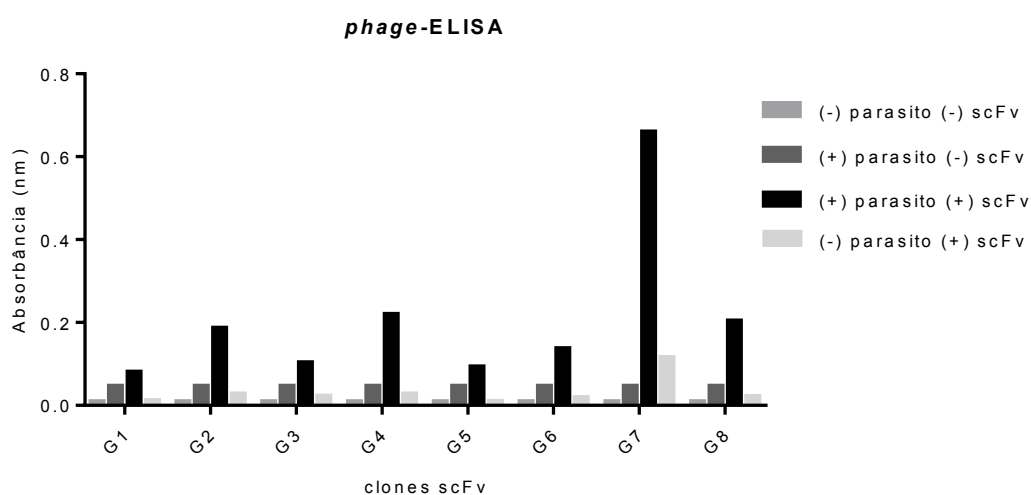


Figura 7. Expressão e reatividade a GPI de *P. falciparum* do sobrenadante de cultura dos clones purificados induzidos por IPTG, após transformação em *E. coli* TOP 10. Oito clones (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7 e G8) foram expressos e reativos a GPI de *P. falciparum*. Observa-se maior reatividade do clone G7 à GPI do parasito.

Tabela 1: Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA utilizando os clones de scFv selecionados.

Peptídeo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
<b>G1</b>	87,0	15,9	60,5
<b>G2</b>	86,9	15,9	72,4
<b>G3</b>	82,0	15,9	65,1
<b>G4</b>	88,8	15,9	75,6
<b>G5</b>	90,9	15,9	64,6
<b>G6</b>	87,8	15,9	69,1
<b>G7</b>	85,0	15,9	80,5
<b>G8</b>	90,4	15,9	75,8

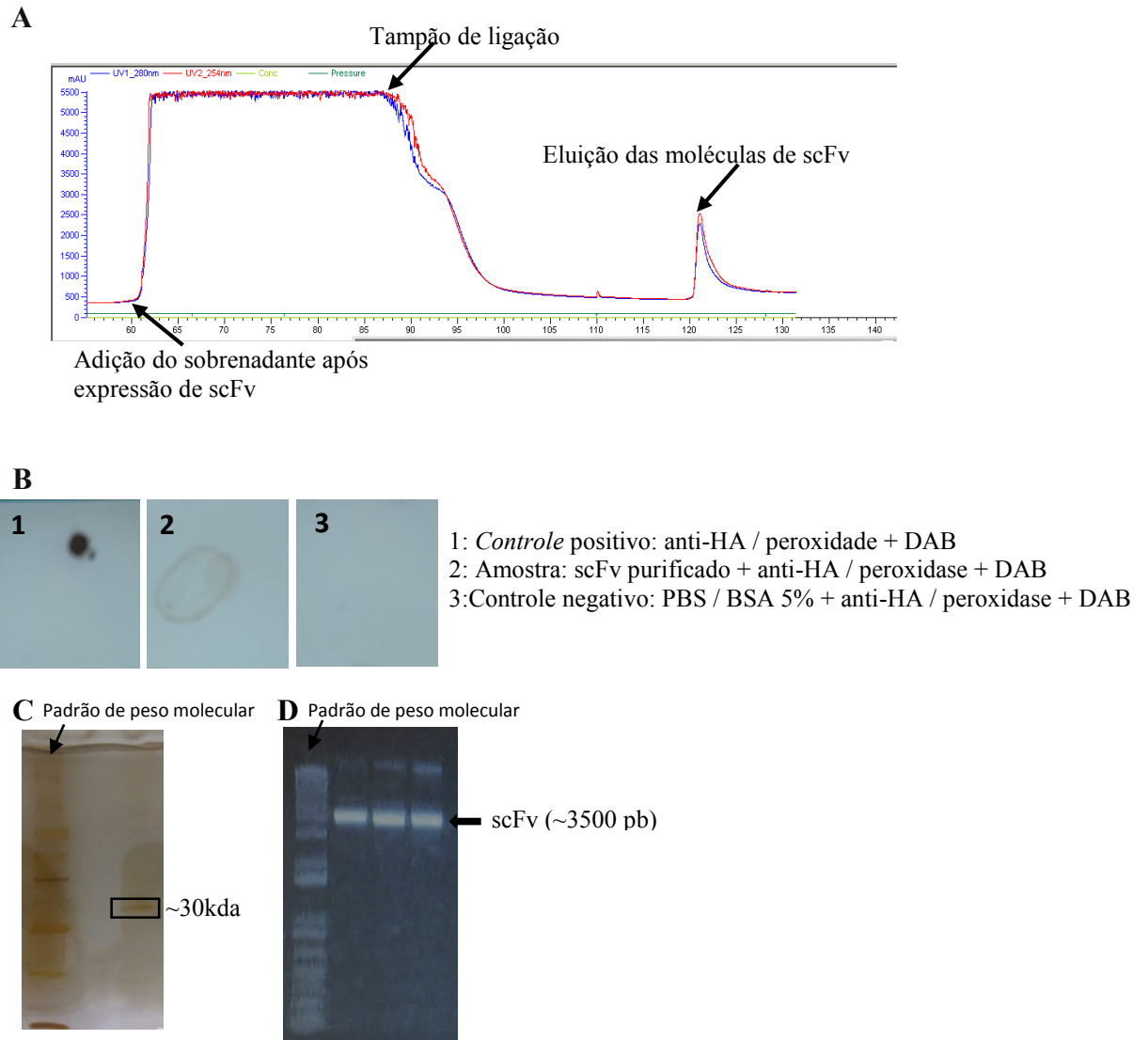


Figura 8. Purificação do clone G7 em HPLC, utilizando coluna His-Trap (A). Ensaio *dot blot* do scFv purificado (B). SDS-PAGE evidenciando a fração de scFv com peso molecular de aproximadamente 30 Kda (C) e genes de scFv extraído e visualizado em gel de agarose 0,8%, com banda de aproximadamente 3500pb (D).

A análise de bioinformática foi realizada a fim de caracterizar a sequência do clone G7 selecionado. A figura 9 mostra a predição bem-sucedida pelo I-TASSER do modelo tridimensional, bem como a localização de suas CDR's.



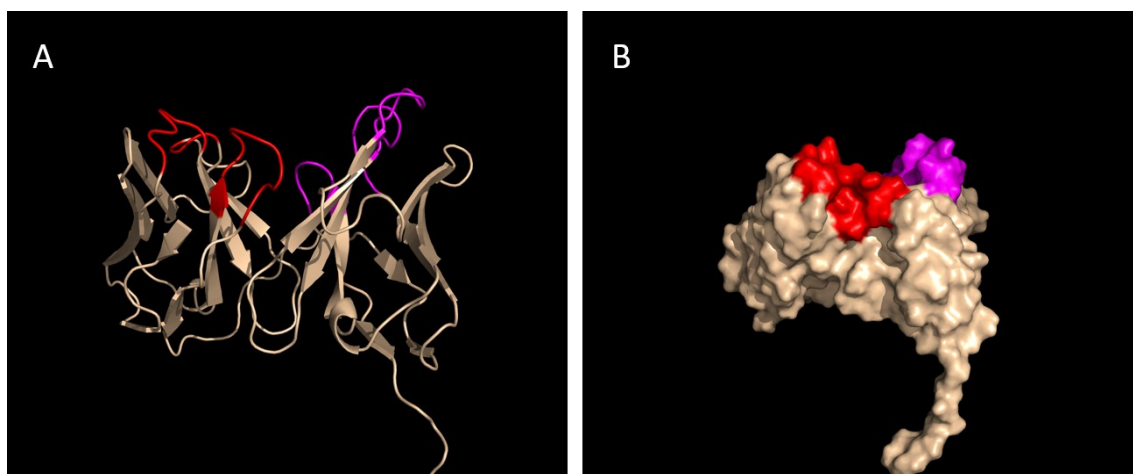


Figura 9. Predição da estrutura tridimensional do clone G7. Em (A) o modelo é apresentado evidenciando a composição da estrutura secundária e em (B) mostrando a conformação de superfície. Os domínios de cadeia leve variável (VL) (em vermelho) e de cadeia pesada variável (VH) (em lilás) são destacados estando expostos na superfície proteica.

#### **4.2. O clone G7 diminui a parasitemia, prolongando a vida de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*-ANKA-GFP+**

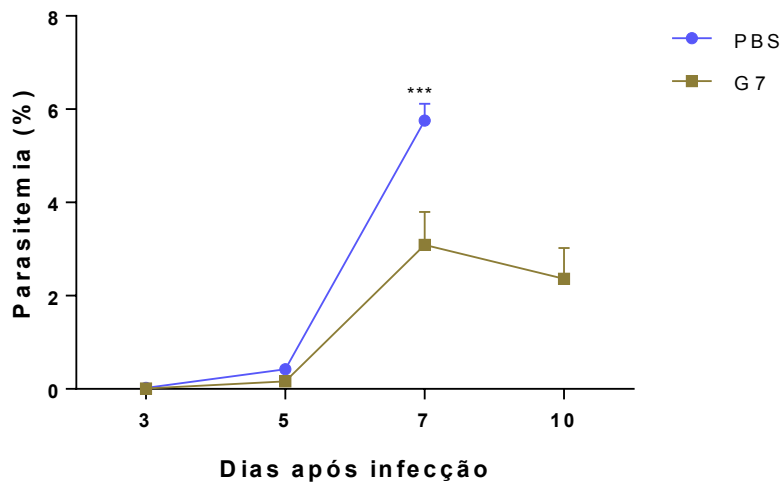
A partir do tratamento de camundongos C57BL/6 infectados com *P. berghei*-ANKA-GFP+, foi possível observar que a fração de anticorpo selecionada diminui a parasitemia dos animais (Figura 10A), mantendo-os vivos e sem sintomas de malária cerebral por até 30 dias após a infecção (Figura 10B). O mesmo não é observado em animais não tratados, os quais morrem de malária cerebral após 6 dias de infecção.

#### **4.3. O clone G7 selecionado contra GPI de *P. falciparum* reage com extratos de outros parasitos intracelulares**

O clone G7 foi submetido a um imunoenensaio (ELISA) a fim de observarmos sua reatividade com extratos proteicos de diferentes parasitos intracelulares. A partir deste ensaio, foi possível observar que o clone G7 selecionado contra GPI de *P. falciparum* também apresenta afinidade por *T. cruzi* e *T. gondii* (Figura 11).

Devido à similaridade das moléculas de GPI entre diferentes parasitos intracelulares e diante da reatividade do clone G7 com *T. cruzi* e *T. gondii* observada neste ensaio, as investigações seguintes foram realizadas a fim de validar a ação do clone no impedimento da invasão celular destes parasitos.

A



B

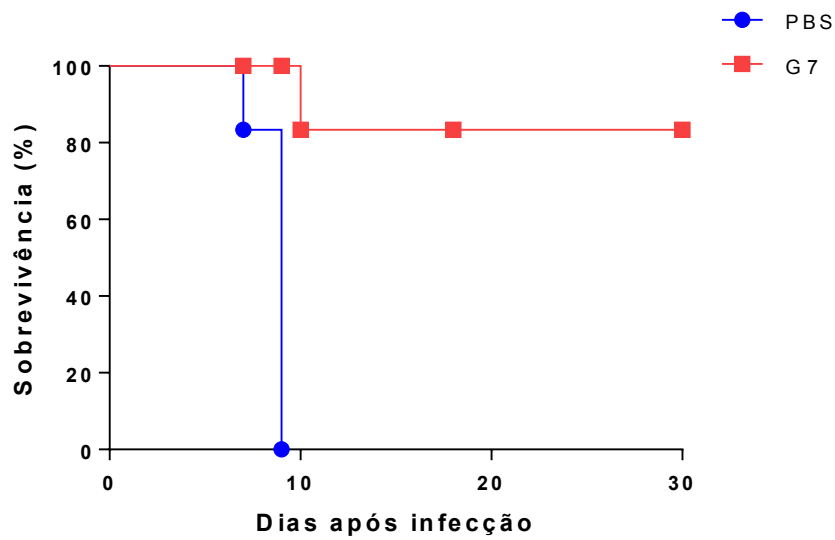


Figura 10. Curva de parasitemia observada a partir do tratamento de camundongos C57BL/6 fêmeas com sete semanas de idade infectadas via intraperitoneal com *P. berghei*-ANKA-GFP+, foi possível observar que a fração de anticorpo selecionada diminuiu significativamente a parasitemia dos animais (A), mantendo-os vivos e sem sintomas de malária cerebral por até 30 dias após a infecção (B).

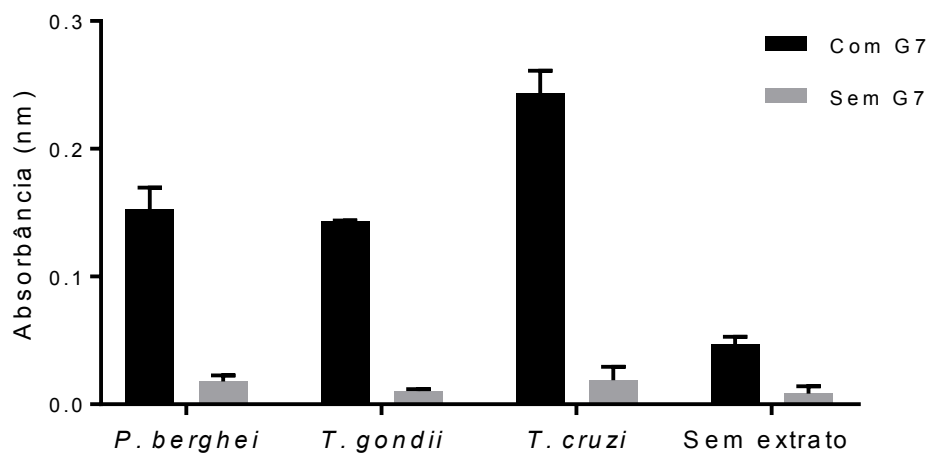


Figura 11. Reatividade do clone G7 com extratos proteicos de diferentes parasitos intracelulares. Observa-se maior reatividade do clone G7 ao extrato proteico de *T. cruzi*.

#### 4.4. O clone G7 selecionado não é tóxico para célula e diminui a invasão celular por *T. cruzi* e *T. gondii*

O ensaio de viabilidade celular foi realizado a fim de analisarmos se o clone G7 causaria algum tipo de toxicidade para a célula (C2C12) e o parasito, além de obter uma dose ideal de tratamento a ser utilizada no ensaio de invasão. Os resultados mostram que o clone selecionado não é tóxico para a célula nem para o parasito (Figuras 12A e B). A partir destes resultados, a dose de scFv utilizada para o ensaio de invasão foi de 200ug/mL.

Analisando os resultados dos testes de invasão, foi possível verificar que após o tratamento com o clone G7 houve menos internalização de parasitos quando comparado ao grupo de células infectadas com parasitos não tratados (controle). Além disso, as células que foram infectadas com parasitos anteriormente tratados com G7 tiveram um número menor de parasito no citoplasma quando comparadas às células do grupo controle. Nos dois casos, a diminuição foi estatisticamente significativa ( $p = 0,003$ ). Tais resultados foram observados tanto no processão de invasão celular por *T. cruzi* (Figura 13A e B) quanto por *T. gondii* (Figura 14 A e B).

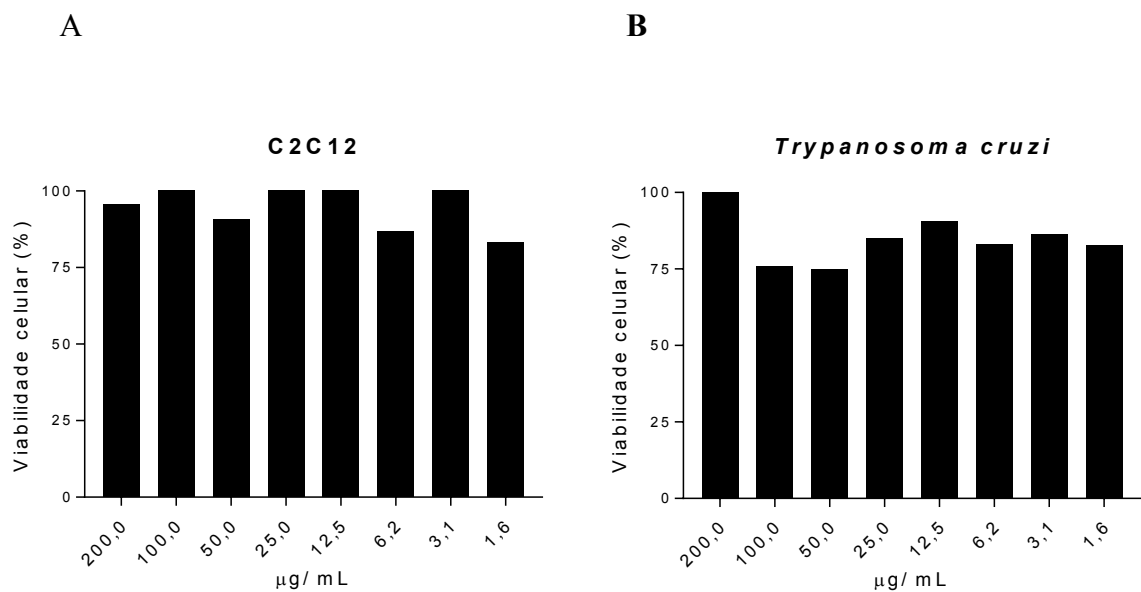


Figura 12. Ensaio de viabilidade celular e invasão de *T. cruzi* em células C2C12. O clone G7 não causa morte celular (A) ou parasitária (B).

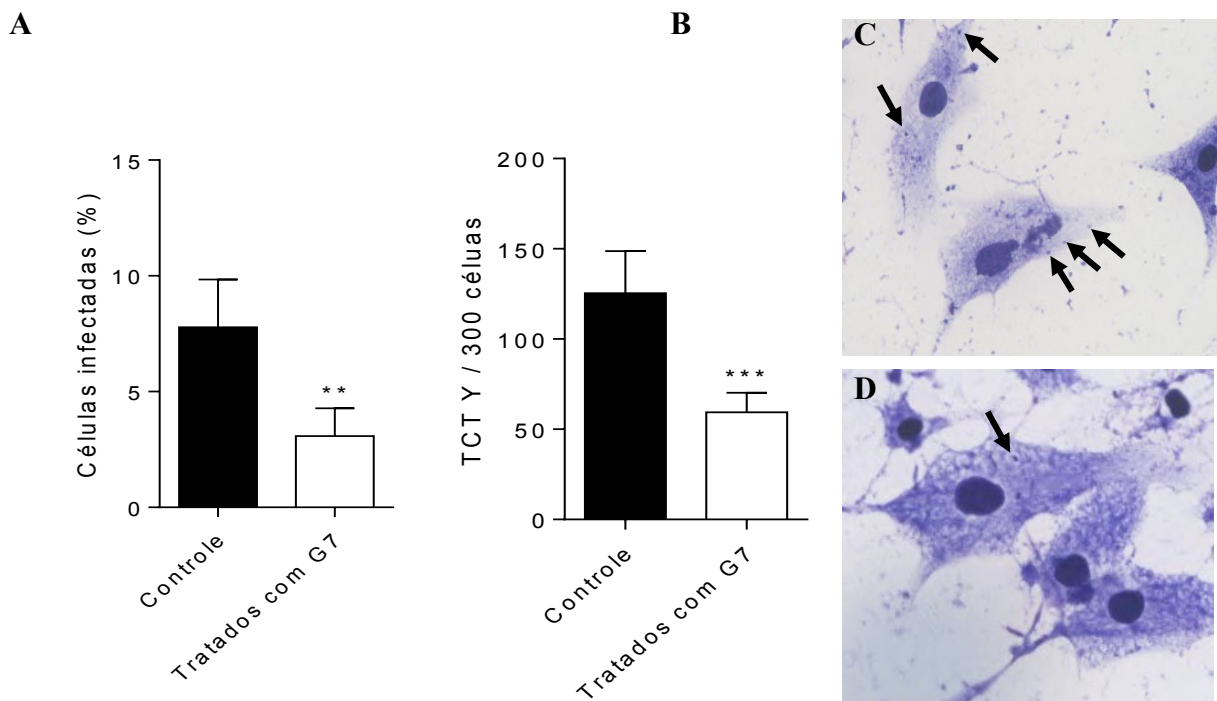


Figura 13. O clone G7 diminui significativamente a invasão de *T. cruzi* na célula (A) e, conseqüentemente apresenta menos parasitos no interior das células infectadas (B) ( $p = 0,003$ ). O processo de invasão foi observado em microscópio óptico (aumento de 100x) através da contagem dos parasitos internalizados, comparando o grupo

controle (parasitos não tratados previamente com G7) (C) com o grupo tratado (D). As setas indicam a presença do parasito no interior das células.

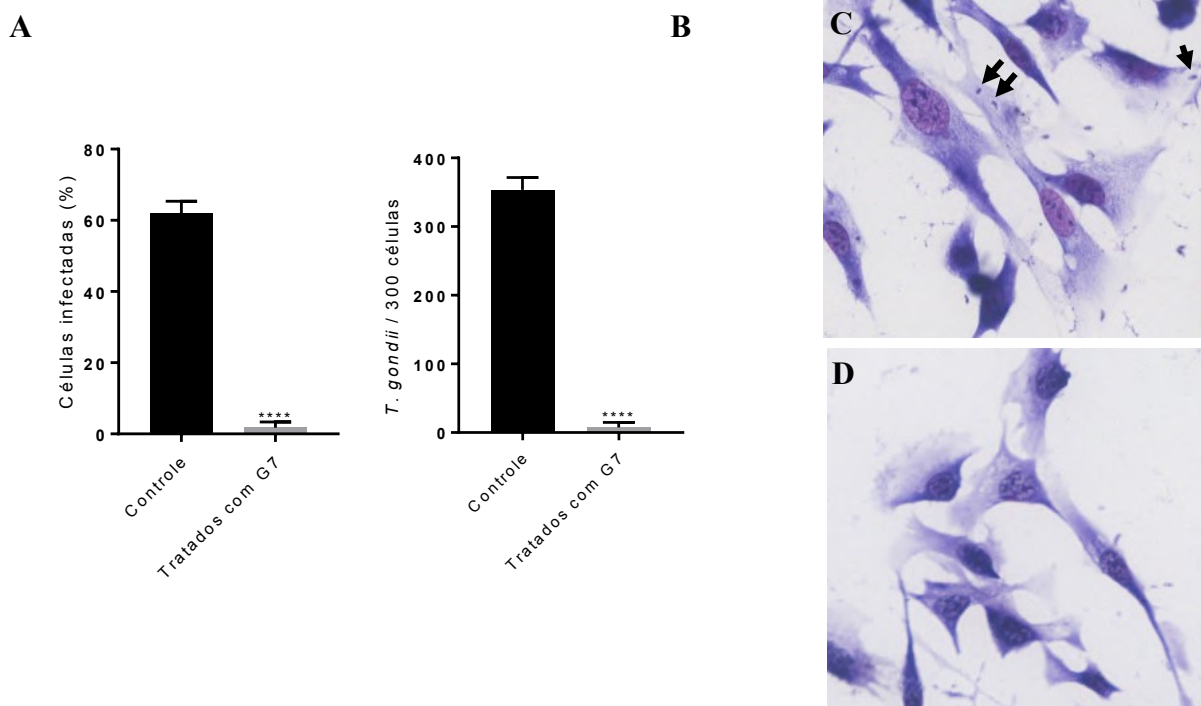


Figura 14. O clone G7 diminui significativamente a invasão de *T. gondii* na célula (A) e, conseqüentemente apresenta menos parasitos no interior das células infectadas (B) ( $p = 0,0001$ ). O processo de invasão foi observado em microscópio óptico (aumento de 100x) através da contagem dos parasitos internalizados, comparando o grupo controle (parasitos não tratados previamente com G7) (C) com o grupo tratado (D). As setas indicam a presença do parasito no interior das células.

## DESENVOLVIMENTO DE PEPTÍDEOS LIGANTES DE SCFV ANTI-GPI

### 4.5. Peptídeos miméticos à GPI de *P. falciparum*

#### 4.5.1. As seleções apresentaram enriquecimento nas etapas finais

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificados e não amplificados de cada ciclo. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com peptídeos que possuem maior afinidade ao clone G7 ficaram ligados por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens. Nas ampliações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

Um dos parâmetros que podem ser utilizados para indicar o sucesso do processo de *biopanning* na seleção dos peptídeos é a análise de enriquecimento, a qual pode ser observado

na tabela 2, onde também estão representados os títulos obtidos durante as etapas de seleção. O valor de enriquecimento de cada ciclo é confirmado pela divisão do título da saída pelo título da entrada multiplicado por 100, e a determinação da taxa efetiva de enriquecimento (número de vezes em que a seleção enriqueceu) é a divisão da taxa de enriquecimento do último ciclo dividido pela taxa do primeiro ciclo. O resultado obtido demonstrou que as seleções apresentaram enriquecimento nas etapas finais comparadas com as etapas iniciais de seleção, ou seja, ficaram ligados os clones com maior afinidade, o que demonstra que a seleção dos clones foi direcionada ao alvo.

Tabela 2. Taxa de enriquecimento observada durante as seleções biológicas utilizando biblioteca Ph.D.-C7C.

<b>Ciclos</b>	<b>Entrada</b>	<b>Saída</b>	<b>(S / E)* x 10<sup>2</sup></b>	<b>TE*</b> *
<b>1º Ciclo de seleção</b>	$1 \times 10^{11}$	$3 \times 10^3$	$3 \times 10^{-8}$	
<b>2º Ciclo de seleção</b>	$1 \times 10^{11}$	$2 \times 10^3$	$2 \times 10^{-8}$	30
<b>3º Ciclo de seleção</b>	$1 \times 10^{11}$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^{-8}$	

\* S: saída; E: entrada; \*\* TE: taxa de enriquecimento

#### **4.5.2. Onze clones de fagos apresentaram sequências distintas**

Os resultados do sequenciamento demonstraram que 11 dos 52 clones sequenciados apresentaram sequências válidas e distintas. Estes clones foram denominados, de acordo com sua localização na placa: F1, E1, F2, D2, C4, E4, D5, H5, A6, H6 e F7. As sequências foram omitidas, pois estão sob sigilo de patente.

#### **4.5.3. Quatro clones são mais reativos ao G7**

O sobrenadante dos 11 fagos com sequências distintas, bem como o fago selvagem (como controle negativo da reação) foram então submetidos ao *Phage*-ELISA para avaliação da reatividade com o clone G7. Diante disto, pode-se observar que quatro fagos (F1, E1, F2 e A6) são mais reativos ao G7 (Figura 16). Desta forma, foi realizada a amplificação e purificação

desses quatro fagos para comprovar sua reatividade, verificando que o fago A6 é o menos reativo entre eles, com menor afinidade ao clone G7 (Figura 17).

Os cálculos da sensibilidade, especificidade e acurácia foram feitos para os peptídeos com maior reatividade no *Phage-ELISA* (Tabela 3).

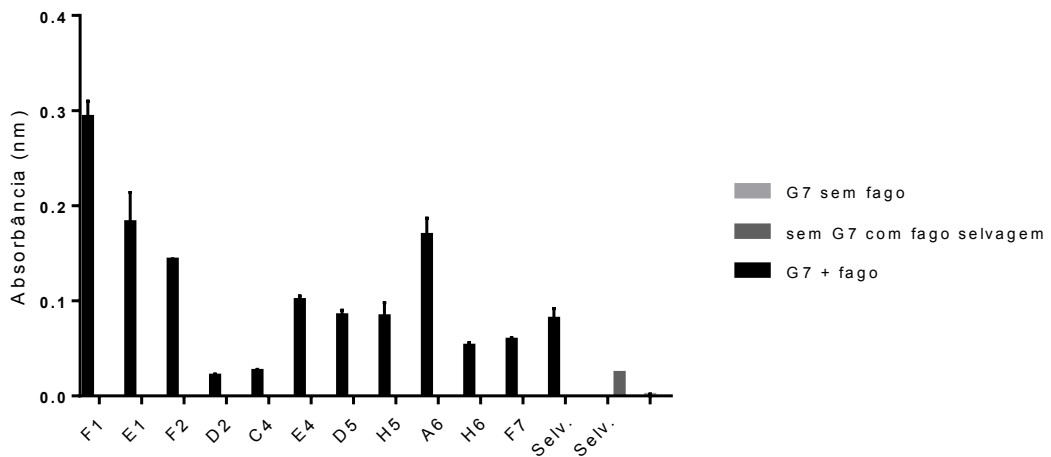


Figura 15. Painel de pré-validação dos clones reconhecidos por scFv purificado. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.

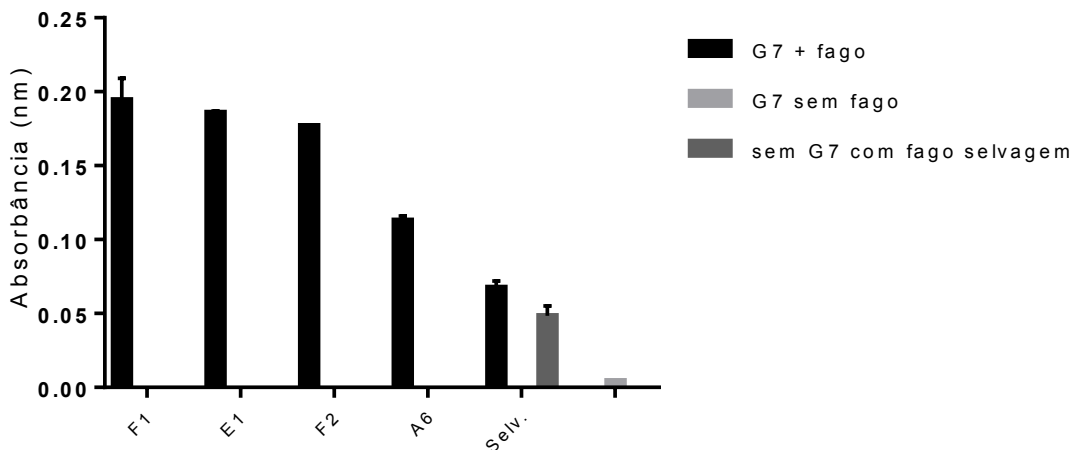


Figura 16. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para validação dos clones mais reativos ao scFv (G7). Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.

Tabela 3. Sensibilidade, especificidade e acurácia obtidos nos testes ELISA na detecção de scFv-G7 anti-GPI de *Plasmodium falciparum* utilizando os peptídeos miméticos selecionados.

Peptídeo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
F1	99,7	58	77,3
E1	97,6	58	76,5
F2	97,5	58	61,1
A6	96,1	58	69,1

#### 4.5.4. Os clones distinguem soro positivo e negativo de camundongos

Dois clones de peptídeos mais reativos ao G7 (F1e E1), bem como o fago selvagem (como controle negativo da reação) foram submetidos ao teste ELISA para validação da reatividade com soro de camundongos BALB/c infectados ou não com *P. berghei*-ANKA-GFP+. Diante dos resultados, pode-se observar que os clones de peptídeos miméticos à GPI conseguem distinguir o soro do animal com malária e o animal saudável, de forma significativa quando comparado ao fago selvagem, com  $p = 0,0002$ . A reatividade dos clones de peptídeos com o soro positivo também foi estatisticamente significativa quando comparado ao soro negativo, sendo que para E1 o valor de  $p$  foi de 0,0005 e F1  $p = 0,0009$  (Figura 18).

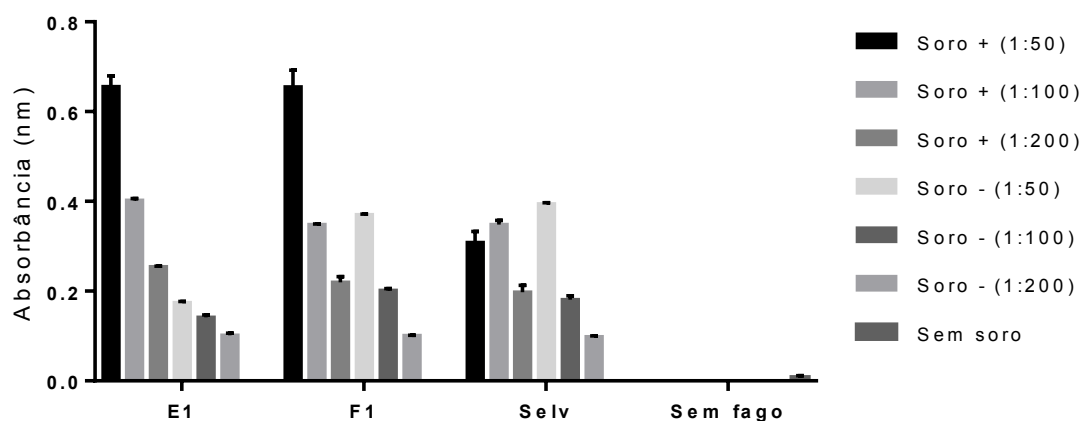


Figura 17. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para validação da reatividade dos dois clones mais reativos ao scFv (G7) com soro de camundongos BALB/c infectados com *P. berghei*-ANKA-GFP+ (soro +) e não infectados (soro -) em diferentes diluições (1:50, 1:100 e 1:200). Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.



## Discussão

### 5.1. Seleção de fragmento de anticorpo anti-GPI

No presente estudo, a molécula GPI foi escolhida como alvo terapêutico contra parasitos intracelulares pois tais moléculas ancoram proteínas de superfície, as quais estão envolvidas no processo de infecção, sobrevivência e escape da resposta imune do hospedeiro, induzindo resposta pró-inflamatória e modulando a resposta imune do hospedeiro contra o parasito (ALMEIDA et al., 2000; FERGUSON, 2000; YOSHIDA, 2006; ALVES; COLLI, 2008). Neste sentido, a construção de moléculas recombinantes de anticorpos específicos âncoras GPI, bem como o estudo da interação entre estas moléculas é de grande valia para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas contra doenças. Já que tantas doenças parasitárias humanas negligenciadas necessitam com urgência de novas drogas que sejam menos tóxicas para o hospedeiro e mais eficientes contra o parasito.

Devido à dificuldade de extrair grande quantidade de GPI de parasitos, utilizamos a engenharia reversa, através da técnica de *phage display*, para desenvolvimento de fragmento de anticorpo (scFv) contra GPI de *Plasmodium falciparum*. Visto que pequenos fragmentos de anticorpos têm sido cada vez mais utilizados como anticorpos monoclonais em aplicações terapêuticas. Sendo que um dos tipos mais comuns desses fragmentos são os scFv, pois já foram modificados em vários formatos e expressos em diferentes sistemas (WEISSER; HAL, 2009). Além disso, scFv são fragmentos menores em tamanho, incluindo apenas os domínios variável das cadeias pesada ( $V_H$ ) e leve ( $V_L$ ) e contém completos sítios de ligação ao antígeno, os quais podem estar associados por diferentes ligações químicas em diversas orientações, a fim de formar fragmentos monovalentes semelhantes aos scFv (WÖRN; PLÜCKTHUN, 2001). Tais fragmentos servem como unidade básica de ligação a diferentes antígenos e/ou reagentes, incluindo drogas, toxinas, vírus, átomos para tratamento de câncer, lipossomas para liberação melhorada de drogas, biossensores para detecção de molécula alvo em tempo real, dentre outros (HOLLIGER; HUDSON, 2005; CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2016).

Optamos pela utilização de scFv pois, devido ao seu tamanho pequeno, alguns aspectos da farmacodinâmica são favorecidos, além disso tais fragmentos são mais facilmente expressos em sistemas procarióticos (KUAN et al., 2010; CRIVIANU-GAITA; THOMPSON, 2016). Os fragmentos de anticorpos são expressos de forma econômica e facilmente submetido à engenharia genética, por isso são considerados candidatos terapêuticos atrativos. Além de apresentarem resultados terapêuticos superiores aos anticorpos de comprimento total em diversas aplicações médicas (WEISSER; HAL, 2009).

Algumas pesquisas têm utilizado scFv com finalidade terapêutica contra diferentes enfermidades, desde câncer de próstata (KESSLER et al., 2017; FRIEDRICH et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2012), leucemia (FRIEDRICH et al., 2014; LASZLO et al., 2014; KLINGER et al., 2012), câncer de pâncreas (CIOFFI et al., 2012), câncer colorretal (HERRMANN et al., 2010; OSADA et al., 2010), câncer de mama (WITTHAUER et al., 2009), até doenças no SNC (como Alzheimer) (CATTEPOEL et al., 2011). Além de serem utilizados para detecção de helmintos, tais como *Fasciola hepática* (NORBURY et al., 2019), *Strongyloides* sp. (MIGUEL et al., 2020; LEVENHAGEN et al., 2015), *Taenia solium* (RIBEIRO et al., 2013). Vale ressaltar que, a finalidade dos fragmentos selecionados nestes últimos trabalhos foi a aplicação em testes de diagnóstico, enquanto que no presente estudo objetivou-se a utilização do scFv como alternativa terapêutica contra doenças parasitárias. Demonstrando assim a versatilidade na utilização de tais fragmentos.

Já em relação a protozoários intracelulares, Kim et al. (2007) selecionaram scFv específico para *P. vivax*, demonstrando desempenhar um papel crítico na inibição da interação entre o parasito e o eritrócito do hospedeiro. Já Demeu et al. (2019) desenvolveram fragmentos monoclonais de cadeia simples a partir do anticorpo monoclonal mAb-10D8 (descrito em 1989) contra gp 35/50, proteína expressa nos estágios presentes no inseto vetor durante o ciclo de vida de *T. cruzi*, incluindo tripomastigotas metacíclicos.

No presente estudo, foi possível selecionar, a partir da tecnologia de *phage display*, oito clones de fragmento de anticorpo de cadeia simples (scFv) contra GPI de *Plasmodium falciparum*, sendo que um (G7) foi altamente reativo a este parasito e a outros parasitos intracelulares (*Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*), demonstrando seu amplo espectro. Tal fragmento é capaz de interferir na infectividade dos parasitos, diminuindo a invasão celular, o que pode ser observado durante os teste com *T. cruzi* e *T. gondii*.

O fragmento de anticorpo (G7) selecionado neste estudo diminuiu a carga parasitária de camundongos C57BL6 infectados com *P. berghei*-ANKA e melhorou a tolerância dos animais em relação aos sintomas de malária cerebral, aumentando 5 vezes a sobrevivência dos mesmos. Em malária cerebral, a coagulopatia intracerebral é limitante para o organismo, visto isto, o aumento da sobrevivência dos animais pode ter ocorrido pois o scFv-G7 pode ter diminuído a formação de microtrombos cerebrais, como observado por Wang et al. (2018). Com o objetivo de encontrar um potencial alvo terapêutico contra a malária, os autores descobriram que a inibição da glicólise utilizando 2-desoxi glicose (2DG) confere proteção contra a malária

cerebral em camundongos C57BL/6J. Corroborando com o presente estudo, a inibição desta via metabólica melhora a tolerância à doença, suprimindo os sinais clínicos dos animais.

Até o momento, as drogas utilizadas como medidas terapêuticas contra infecções parasitárias intracelulares (como malária, toxoplasmose e doença de Chagas) possuem muitos efeitos colaterais, além da baixa adesão por parte dos pacientes. Além disso, não tem sido explorado nenhum anticorpo gerado pela tecnologia de *phage display* para controlar infecções parasitárias (Goulart et al., 2017). Sendo o scFv- G7 o primeiro anticorpo contra GPI com aspecto de neutralização eficaz contra tais parasitoses.

Diante da semelhança estrutural das moléculas de GPI dos agentes causadores destas doenças, é possível que o fragmento de anticorpo (G7) selecionado no presente estudo possa interferir na ação destes parasitos durante a infecção e melhorar o quadro clínico do hospedeiro. Diante disto, mais estudos são necessário a fim de averiguar e confirmar tal hipótese.

## **5.2. Seleção de peptídeos ligantes de scFv anti-GPI**

A tecnologia de *Phage display* é utilizada tanto para a seleção de fragmentos de anticorpos quanto para a seleção de peptídeos miméticos. Diante disto, utilizou-se o fragmento de anticorpo (G7) para selecionar peptídeos recombinantes miméticos a GPI de *Plasmodium falciparum* (já que esta molécula foi utilizada para selecionar o scFv em questão).

Moléculas GPI, presentes em organismos eucariotos, ancoram proteínas importantes na interação parasito-hospedeiro e possuem alto grau de patogenicidade em parasitos como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* sp, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii*, além de induzir a produção de IgG específica (GARG et al., 1997; ILGOUTZ et al., 1999; ALMEIDA et al., 2000; NAIK et al., 2000; DEBIERRE-GROCKIEGO et al., 2003). Desta forma, peptídeos miméticos a molécula GPI tornam-se importantes candidatos a vacina, já que poderiam induzir a produção de anticorpos específicos.

Não se vê na literatura, a seleção e identificação de peptídeos miméticos não proteicos como a GPI, a serem utilizados em formulações vacinais. Neste sentido, o presente estudo é pioneiro, já que foi possível selecionar quatro peptídeos miméticos à GPI de *P. falciparum* (F1, E1, F2 e A6) que possuem alta afinidade ao scFv específico à GPI em questão. Além disso, os dois clones mais reativos foram capazes de distinguir soro do animal com malária e animal saudável. Tais peptídeos deverão passar por testes futuros a fim de observar suas ações como potenciais alvos vacinais e de diagnóstico.

A única vacina existente contra a malária, aprovada a partir de 2015 pela Organização Mundial da Saúde, é a RTS,S (Mosquirix). Uma vacina pré-eritrocítica constituída por uma proteína de fusão de *P. falciparum*, com demanda de quatro doses por indivíduo para gerar imunidade. Porém a mesma oferece proteção parcial ou de vida curta, com uso limitado em países endêmicos com transmissão intensa, além de causar efeitos colaterais que parecem superar os potenciais benefícios (MILLER; HOFFMAN, 1998; WHO, 2016b). Desta forma, estudos buscam por novas alternativas eficazes contra a doença em regiões mais atingidas pela doença.

Uma alternativa proposta por Bojan et al., (2001) seria a combinação de RTS, S com um ou mais dos antígenos do estágio sanguíneo do parasito que têm sido desenvolvidos como candidatos vacinais. Entretanto, seria necessária a investigação do uso da vacina em crianças.

Devido a semelhança estrutural da molécula GPI entre os parasitos intracelulares exemplificados neste estudo (*P. falciparum*, *T. gondii* e *T. cruzi*), é possível que os clones de peptídeos miméticos selecionados induzam resposta imune contra as doenças parasitárias causadas por estes agentes.

É visto que moléculas GPI de *T. cruzi*, por exemplo, as quais ancoram proteínas, induzem a maturação de células dendríticas através da ativação de TLR-2 (CAMPOS et al., 2001). Entre os principais componentes da superfície de *T. cruzi*, estão duas famílias de glicoproteínas GPI ancoradas, denominadas trans-sialidases e mucinas. Tais proteínas são boas candidatas a vacinas, já que induzem resposta imune no hospedeiro (ARCE-FONSECA et al., 2015).

Durantes muitos anos, inúmeros grupos de pesquisadores vêm testando o uso de proteínas recombinantes, vacinas de DNA ou vacinas tendo vírus recombinantes como vetores, expressando epítomos ou genes da família trans-sialidases com o objetivo de induzir resposta imune protetora contra a infecção por *T. cruzi* (GARG; TARLETON, 2002; BOSCARDIN et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2004; MACHADO et al., 2006; DE ALENCAR et al., 2009). Porém, apenas em 2015, Pereira e colaboradores propuseram uma vacina (rAdVax) utilizando sequência genética de trans-sialidase (rAdTS) e da proteína de superfície de formas amastigotas (rAdASP2). A vacina parece ser promissora na prevenção e recuperação de lesões teciduais cardíacas da doença de Chagas, porém os testes foram realizados apenas em modelo murino e, deve-se ressaltar que, pode não ser adequada para o homem.

Estudos recentes têm demonstrado alvos promissores para o desenvolvimento de vacinas contra a doença de Chagas, como uma serino-protease pertencente à família Protil

Oligopeptidase (POP) de 80 kDa de *T. cruzi* (Tc80), a qual participa do processão de adesão do parasito à célula hospedeira (BIVONA et al., 2018; GRELLIER et al., 2001). Porém, mais testes devem ser realizados a fim de confirmar sua eficácia e segurança para uso em humanos.

O cenário vacinal para toxoplasmose não está muito diferente, já que a única vacina licenciada para uso veterinário (TOXOVAX) apresenta risco de infecção para humanos e animais (YIN et al., 2015). Além disto, 111 anos após a descrição da espécie *T. gondii*, ainda não existe uma vacina eficaz contra a toxoplasmose humana e a grande maioria das pesquisas são destinadas ao hospedeiro felino (ZULPO et al., 2017). O que se observa é a ausência de estudos recentes com ênfase no desenvolvimento de vacinas contra a doença em humanos. Deixando os pacientes à mercê de medicamentos inespecíficos, os quais devem ser administrados por um longo período de tempo e apenas tratam os sintomas, não eliminando o parasito.

Diante do exposto, as moléculas selecionadas no presente estudo são de grande relevância para o desenvolvimento da pesquisa científica e saúde pública, já que parecem promissoras tanto no uso terapêutico, quanto vacinal e/ou para diagnóstico dessas doenças parasitárias.

## Conclusão

Neste estudo foi possível selecionar um clone de fragmentos de anticorpos de cadeia simples (scFv), por meio da tecnologia de *phage display*, altamente reativo à GPI de *P. falciparum*. O clone G7 foi caracterizado e, em experimentos *in vivo*, mostrou ser capaz de aumentar em até cinco vezes a sobrevivência de camundongos C57 BL/6 infectados com *P. berghei*-cepa ANKA. Interessantemente, o clone G7 reconheceu GPI de outros protozoários parasitos intracelulares no ensaio imunoenzimático, sendo eles *T. cruzi* e *T. gondii*. Nos testes *in vitro*, o clone G7 demonstrou não apresentar toxicidade a mioblastos murinos, sendo capaz de diminuir significativamente a invasão celular por *T. cruzi* e *T. gondii*. Estes resultados indicam que o clone G7 selecionado pode ser promissor no tratamento de doenças parasitárias como malária, toxoplasmose e doença de Chagas. Porém, futuros estudos *in vivo* precisam ser realizados a fim de analisar mais profundamente a ação e os benefícios do fragmento.

A partir do clone G7, foi possível selecionar, através da mesma tecnologia, quatro peptídeos miméticos à molécula GPI de *P. falciparum*, com alta reatividade ao fragmento scFv. Sendo que, dois deles conseguem distinguir soro de animais infectados com *P. berghei*-cepa ANKA e animais saudáveis. Mais estudos devem ser realizados com o intuito de investigar a ação desses peptídeos, já que os mesmos poderiam induzir resposta imune contra doenças parasitárias como malária, toxoplasmose e doença de Chagas. Além disto, tais peptídeos poderiam ser utilizados em testes de diagnóstico para essas enfermidades.



## **Referências bibliográficas**

ABEL, L. C. J.; RIZZO, L. V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmun.**, v. 17, p. 99-108, 2001. <https://doi.org/10.1006/jaut.2001.0523>

ABEL, L.C.J., FERREIRA, L.R.P., NAVARRO, I.C., BARON, M.A., KALIL, J., GAZZINELLI, R.T., RIZZO, L.V., CUNHA-NETO, E. Induction of IL-12 production in human peripheral monocytes by *Trypanosoma cruzi* is mediated by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-Like glycoproteins and potentiated by IFN- $\gamma$  and CD40-CD40L interactions. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/345659>

AGHEBATI-MALEKI, L.; BAKHSHINEJAD, B.; BARADARAN, B.; MOTALLEBNEZHAD, M.; AGHEBATI-MALEKI, A.; NICKHO, H.; YOUSEFI, M.; MAJIDI, J. Phage display as a promising approach for vaccine development. **J. Biomed. Sci.**, v. 29, p. 23-66, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0285-9>

AHMAD, S. ZUHaida, A. A.; SWEE, K. Y. ABDUL, M. A.; WAN, Y. H.; NOORJAHAN, B. M. A.; MUHAJIR, H. scFv antibody: Principles and clinical application. **Clin. Dev. Immun.**, v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>

AKTER, J., KHOURY, D.S., AOGO, R., et al. *Plasmodium*-specific antibodies block in vivo parasite growth without clearing infected red blood cells. **PLoS Pathog.**, v. 15, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007599>

ALANO, P. *Plasmodium* sexual stage antigens. **Parasitol Today**, v. 7, p. :199-203, 1991. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90138-E](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90138-E)

ALECRIM, M.G.C., CARVALHO, L.M., FERNANDES, M.C., ANDRADE, S.D., LOUREIRO, A.C., ARCANJO, A.R., ALECRIM, W.D. Tratamento da malária com artesunate (retocapsa) em crianças da Amazônia brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 163-168, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822000000200001>

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T.; FERGUSON, M. A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. **EMBO J.**, v. 19, p. 1476-1485, 2000. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1476>

ALOISE, D. A., COURA-VITAL, W., CARNEIRO, M., RODRIGUES, M.V., TOSCANO, G.A.S., SILVA, R.B., NETO, V.F.A., VITOR, R.W.A. Seroprevalence and risk factors for human toxoplasmosis in northeastern Brazil. **Rev Patol Trop**, v. 46, p. 307-320, 2017. <https://doi.org/10.5216/rpt.v46i4.51013>

ALVES, M.J., COLLI, W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. **Subcell Biochem.**, v. 47, p. 58-69, 2008. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_4)

ANDRADE, G.M., VASCONCELOS-SANTOS, D.V., CARELLOS, E.V., ROMANELLI, R.M.C., VITOR, R.W.A., CARNEIRO, A.C.A.V., et al. Congenital toxoplasmosis from a

chronically infected woman with reactivation of retinochoroiditis during pregnancy. **J Pediatr**, v. 86, p. 85-8, 2010. <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.1948>

ANDRADE, J. P. NETO, J. A. M.; PAOLA, A. A. V.; VILAS-BOAS, F.; OLIVEIRA, G. M. M.; BACAL, F.; BOCCHI, E. A.; ALMEIDA, D. R.; FILHO, A. A. F.; MOREIRA, M. C. V.; XAVIER, S. S. V; JUNIOR, W. A. O.; DIAS, J. C. P. et al. Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 96, p. 434-442, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011000600002>

ANTAS, P. R.; MEDRANO-MERCADO, N.; TORRICO, F.; UGARTE-FERNANDEZ, R.; GÓMEZ, F.; CORREA OLIVEIRA, R.; CHAVES, A. C.; ROMANHA, A. J.; ARAÚJOJORGE, T. C. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 61, p. 308-314, 1999. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.308>

ANTCZAK, M., DZITKO, K., DŁUGOŃSKA, H. Human toxoplasmosis— searching for novel chemotherapeutics. **Biomed Pharmacother**, v. 82, p. 677–684, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.05.041>

ARAÚJO, A.C., VILLELA, M.M., SENA-LOPES, Â., et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in a human rural population of Southern Rio Grande do Sul. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 60, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860028>

ARCE-FONSECA, M., RIOS-CASTRO, M., CARRILLO-SÁNCHEZ SDEL, C., MARTÍNEZ-CRUZ, M., RODRÍGUEZ-MORALES, O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. **Parasit Vectors**, v. 8, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0738-0>

ARAI, M., BILLKER, O., MORRIS, H.R., PANICO, M., DELCROIX, M., DIXON, D., LEY, S.V., SINDEN, R.E. Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of *Plasmodium* in the midgut of the mosquito. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, p. 17–24, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00299-7](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00299-7)

ARSENJEVIC, D., GIRARDIER, L., SEYDOUX, J., CHANG, H. R., DULLOO, A. G. Altered energy balance and cytokine gene expression in a murine model of chronic infection with *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Physiol.** v, 272, 1997. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.272.5.E908>

AZZAZY, H.M.E.; HIGHTSMITH, W.E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0009-9120\(02\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9120(02)00343-0)

AZZOUZ, N., SHAMS-ELDIN, H., NIEHUS, S., DEBIERRE-GROCKIEGO, F., BIEKER, U., SCHMIDT, J., MERCIER, C., DELAUW, M. F., DUBREMETZ, J. F., SMITH, T. K., SCHWARZ, R. T. *Toxoplasma gondii* grown in human cells uses GalNAc-containing glycosylphosphatidylinositol precursors to anchor surface antigens while the immunogenic

Glc-GalNAc-containing precursors remain free at the parasite cell surface. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 38, p. 1914–1925, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.006>

BAATZ, H., MIRSHAHI, A., PUCHTA, J., GÜMBEL, H., HATTENBACH, L.O. Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. **Ocul Immunol Inflamm.** v. 14, p. 185–187, 2006. <https://doi.org/10.1080/09273940600659740>

BAFICA, A.; SA NTIAGO, H. C.; GOLDSZMID, R.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R. T.; SHER, A. Cuttingedge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88- dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 177, p. 3515-3519, 2006. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>

BAKSHINEJAD, B.; SADEGHIZADEH, M. Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection. **World J. Gastroenterol.**, v. 7, p. 11671-11683, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11671>

BANNISTER L; MITCHELL G. The ins, outs and roundabouts of malaria. **Trends in Parasitology**, v. 19, p. 209–213, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00086-2)

BARBAS, C. F. III, BURTON, D. R., SCOTT, J.K., SILVERMAN, G.J. **Phage Display: A Laboratory Manual.** 2001.

BARRAGAN, A., BROSSIER, F., AND SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. **Cell. Microbiol.**, v. 7, p. 561–568, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x>

BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14694-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14694-6)

BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **World J. Exp. Med.**, v. 20, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.5493/wjem.v3.i1.1>

BENCHIMOL BARBOSA, P. R. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Int. J. Cardiol.**, v. 112, p. 132-133, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.11.087>

BENZIGER, C. P.; DO CARMO, G. A. L.; RIBEIRO, A. L. P. Chagas cardiomyopathy clinical presentation and management in the Americas. **Cardiol. Clin.**, v. 35, p. 31-47, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2016.08.013>

BETANCOURT, D. E., HAMID, B., FABIAN, B.T., KLOTZ, C., HARTMANN, S., SEEBER, F. From entry to early dissemination-*Toxoplasma gondii*'s initial encounter with its host. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 2019; 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00046>

BERI, D.; BALAN, B.; TATU, U. Commit, hide and escape: the story of *Plasmodium* gametocytes. **Parasitology.** 2018. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000926>

BILLKER, O., LINDO, V., PANICO, M., ETIENNE, A.E., PAXTON, T., DELL, A., ROGERS, M., SINDEN, R.E., MORRIS, H.R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. **Nature**, v. 392, p. 289–292, 1998. <https://doi.org/10.1038/32667>

BIVONA, A.E., SÁNCHEZ, A. A., MATOS, M.N., et al. *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 12, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006384>

BOJANG, K.A., MILLIGAN, P.J., PINDER, M., et al. Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. **Lancet.**, v. 358, p. 1927-1934, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06957-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06957-4)

BOSCARDIN, S.B., KINOSHITA, S.S., FUJIMURA, A.E., RODRIGUES, M.M. Immunization with Cdna expressed by amastigotes of *Trypanosoma cruzi* elicits protective immune response against experimental infection. **Infect Immun.**, p. 71: 2744–2757, 2003. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2744-2757.2003>

BOULOS, M., DUTRA, A.P., DISANTI, S.M., SHIROMA, M., AMATO NETO V. Avaliação clínica do quinino para o tratamento de malária por *Plasmodium falciparum*. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 30, p. 211-213, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821997000300007>

BOUSEMA, J., DRAKELEY, C., SAUERWEIN, R. Sexual-stage antibody responses to *P. falciparum* in endemic populations. **Curr Mol Med.**, v. 6, p. 223–9, 2006. <https://doi.org/10.2174/156652406776055140>

BOUSEMA, T., OKELL, L., SHEKALAGHE, S., GRIFFIN, J.T., OMAR, S., SAWA, P., et al. Revisiting the circulation time of *Plasmodium falciparum* gametocytes: molecular detection methods to estimate the duration of gametocyte carriage and the effect of gametocytocidal drugs. **Malar J.**, v. 9, 2010a. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-9-136>

BOUSEMA, T., ROEFFEN, W., MEIJERINK, H., MWERINDE, H., MWAKALINGA, S., VAN GEMERT, G. J., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., MOSHA, F., TARGETT, G., RILEY, E. M., SAUERWEIN, R., DRAKELEY, C. The dynamics of naturally acquired immune responses to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens Pfs230 & Pfs48/45 in a low endemic area in Tanzania. **PLoS ONE**, v. 5, 2010b. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014114>

BOYLE, M. J., REILING, L., FENG, G., LANGER, C., OSIER, F. H., ASPELINGJONES, H., CHENG, Y. S., STUBBS, J., TETTEH, K. K., CONWAY, D. J., MCCARTHY, J. S., MULLER, I., MARSH, K., ANDERS, R. F. AND BEESON, J. G. Human antibodies fix complement to inhibit *Plasmodium falciparum* invasion of erythrocytes and are associated with protection against malaria. **Immunity**, v. 42, p. 580–590, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.012>

BRASIL, P., ZALIS, M.G., DE PINA-COSTA, A., et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological

investigation. **Lancet Glob Health.**, v. 5, p. 1038-1046, 2017. [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(17\)30333-9](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(17)30333-9)

BRATKOVIČ, T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. **Cell. mol. life sci.**, v. 3, p. 749–767, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0192-2>

BRENE R, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 347 -382, 1973. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>

BRICEÑO MP, NASCIMENTO LA, NOGUEIRA NP, BARENCO PV, FERRO EA, REZENDE-OLIVEIRA K, GOULART LR, ALVES PT, BARBOSA BDE F, LIMA WR, SILVA NM. *Toxoplasma gondii* infection promotes epithelial barrier dysfunction of caco-2 cells. **J Histochem Cytochem**, v. 64, n. 8, p. 459-69, 2016. <https://doi.org/10.1369/0022155416656349>

BRIGHT, A.T., MANARY, M.J., TEWHEY, R., ARANGO, E.M., WANG, T., SCHORK, N.J., YANOW, S.K., WINZELER, E.A. A high resolution case study of a patient with recurrent *Plasmodium vivax* infections shows that relapses were caused by meiotic siblings. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002882>

BRÍGIDO, M.M., MARANHÃO, A.Q. Bibliotecas apresentadas em fagos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BUXTON, D., INNES, E.A. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 110, p. 11- 6, 1995. <https://doi.org/10.1017/S003118200000144X>

CAMPOS M.A., ALMEIDA I. C., TAKEUCHI O., AKIRA S., VALENTE E. P., PROCOPIO D O. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. immunol.**, v. 167, p. 416-423, 2001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>

CARDOSO, R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; RODRIGUES, V.M. et al. Peptide mimicking antigenic and immunogenic epitope of neuwiedase from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Toxicon**, v.53, n.2, p.254-261, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.11.009>

CARDOSO, S. M.; CUNHA, J. L. R.; BARTHOLOMEU, D. C. Evasion of immune response by *Trypanosoma cruzi* during acute infection. **Front. Immunol.**, v. 6, p. 1-11, 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>

CARMO, E.L., MORAIS, R.A.P.B. , OLIVEIRA, A.S. , FIGUEREDO, J.E. , FIGUEREDO, M.C., SILVA, A.V., BICHARA, C.N.C., PÓVOA, M.M. Soroepidemiologia da infecção pelo *Toxoplasma gondii* no Município de Novo Repartimento, Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, p. 79-87, 2016. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232016000400010>

CARNEIRO, A. P.; REIS, C. F.; MORARI, E. C.; MAIA, Y. C.; NASCIMENTO, R.; BONATTO, J. M.; de SOUZA, M. A.; GOULART, L. R.; WARD, L. S. A putative OUT domain-containing protein 1 deubiquitinating enzyme is differentially expressed in thyroid

cancer and identifies less-aggressive tumours. **Br. J. Cancer**, v. 111, p. 551-558, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.331>

CATTEPOEL, S., HANENBERG, M., KULIC, L., NITSCH, R.M. Chronic intranasal treatment with an anti-A $\beta$ (30-42) scFv antibody ameliorates amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. **PLoS One**, v. 6, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018296>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Malaria. Disponível em <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>. Acesso em 04 de maio de 2020.

CHAN, J. A., FOWKES, F. J. AND BEESON, J. G. Surface antigens of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes as immune targets and malaria vaccine candidates. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 3633–3657, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1614-3>

CHEN, I. C.; CHIU, Y. K.; YU, C. M.; LEE, C. C.; TUNG, C. P.; TSOU, Y. L.; HUANG, Y. J.; CHEN, H. S.; WANG, A. H.; YANG, A. S. High throughput discovery of influenza virus neutralizing antibodies from phage-displayed synthetic antibody libraries. **Sci. Rep.**, v. 31, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14823-w>

CHURCH, L.W., LE, T.P., BRYAN, J.P., GORDON, D.M., EDELMAN, R., FRIES, L., DAVIS, J.R., HERRINGTON, D.A., CLYDE, D.F., SHMUKLARSKY, M.J., SCHNEIDER, I., MCGOVERN, T.W., CHULAY, J.D., BALLOU, W.R., HOFFMAN, S.L. Clinical manifestations of *Plasmodium falciparum* malaria experimentally induced by mosquito challenge. **Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 915–920, 1997. <https://doi.org/10.1086/513990>

CIOFFI, M., DORADO, J., BAEUERLE, P.A., HEESCHEN, C. EpCAM/CD3-Bispecific T-cell engaging antibody MT110 eliminates primary human pancreatic cancer stem cells. **Clin Cancer Res.**, v. 18, p. 465-474, 2012. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1270>

CLOUGH, B., WRIGHT, J. D., PEREIRA, P. M., HIRST, E. M., JOHNSTON, A. C., HENRIQUES, R., et al. K63-linked ubiquitination targets *Toxoplasma gondii* for endolysosomal destruction in IFN $\gamma$ -stimulated human cells. **PLoS Pathog.**, v. 12, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006027>

CLOUGH, B., FRICKEL, E.M. The *Toxoplasma* parasitophorous vacuole: an evolving host-parasite frontier. **Trends Parasitol.**, v. 33, p. 473-488, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.02.007>

COHEN, S., MC, G.I., CARRINGTON, S. Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria. **Nature**, v. 192, p. 733–737, 1961. <https://doi.org/10.1038/192733a0>

CONWAY, D.J, ROPER, C., ODUOLA, A.M., ARNOT, D.E., KREMSNER, P.G., GROBUSCH, M.P., CURTIS, C.F., GREENWOOD, B.M. High recombination rate in natural populations of *Plasmodium falciparum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 96, 4506–4511, 1999. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4506>



- COOMBES, J. L., CHARARSAR, B. A., HAN, S.-J., HALKIAS, J., CHAN, S. W., KOSHY, A. A., et al. Motile invaded neutrophils in the small intestine of *Toxoplasma gondii*-infected mice reveal a potential mechanism for parasite spread. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 110, p. 1913–1922, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220272110>
- COSTA, L.E.; GOULART, L.R.; PEREIRA, N.C.; LIMA, M.I.; DUARTE, M.C.; MARTINS, V.T.; LAGE, P.S.; MENEZES-SOUZA, D.; RIBEIRO, T.G.; COELHO, E.A.; et al. Mimotope-based vaccines of *Leishmania infantum* antigens and their protective efficacy against visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110014>
- COSTA, I. N., ANGELONI, M. B., SANTANA, L. A., BARBOSA, B. F., SILVA, M. C. P., RODRIGUES, A. A., ROSTKOWSA, C., MAGALHÃES, P. M., PENA, J. D. O., SILVA, D. A. O., MINEO, J. R., AND FERRO, E. A. V. Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Placenta**, v. 30, p. 884-890. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.08.002>
- COWMAN, A.F., HEALER, J., MARAPANA, D., MARSH, K. Malaria: biology and disease. **Cell**, v. 167, p. 610–624, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- CRIVIANU-GAITA, V., THOMPSON, M. Aptamers, antibody scFv, and antibody Fab' fragments: an overview and comparison of three of the most versatile biosensor biorecognition elements. **Biosens Bioelectron**, v. 85, p. 32–45, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.04.091>
- CUCUNUBÁ, Z. M.; OKUWOGA, O.; BASÁÑEZ, M. G.; NOUVELLET, P. Increased mortality attributed to Chagas disease: a systematic review and meta-analysis. **Parasit. Vectors**, v. 9, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1315-x>
- CUNHA-NETO, E.; CHEVILLARD, C. Chagas disease cardiomyopathy: immunopathology and genetics. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/683230>
- DARD, C., FRICKER-HIDALGO, H., BRENIER-PINCHART, M.P., PELLOUX, H. Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis. **Trends Parasitol.**, v. 32, p. 492-506, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.001>
- De ALENCAR, B.C., PERSECHINI, P.M., HAOLLA, F.A., DE OLIVEIRA, G., SILVERIO, J.C, et al. Perforin and gamma interferon expression. Are required for CD4+ and CD8+T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. **Infect Immun**, v. 77, p. 4383–4395, 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.01459-08>
- DEANS, A.M., LYKE, K.E., THERA, M.A., PLOWE, C.V., KONE, A., et al. Low multiplication rates of African *Plasmodium falciparum* isolates and lack of association of multiplication rate and red blood cell selectivity with malaria virulence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, p. 554–563, 2006. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2006.74.554>
- DEBIERRE-GROCKIEGO, F., AZZOUZ, N., SCHMIDT, J., et al. Roles of glycosylphosphatidylinositols of *Toxoplasma gondii*. Induction of tumor necrosis factor-alpha



- production in macrophages. **J Biol Chem.**, v. 278, p. 32987-32993, 2003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304791200>
- DEGRANDI, D., KRAVETS, E., KONERMANN, C., BEUTER-GUNIA, C., KLÜMPERS, V., LAHME, S., et al. Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 110, p. 294–299, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205635110>
- DELORENZI, M., SEXTON, A., SHAMS-ELDIN, H., SCHWARZ, R.T., SPEED, T., SCHOFIELD, L. Genes for glycosylphosphatidylinositol toxin biosynthesis in *Plasmodium falciparum*. **Infect Immun.**, v. 70, p. 4510-4522, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.8.4510-4522.2002>
- DELVES, M. *et al.* The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: A Comparative Study with Human and Rodent Parasites. **Plos Medicine**, v. 9, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001169>
- DEMEU, L.M.K., SOARES, R.J., MIRANDA, J.S., et al. Engineering a single-chain antibody against *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes to block cell invasion. **PLoS One**, v. 14, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223773>
- De SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cell Biol.**, v. 86, p. 197- 283, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60180-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60180-1)
- DOLIWA, C., ESCOTTE-BINET, S., AUBERT, D., VELARD, F., SCHMID, A., GEERS, R., VILLENA, I. Induction of sulfadiazine resistance in vitro in *Toxoplasma gondii*. **Exp Parasitol**, v. 133, p. 131–136, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.11.019>
- DONDORP, A., NOSTEN, F., STEPNIEWSKA, K., DAY, N., WHITE, N. South East Asian quinine artesunate malaria trial (SEAQUAMAT) group. Artesunate versus quinine for treatment of severe falciparum malaria: a randomised trial. **Lancet.**, v. 366, p. 717-725, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67176-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67176-0)
- DONDORP, A.M., FANELLO, C.I., HENDRIKSEN, I.C., et al. Artesunate versus quinine in the treatment of severe falciparum malaria in African children (AQUAMAT): an open-label, randomised trial. **Lancet.**, v. 376, p. 1647-1657, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61924-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61924-1)
- DUBEY, J. P., SPEER, C. A., SHEN, S. K., KWOK, O. C., BLIXT, J. A. Oocyst-induced murine toxoplasmosis: life cycle, pathogenicity, and stage conversion in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **J. Parasitol.**, v. 83, p. 870–882, 1997. <https://doi.org/10.2307/3284282>
- DUBEY, J. P., LINDSAY D. S., AND SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, 1998. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

DUBEY, J.P., LAGO, E.G., GENNARI, S.M., SU, C., JONES, J.L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**, v. 139, p. 1375-424, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0031182012000765>

DUMONTEIL, E.; BOTTAZZI, M. E.; ZHAN B, HEFFERNAN, M. J.; JONES, K.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S.; ORTEGA, J.; ROSALES, S. P.; LEE, B. Y.; BACON, K. M.; FLEISCHER, B.; SLINGSBY, B. T.; CRAVIOTO, M. B.; TAPIACONYER, R.; HOTEZ, P. J. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Expert. Rev. Vaccines**, v. 11, p. 1043-1055, 2012. <https://doi.org/10.1586/erv.12.85>

DUNCAN, C. J., HILL, A. V. AND ELLIS, R. D. Can growth inhibition assays (GIA) predict blood-stage malaria vaccine efficacy? **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 8, p. 706–714, 2012. <https://doi.org/10.4161/hv.19712>

DUTTA, S., SULLIVAN, J. S., GRADY, K. K., HAYNES, J. D., KOMISAR, J., BATCHELOR, A. H., SOISSON, L., DIGGS, C. L., HEPPNER, D. G., LANAR, D. E., COLLINS, W. E. AND BARNWELL, J. W. High antibody titer against apical membrane antigen-1 is required to protect against malaria in the Aotus model. **PLoS ONE**, v. 4, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008138>

ENOMOTO, M. *et al.* Blockage of Spontaneous Ca<sup>2+</sup> Oscillation Causes Death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. **Plos One**, v. 7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039499>

ESCH, K.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 58 -8 5, 2013. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>

FAIRHURST, R.M., WELLEMS, T.E. Modulation of malaria virulence by determinants of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1 display. **Curr Opin Hematol**, v. 13, p. 124–130, 2006. <https://doi.org/10.1097/01.moh.0000219655.73162.42>

FEITOSA, TF, BRASIL, AWL, PARENTONI, RN, VILELA, VLR, NETY, TFL, PENA, HFJ. Anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mamíferos, aves e répteis no parque zoológico em João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, vol.84, 2017. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000022016>

FERGUSON, M.A.J., WILLIAMS, A.F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosylphosphatidylinositol structures. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 57, p. 285-320, 1988. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.001441>

FERGUSON, MA. What can GPI do for you? **Parasitol Today**, v. 10, p. 48-52, 1994. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(94\)90392-1](https://doi.org/10.1016/0169-4758(94)90392-1)

FERGUSON, MA, BRIMACOMBE JS, BROWN JR, et al. The GPI biosynthetic pathway as a therapeutic target for African sleeping sickness. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, p. 327-340, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(99\)00058-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(99)00058-7)

FERGUSON, MA. Glycosylphosphatidylinositol biosynthesis validated as a drug target for African sleeping sickness. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 97, p. 10673-10675, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10673>

FERREIRA FB, DE MACÊDO-JÚNIOR AG, LOPES CS, SILVA MV, RAMOS ELP, JÚNIOR ÁF, VITALIANO SN, SANTIAGO FM, SANTOS ALQ, MINEO JR, MINEO TWP. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* infection in *Melanosuchus niger* (Spix, 1825) and *Caiman crocodilus* (Linnaeus, 1758). **Int J Parasitol Parasites Wildl.**, v. 12, p. 42-45, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2020.04.008>

FILIGHEDDU, M. T.; GÓRGOLAS, M.; RAMOS, J. M. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. **Med. Clin. (Barc.)**, v. 148, p. 125-131, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>

FLEGR, J., PRANDOTA, J., SOVIČKOVÁ, M., ISRAILLI, Z.H. Toxoplasmosis: a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. **PLoS ONE**, v. 9, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090203>

FOLGORI, A. et al. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 13, p. 2236-2243, 1994. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06501.x>

FOWKES, F.J., BOEUF, P., BEESON, J.G. Immunity to malaria in an era of declining malaria transmission. **Parasitology**, v. 143, p. 139-153, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001249>

FRANCO, P. S., GOMES, A. O., BARBOSA, B. F., ANGELONI, M. B., SILVA, N. M., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., SILVA, D. A. O., MINEO, J. R., FERRO, E. A. V. Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. **Placenta**, v. 32, p. 838-844, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.08.012>

FRIEDRICH, M., RAUM, T., LUTTERBUESE, R., VOELKEL, M., DEEGEN, P., RAU, D., et al. Regression of Human Prostate Cancer Xenografts in Mice by AMG 212/BAY2010112, a Novel PSMA/CD3-Bispecific BiTE Antibody Cross-Reactive with Non-Human Primate Antigens. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, p. 2664–2673, 2012. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0042>

FRIEDRICH, M., HENN, A., RAUM, T., et al. Preclinical characterization of AMG 330, a CD3/CD33-bispecific T-cell-engaging antibody with potential for treatment of acute myelogenous leukemia. **Mol Cancer Ther**, v. 13, p. 1549-1557, 2014. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0956>

FRIMPONG, A., KUSI, K.A., TORNYIGAH, B. et al. Characterization of T cell activation and regulation in children with asymptomatic *Plasmodium falciparum* infection. **Malar J**, v. 17, n. 263, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2410-6>

- FRITZ, H. M., BOWYER, P. W., BOGYO, M., CONRAD, P. A., BOOTHROYD, J. C. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. **PLoS ONE**, v. 7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029955>
- FUJITA, M.; KINOSHITA, T. Structural remodeling of GPI anchors during biosynthesis and after attachment to proteins. **FEBS Lett.**, v. 584, p. 1670-1677, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.079>
- GARG, N., POSTAN, M., MENSA-WILMOT, K., TARLETON, R.L. Glycosylphosphatidylinositols are required for the development of *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **Infect Immun.**, v. 65, p. 4055-4060, 1997. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.10.4055-4060.1997>
- GARG, P. Filamentous bacteriophage: A prospective platform for targeting drugs in phage-mediated cancer therapy. **J Cancer Res Ther.**, v. 15, 2019. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_218\\_18](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_218_18)
- GARG, N., Tarleton, R.L. Genetic immunization elicits antigen-specific protective immune responses and decreases disease severity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.**, v. 70, p. 5547–5555, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5547-5555.2002>
- GARRIDO-CARDENAS, J.A., GONZÁLEZ-CERÓN, L., MANZANO-AGUGLIARO, F., MESA-VALLE, C. *Plasmodium* genomics: an approach for learning about and ending human malaria. **Parasitol Res.**, v. 118, p. 1-27, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6127-9>
- GAY, G., BRAUN, L., BRENIER-PINCHART, M. P., VOLLAIRE, J., JOSSERAND, V., BERTINI, R. L., et al. *Toxoplasma gondii* TgIST co-opts host chromatin repressors dampening STAT1-dependent gene regulation and IFN- $\gamma$  -mediated host defenses. **J. Exp. Med.**, v. 213, p. 1779–1798, 2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20160340>
- GETHING, P.W., ELYAZAR, I.R., MOYES, C.L., SMITH, D.L., BATTLE, K.E., GUERRA, C.A., PATIL, A.P., TATEM, A.J., HOWES, R.E., MYERS, M.F., GEORGE, D.B., HORBY, P., WERTHEIM, H.F., PRICE, R.N., MUELLER, I., BAIRD, J.K., HAY, S.I. A long neglected world malaria map: *Plasmodium vivax* endemicity in 2010. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001814>
- GONÇALVES, L.A., CRAVO, P., FERREIRA, M.U. Emerging *Plasmodium vivax* resistance to chloroquine in South America: an overview. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, p. 534–539, 2014. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130579>
- GOUAGNA, L.C., FERGUSON, H.M., OKECH, B.A., KILLEEN, G.F., KABIRU, E.W., BEIER, J.C., GITHURE, J.I., YAN, G. *Plasmodium falciparum* malaria disease manifestations in humans and transmission to *Anopheles gambiae*: a field study in Western Kenya. **Parasitology**, v. 128, p. 235–243, 2004. <https://doi.org/10.1017/S003118200300444X>

- GOULART, L.R., RIBEIRO, V.S., COSTA-CRUZ, J.M. Anti-parasitic Antibodies from Phage Display. **Recombinant Antibodies for Infectious Diseases, Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1053, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_8)
- GOV, L., KARIMZADEH, A., UENO, N., LODOEN, M. B. Human innate immunity to *Toxoplasma gondii* is mediated by host caspase-1 and ASC and parasite GRA15. **MBio**, v. 4, p.255–213, 2013. <https://doi.org/10.1128/mBio.00255-13>
- GOV, L., SCHNEIDER, C. A., LIMA, T. S., PANDORI, W., AND LODOEN, M. B. NLRP3 and potassium efflux drive rapid IL-1b release from primary human monocytes during *Toxoplasma gondii* infection. **J. Immunol.**, v. 199, p. 2855–2864, 2017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700245>
- GOWDA, D.C. Structure and activity of glycosylphosphatidylinositol anchors of *Plasmodium falciparum*. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 983-990, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)01619-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01619-2)
- GRAU, G.E., CRAIG, A.G. Cerebral malaria pathogenesis: Revisiting parasite and host contributions. **Future Microbiol**, v. 7, p. 291–302, 2012. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.155>
- GREGG, B., TAYLOR, B. C., JOHN, B., TAIT-WOJNO, E. D., GIRGIS, N. M., MILLER, N., et al. Replication and distribution of *Toxoplasma gondii* in the small intestine after oral infection with tissue cysts. **Infect. Immun.**, v. 81, p. 1635–1643, 2013. <https://doi.org/10.1128/IAI.01126-12>
- GRELLIER, P., VENDEVILLE, S., JOYEAU, R., et al. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. **J Biol Chem.**, v. 276, p. 47078-47086, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106017200>
- GROOM, Z. C., PROTOPAPAS, A. D., ZOCHIOS, V. Tropical diseases of the myocardium: a review. **Int. J. Gen. Med.**, v. 10, p. 101–111, 2017. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S130828>
- GUEDES, P. M. M.; GUTIERREZ, F. R. S.; MAIA, F. L.; MILANEZI, C. M.; SILVA, G. K.; PAVANELLI, W. R.; SILVA, J. S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e604, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>
- GÜRTLER, R. E.; SEGURA, E. L.; COHEN, J. E. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 9, p. 29-32, 2003. <https://doi.org/10.3201/eid0901.020274>
- HARKER, K. S., UENO, N., AND LODOEN, M. B. *Toxoplasma gondii* dissemination: a parasite’s journey through the infected host. **Parasite Immunol**, v. 37, p. 141–149, 2015. <https://doi.org/10.1111/pim.12163>
- HERRMANN, I., BAEUERLE, P.A., FRIEDRICH, M., MURR, A., FILUSCH, S., RUTTINGER, D., et al. Highly efficient elimination of colorectal tumor-initiating cells by an

EpCAM/CD3-bispecific antibody engaging human T Cells. **PLoS ONE**, v. 5, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013474>

HILL, D. L., ERIKSSON, E. M., LI WAI SUEN, C. S., CHIU, C. Y., RYGCORNEJO, V., ROBINSON, L. J., SIBA, P. M., MUELLER, I., HANSEN, D. S., SCHOFIELD, L. Oponising antibodies to *P. falciparum* merozoites associated with immunity to clinical malaria. **PLoS ONE**, v. 8, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074627>

HOLLIGER, P., HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat Biotechnol.**, v. 23, p. 1126-1136, 2005. <https://doi.org/10.1038/nbt1142>

HORA, R., KAPOOR, P., THIND, KK, MISHRA, PC. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. **Metab Brain Dis**, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11011-015-9787-5>

HUNTER, C. A., ROBERTS, C. W., ALEXANDER, J. Kinetics of cytokine mRNA production in the brains of mice with progressive toxoplasmic encephalitis. *Eur. J. Immunol.*, v. 22, p. 2317–2322, 1992. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220921>

IKEZAWA, H. Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. **Biol Pharm Bull**, v. 25, p. 409–417, 2002. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.409>

ILGOUTZ, S.C., ZAWADZKI, J.L., RALTON, J.E., MCCONVILLE, M.J. Evidence that free GPI glycolipids are essential for growth of *Leishmania mexicana*. **EMBO J.**, v. 18, p. 2746-2755, 1999. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2746>

INSTITUTO BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ. Casos de doença de chagas têm aumento de 216% em 2016 no Acre. (2016) Disponível em: <<https://www.bio.fiocruz.br/index.php/noticias/1282-casos-de-doenca-de-chagas-tem-aumento-de-216-em-2016-no-acre>>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2020.

JEROME, M. E., RADKE, J. R., BOHNE, W., ROOS, D. S., WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* bradyzoites form spontaneously during sporozoite-initiated development. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 4838–4844, 1998. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.10.4838-4844.1998>

JOHNSTON, A. C., PIRO, A., CLOUGH, B., SIEW, M., VIRREIRA WINTER, S., COERS, J., et al. Human GBP1 does not localize to pathogen vacuoles but restricts *Toxoplasma gondii*. **Cell. Microbiol.**, v. 18, p. 1056–1064, 2016. <https://doi.org/10.1111/cmi.12579>

JOSLING, G.A., LLINAS, M. Sexual development in Plasmodium parasites: knowing when it's time to commit. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, p. 573– 587, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3519>

KANSIIME, F., ADIBAKU, S., WAMBOGA, C., IDI, F., KATO, C. D., YAMUAH, L., et al. A multicentre, randomised, non-inferiority clinical trial comparing a nifurtimox-eflornithine combination to standard eflornithine monotherapy for late stage *Trypanosoma brucei* gambiense human African trypanosomiasis in Uganda. **Parasit. Vec.**, v. 11, p. 105, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2634-x>



KARUNAWEEERA, N.D., CARTER ,R., GRAU, G., KWIATKOWSKI, D., GIUDICE, G., MENDIS, K. Tumour necrosis factor-dependent parasite-killing effects during paroxysms in non-immune *Plasmodium vivax* malaria patients. **Clin Exp Immunol.**, v. 88, p. 499–505, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb06478.x>

KAYE, A. Toxoplasmosis: Diagnosis, Treatment, and Prevention in Congenitally Exposed Infants. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 25, p. 355-364, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2010.04.008>

KESSLER, C.; PARDO, A.; TUR, M. K.; GATTENLÖHNER, S.; FISCHER, R.; KOLBERG, K.; BARTH, S. Novel PSCA targeting scFv-fusion proteins for diagnosis and immunotherapy of prostate cancer. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 143, p. 2025-2038, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2472-9>

KIM, S.K., BOOTHROYD, J.C. Stage-specific expression of surface antigens by *Toxoplasma gondii* as a mechanism to facilitate parasite persistence. **J Immunol.**, v. 174, p. 8038–8048, 2005. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.12.8038>

KIM, S.H., LEE, Y.S., HWANG, S.Y., et al. Effects of PEGylated scFv antibodies against *Plasmodium vivax* duffy binding protein on the biological activity and stability in vitro. **J Microbiol Biotechnol.**, v. 17, p.1670-1674, 2007.

KLEMOLA T. Immunohistochemical findings in the intestine of IgA-deficient persons: number of intraepithelial T lymphocytes is increased. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 7, p. 537–543, 1988. <https://doi.org/10.1097/00005176-198807000-00010>

KLINGER, M., BRANDL, C., ZUGMAIER, G., et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. **Blood**, v. 119, p. 6226-6233, 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-400515>

KOCHANOWSKY, J.A., KOSHY, A.A. Quick guide: *Toxoplasma gondii*. **Current Biology**, v. 28, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.035>

KRAEMER, S.M., SMITH, J.D. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, p. 374–380, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.006>

KUAN, C.T., SRIVASTAVA, N., MCLENDON, R.E., MARASCO, W.A., ZALUTSKY, M.R., BIGNER, D.D. Recombinant singlechain variable fragment antibodies against extracellular epitopes of human multidrug resistance protein MRP3 for targeting malignant gliomas. **Int J Cancer.**, v. 127, p. 598–611, 2010. <https://doi.org/10.1002/ijc.25062>

KUHN, S. M.; McCARTHY, A. E. Paediatric malaria: What do pediatricians need to know? **Paediatrics and Child Health**, v. 11, p. 349-354, 2006. <https://doi.org/10.1093/pch/11.6.349>

KUR, J., HOLEC-GASIOR, L., HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. **Expert Rev Vaccines**, v. 8, p. 791-808, 2009. <https://doi.org/10.1586/erv.09.27>

- LAMBERT, H.; BARRAGAN, A. Modelling parasite dissemination: host cell subversion and immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Cell. Microbiol.**, v. 12, p. 292–300, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01417.x>
- LASZLO, G.S., GUDGEON, C.J., HARRINGTON, K.H., DELL'ARINGA, J., NEWHALL, K.J., MEANS, G.D., et al. Cellular determinants for preclinical activity of a novel CD33/CD3 bispecific T-cell engager (BiTE) antibody, AMG 330, against human AML. **Blood**, v. 123, p. 554–561, 2014. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-527044>
- LEVENHAGEN, M.A., SANTOS, F. A. A., FUJIMURA, P.T., CARNEIRO, A.P., COSTA-CRUZ, J.M., GOULART, L.R. Structural and functional characterization of a novel scFv anti-HSP60 of *Strongyloides* sp [corrected to Carneiro, Ana Paula]. **Sci Rep.**, v. 5, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep10447>
- LIMA, T. S., GOV, L., AND LODOEN, M. B. Evasion of human neutrophil-mediated host defense during *Toxoplasma gondii* infection. **mBio**, v. 9, p. 2027–2017, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.02027-17>
- LIMA, T.S., LODOEN, M.B. Mechanisms of human innate immune evasion by *Toxoplasma gondii*. **Front Cell Infect Microbiol.**, v. 9, 2019. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00103>
- LIU, Q., SINGLA, L., ZHOU, H. Vaccines against *Toxoplasma gondii* Status, challenges and future directions. **Human Vaccines & Immunotherapeutics.**, v. 8, p. 1305-1308, 2012. <https://doi.org/10.4161/hv.21006>
- LOOAREESUWAN, S., OOSTERHUIS, B., SCHILIZZI, B.M., SOLLIE, F.A., WILAIRATANA, P., KRUDSOOD, S., et al. Dose-finding and efficacy study for i.m. artemotil (beta-arteether) and comparison with i.m. artemether in acute uncomplicated *P. falciparum* malaria. **Br J Clin Pharmacol**, v. 53, p. 492-500, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2002.01590.x>
- MACHADO, A.V., CARDOSO, J.E., CLASER, C., RODRIGUES, M.M., GAZZINELLI, R.T., BRUNA-ROMERO, O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Hum Gene Ther.**, v. 17, p. 898–908, 2006. <https://doi.org/10.1089/hum.2006.17.898>
- MACRE, M.S., MEIRELES, L.R., SAMPAIO, B.F.C., ANDRADE JÚNIOR, H.F. Saliva collection and detection of anti- *T. gondii* antibodies of low-income school-age children as a learning strategy on hygiene, prevention and transmission of toxoplasmosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 61, 2019. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961048>
- MAGUIRE, J. H. Treatment of chagas' disease—time is running out. **N. Engl. J. Med.**, v. 373, p. 1369–1370, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMe1510170>
- MARIANO, F. S.; GUTIERRE Z, F. R. S.; PAVANELLI, W. R.; MILANEZI, C. M.; CAVASSANI, K. A.; MOREIRA, A. P.; FERREIRA, B. R.; CUNHA, F. Q.; CARDOSO, C. R.; SILVA, J. S. The involvement of CD4+ CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma*



- cruzi* infection. **Microbes Infec.**, v. 10, p. 825-833, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.04.009>
- MARSH, K., KINYANJUI, S. Immune effector mechanisms in malaria. **Parasite Immunology**, v. 28, p. 51–60, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00808.x>
- McCONVILLE, M. J., HOMAN, S.W., THOMAS-OATESI, J.E., DELL, A., BACIC, A. Structures of the Glycoinositolphospholipids from *Leishmania major*: A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 265, p. 7385-7394, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39125-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39125-2)
- McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem. J.**, v. 294, p. 305–324, 1993. <https://doi.org/10.1042/bj2940305>
- MENDEZ, O.A., KOSHY, A.A. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLoS Pathog.**, v. 13, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>
- MENDIS, K.N., MUNESINGHE, Y.D., DE SILVA, Y.N., KERAGALLA, I., CARTER, R. Malaria transmission-blocking immunity induced by natural infections of *Plasmodium vivax* in humans. **Infect Immun.**, v. 55, p. 369–72, 1987. <https://doi.org/10.1128/IAI.55.2.369-372.1987>
- MENDIS, K.N., DAVID, P.H., CARTER, R. Human immune responses against sexual stages of malaria parasites: considerations for malaria vaccines. **Int J Parasitol.**, v. 20, p. 497–502, 1990. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(90\)90197-U](https://doi.org/10.1016/0020-7519(90)90197-U)
- MENECEUR, P., BOULDOUYRE, M. A., AUBERT, D., VILLENA, I., MENOTTI, J., SAUVAGE, V., GARIN, J. F., DEROUIN, F.. In Vitro Susceptibility of Various Genotypic Strains of *Toxoplasma gondii* to Pyrimethamine, Sulfadiazine, and Atovaquone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 1269-1277, 2008. <https://doi.org/10.1128/AAC.01203-07>
- MICHON, P., COLE-TOBIAN, J. L., DABOD, E., SCHOEPFLIN, S., IGU, J., SUSAPU, M., TARONGKA, N., ZIMMERMAN, P. A., REEDER, J. C., BEESON, J. G., SCHOFIELD, L., KING, C. L., MUELLER, I. The risk of malarial infections and disease in Papua New Guinean children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 997–1008, 2007. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.997>
- MIGUEL, C.B., LEVENHAGEN, M.A., COSTA-CRUZ, J.M., et al. scFv against HSP60 of *Strongyloides* sp. and Its Application in the Evaluation of Parasite Frequency in the Elderly. **Dis Markers.**, v. 2020, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/4086929>
- MILES, A., IQBAL, Z., VAUTERIN, P., PEARSON, R., CAMPINO, S., THERON, M., GOULD, K., MEAD, D., DRURY, E., et al. Indels, structural variation, and recombination drive genomic diversity in *Plasmodium falciparum*. **Genome Research**, v. 26, p. 1288–1299, 2016. <https://doi.org/10.1101/gr.203711.115>

- MILLER, L, HOFFMAN, S. Research towards vaccine against malaria. **Nat Med**, v. 4, p. 520–24, 1998. <https://doi.org/10.1038/nm0598supp-520>
- MILNER, J.R., D.A. Malaria Pathogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 8, 2018. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025569>
- MINEO, J. R., SILVA, D. A. O., SOPELETE, M. C., LEAL, G. S., VIDIGAL, L.H.G., TÁPIA, L. E. R., BACCHIN, M.I. **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 273 EDUFU: Uberlândia, 2005. <https://doi.org/10.7476/9788570785237>
- MOLINA-GARZA, Z. J., BAZALDUA-RODRIGUEZ, A. F., QUINTANILLA-LICEA, R., GALAVIZSILVA, L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. **Acta Trop.**, v. 136, p. 14–18, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.006>
- MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)
- MONTOYA, J. G., REMINGTON, J. S. Clinical practice: management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 554-566, 2008. <https://doi.org/10.1086/590149>
- MORISAKI JH, HEUSER JE, SIBLEY LD. Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **J Cell Sci**, v. 108, p. 2457-64, 1995. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.6.2457>
- MU, J., AWADALLA, P., DUAN, J., MCGEE, K.M., JOY, D.A., MCVEAN, G.A., SU, X.Z. Recombination hotspots and population structure in *Plasmodium falciparum*. **PLoS Biology**, v. 3, 2005. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030335>
- MUELLER, I., GALINSKI, M. R., TSUBOI, T., AREVALO-HERRERA, M., COLLINS, W. E., KING, C. L. Natural acquisition of immunity to *Plasmodium vivax*: epidemiological observations and potential targets. **Advances in Parasitology**, v. 81, p. 77–131, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407826-0.00003-5>
- MURAT, J.B, SOUVIGNET, A., FRICKER-HIDALGO H, BRENIER-PINCHART M.P., BOST-BRU C., PELLOUX H. Assessment of the IgA immunosorbent agglutination assay for the diagnosis of congenital toxoplasmosis on a series of 145 toxoplasmic seroconversions. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 22, p. 456–458, 2015. <https://doi.org/10.1128/CVI.00666-14>
- NAIK, R. S.; DAVIDSON, E. A.; GOWDA, D. C. Developmental stage-specific biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* and its inhibition in a novel manner by mannosamine. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 24506–24511, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002151200>
- NAOTUNNE, T.D.S., KARUNAWEERA, N.D., DEL, G.G., KULARATNE, M., GRAU, G., CARTER, R., et al. Cytokines kill malaria parasites during infection crisis: extracellular complementary factors are essential. **J Exp Med.**, v. 173, p. 523–9, 1991. <https://doi.org/10.1084/jem.173.3.523>

- NOGUEIRA, N.F., GONZALEZ, M.S., GOMES, J.E., et al. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol.**, v. 116, p. 120-128, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.014>
- NORBURY, L.J., BASAŁAJ, K., BAŞKA, P., et al. Generation of a single-chain variable fragment phage display antibody library from naïve mice panned against *Fasciola hepatica* antigens. **Exp Parasitol.**, v. 205, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107737>
- OKELL, L.C., BOUSEMA, T., GRIFFIN, J.T., OUEDRAOGO, A.L., GHANI, A.C., DRAKELEY, C.J. Factors determining the occurrence of submicroscopic malaria infections and their relevance for control. **Nature Communications**, v. 3, 2012. <https://doi.org/10.1038/ncomms2241>
- OLIAS, P., ETHERIDGE, R. D., ZHANG, Y., HOLTZMAN, M. J., SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* effector recruits the Mi-2/NuRD complex to repress STAT1 transcription and block IFN-g-dependent gene expression. **Cell Host Microbe**, v 20, p. 72–82, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.006>
- ORLEAN, P., MENON, A.K. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glyco-phospholipids. **J Lipid Res.**, v. 48, p. 993-1011, 2007. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700002-JLR200>
- OSADA, T., HSU, D., HAMMOND, S., HOBEIKA, A., DEVI, G., CLAY, T.M., et al. Metastatic colorectal cancer cells from patients previously treated with chemotherapy are sensitive to T-cell killing mediated by CEA/CD3-bispecific T-cell-engaging BiTE antibody. **Br J Cancer**, v. 102, p. 124–133, 2010. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605364>
- OSIER, F. H., FENG, G., BOYLE, M. J., LANGER, C., ZHOU, J., RICHARDS, J. S., MCCALLUM, F. J., REILING, L., JAWOROWSKI, A., ANDERS, R. F., MARSH, K., BEESON, J. G. Opsonic phagocytosis of *Plasmodium falciparum* merozoites: mechanism in human immunity and a correlate of protection against malaria. **BMC Medicine**, v. 12, 2014. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-108>
- OTHORO, C., LAL, A.A., NAHLEN, B., KOECH, D., ORAGO, A.S., UDHAYAKUMAR, V. A low interleukin-10 tumor necrosis factor-alpha ratio is associated with malaria anemia in children residing in a holoendemic malaria region in western Kenya. **J Infect Dis**, v. 179, p. 279–282, 1999. <https://doi.org/10.1086/314548>
- OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J. Immunol.**, v. 168, p. 6366-6372, 2002. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.12.6366>

- PASQUALINI, R., KOIVUNEN, E., RUOSLAHTI, E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. **The Journal of Cell Biology**, v. 130, p. 1189-1196, 1995. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.5.1189>
- PAYNE, R.O., MILNE, K.H., ELIAS, S.C., EDWARDS, N.J., DOUGLAS, A.D., et al. Demonstration of the blood-stage *Plasmodium falciparum* controlled human malaria infection model to assess efficacy of the *P. falciparum* apical membrane antigen 1 vaccine, FMP2.1/AS01. **J Infect Dis**, v. 213, p. 1743–1751, 2016. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw039>
- PEREIRA NUNES, M. C.; DONES, W.; MORILLO, C. A.; ENCINA, J. J.; RIBEIRO, A. L. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 62, p. 767-776, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- PEREIRA, I.R., VILAR-PEREIRA, G., MARQUES, V., DA SILVA, A.A., CAETANO, B., et al. A human type 5 adenovirus-based *Trypanosoma cruzi* therapeutic vaccine re-programs immune response and reverses chronic cardiomyopathy. **PLOS Pathogens**, v. 11, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004594>
- PEREZ-MOLINA, J. A., MOLINA, I. Chagas disease. **Lancet**, v. 391, p. 82–94, 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Semin Fetal Neonatal Med**, v. 12, p. 214–223, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.011>
- PFEFFERKORN, E. R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 81, p. 908–912, 1984. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.3.908>
- PIERROT, C., DIT VAMPOUILLE, A.A., VANDOMME, A., et al. Gene profiling analysis reveals the contribution of CD24 and P2Y6R to the susceptibility of young rats to *Plasmodium berghei* infection. **Cell Microbiol.**, v. 13, p. 752-763, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01574.x>
- PITTET, M., CONZELMANN, A. Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1771, p. 405-420, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2006.05.015>
- PLEWES, K., LEOPOLD, S.J., KINGSTON, H.W.F., DONDORP, A.M. Malaria: What's New in the Management of Malaria? **Infect Dis Clin North Am.**, v. 33, p. 39-60, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.002>
- POSNER, R.G.; FAY, S.P.; DOMALEWSKI, M.D.; SKLAR, L.A.; Continuous spectrofluorometric analysis of formyl peptide receptor ternary complex interactions. **Molecular Pharmacology**, v.45, n.1, p.65-73, 1994.
- PREVIATO, J.O., JONES, C., XAVIER, M.T., WAIT, R., TRAVASSOS, L.R., PARODI, A.J., MENDONÇA-PREVIATO, L. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of

*Trypanosoma cruzi* Y-strain. **J Biol Chem**, v. 270, p. 7241-7250, 1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.13.7241>

PRUDENCIO, C.R., NASCIMENTO, R., FILHO, M.M., MARRA, A.O.M., DE SOUZA, G.R.L., ALMEIDA, J.F., CARDOSO, R., SZABO, M.P., GOULART, L.R. In silico analysis for identification of tick phagotopes selected by phage-displayed libraries. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, p. 39–41, 2009. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01801007>

RECHT, J., SIQUEIRA, A.M., MONTEIRO, W.M., HERRERA, S.M., HERRERA, S., LACERDA, M.V.G. Malaria in Brazil, Colombia, Peru and Venezuela: current challenges in malaria control and elimination. **Malar J.**, v. 16, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1925-6>

RIBEIRO, V.D.A.S., ARAÚJO, T.G., GONZAGA, H.T., NASCIMENTO, R., GOULART, L.R., COSTA-CRUZ, J.M. Development of specific scFv antibodies to detect neurocysticercosis antigens and potential applications in immunodiagnosis. **Immunol Lett.**, v. 156, p. 59-67, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.005>

RIBEIRO, M., FRANCO, P.S., LOPES-MARIA, J.B., ANGELONI, M.B., DE FREITAS BARBOSA, B., DE OLIVEIRA GOMES, A., CASTRO, A.S., DA SILVA, et al. Azithromycin treatment is able to control the infection by two genotypes of *Toxoplasma gondii* in human trophoblast BeWo cells. **Experimental Parasitology**, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.004>

ROBERT-GANGNEUX, F., DARDÉ, M-L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 25, p. 264–296, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

ROSOWSKI, E. E., LU, D., JULIEN, L., RODDA, L., GAISER, R. A., JENSEN, K. D., et al. Strain-specific activation of the NF-kappaB pathway by GRA15, a novel *Toxoplasma gondii* dense granule protein. **J. Exp. Med.**, v. 208, p. 195–212, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20100717>

ROSOWSKI, E. E., SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* clonal strains all inhibit STAT1 transcriptional activity but polymorphic effectors differentially modulate IFN $\gamma$  induced gene expression and STAT1 phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051448>

ROSOWSKI, E. E., NGUYEN, Q. P., CAMEJO, A., SPOONER, E., SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* inhibits gamma interferon (IFN-g)- and IFN-b induced host cell STAT1 transcriptional activity by increasing the association of STAT1 with DNA. **Infect. Immun.**, v. 82, p. 706–719, 2014. <https://doi.org/10.1128/IAI.01291-13>

RUIZ, A., PÉREZ, D., MUÑOZ, M.C., et al. Targeting essential *Eimeria ninakohlyakimovae* sporozoite ligands for caprine host endothelial cell invasion with a phage display peptide library. **Parasitol Res.**, v. 114, p. 4327-4331, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4666-x>

- RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 1607-1613, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01907.x>
- SAEIJ, J. P., COLLIER, S., BOYLE, J. P., JEROME, M. E., WHITE, M. W., BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma* co-opts host gene expression by injection of a polymorphic kinase homologue. **Nature**, v. 445, p. 324–327, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05395>
- SANCHEZ, B. A. M.; VAROTTI, F. P., RODRIGUES, F. G.; CARVALHO, L. H. Validation of a *Plasmodium falciparum* parasite transformed with green fluorescent protein for antimalarial drug screening. **Journal of Microbiological Methods**, v.69, p. 518-522, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.001>
- SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 246 -251, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900031>
- SCHNEIDER, P., BOUSEMA, J.T., GOUAGNA, L.C., OTIENO, S., VAN DE VEGTE-BOLMER, M., OMAR, S.A., et al. Submicroscopic *Plasmodium falciparum* gametocyte densities frequently result in mosquito infection. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 76, p. 470–4, 2007. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.470>
- SERRANO, A.A., SCHENKMAN, S., YOSHIDA, N., MEHLERT, A., RICHARDSON, J.M., FERGUSON, M.A. The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J Biol Chem.**, v. 270, p. 27244-27253, 1995. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.27244>
- SERVICE, M.W. Medical entomology for students. 1st ed. Cambridge: Chapman & Hall; 1996, p. 95-103.
- SEYDEL, K.B., KAMPONDENI, S.D., VALIM, C., POTCHEN, M.J., MILNER, D.A., MUWALO, F.W., BIRBECK, G.L., BRADLEY, W.G., FOX, L.L., GLOVER, S.J, et al. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. **N Engl J Med.**, v. 372, p. 1126–1137, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400116>
- SINDEN, R. A biologist’s perspective on malaria vaccine development. **Hum Vaccin.**, v. 6, p. 3–11, 2010. <https://doi.org/10.4161/hv.6.1.9604>
- SMITH, G. P. Phage Display introduction I Phage Display types of Phage Display libraries. **Direct**, 1985.
- SMITH GP, PETRENKO VA. Phage Display. **Chem Ver.**, v. 97, p. 391-410, 1997. <https://doi.org/10.1021/cr960065d>
- SPALENKA, J., ESCOTTE-BINET, S., BAKIRI, A., et al. Discovery of new inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the pathogen box. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, p. 1640-17, 2018. <https://doi.org/10.1128/AAC.01640-17>



- STANISIC, D.I., RICHARDS, J.S., MCCALLUM, F.J., MICHON, P., KING, C.L., SCHOEPFLIN, S., et al. Immunoglobulin G subclass-specific responses against *Plasmodium falciparum* merozoite antigens are associated with control of parasitemia and protection from symptomatic illness. **Infect Immun**, v. 77, p. 1165–1174, 2009. <https://doi.org/10.1128/IAI.01129-08>
- STEPHEN, C.W., HELMINEN, P., LANE, D.P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. **J Mol Biol**, v. 248, p. 58-78, 1995. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0202>
- STUART, K., BRUN, R., CROFT, S., FAIRLAMB, A., GÜRTLER, R.E., MCKERROW, J., REED, S., TARLETON, R.J. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Clin Invest**, v. 118, p. 1301-1310, 2008. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>
- SCHOFIELD, C. J.; JANNIN, J.; SALVATELLA, R. The future of Chagas' disease control. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 12, p. 583-588, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.011>
- SELLECK, E. M., FENTRESS, S. J., BEATTY, W. L., DEGRANDI, D., PFEFFER, K., VIRGIN, H. W., et al. Guanylate-binding protein 1 (Gbp1) contributes to cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.**, v. 9, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003320>
- SELLECK, E. M., ORCHARD, R. C., LASSEN, K. G., BEATTY, W. L., XAVIER, R. J., LEVINE, B., et al. A noncanonical autophagy pathway restricts *Toxoplasma gondii* growth in a strain-specific manner in IFN- $\gamma$ -activated human cells. **MBio**, v. 6, p. 1157–1115, 2015. <https://doi.org/10.1128/mBio.01157-15>
- SERRANTI, D., BUONSENSO, D., VALENTINI, P. Congenital toxoplasmosis treatment. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, p. 193-8, 2011.
- SHAPIRA, S., HARB, O. S., MARGARIT, J., MATRAJT, M., HAN, J., HOFFMANN, A., et al. Initiation and termination of NF- $\kappa$ B signaling by the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J. Cell. Sci.**, v. 118, p. 3501–3508, 2005. <https://doi.org/10.1242/jcs.02428>
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 845–852, 2012. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- SIMPSON, J.A., AARONS, L., COLLINS, W.E., JEFFERY, G.M., WHITE, N.J. Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. **Parasitology**, v. 124, p. 247–263, 2002. <https://doi.org/10.1017/S0031182001001202>
- SPEER, C. A., DUBEY, J. P. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **Parasitology**, v. 116, p. 35–42, 1998. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001959>
- ŠTAJNER, T., VASILJEVIĆ, Z., VUJIĆ, D., MARKOVIĆ, M., RISTIĆ, G., MIĆIĆ, D., et al. Atypical strain of *Toxoplasma gondii* causing fatal reactivation after hematopoietic stem cell

- transplantation in a patient with an underlying immunological deficiency. **J Clin Microbiol.**, v. 51, p. 2686-90, 2013. <https://doi.org/10.1128/JCM.01077-13>
- STONE, W.J., DANTZLER, K.W., NILSSON, S.K., DRAKELEY, C.J., MARTI, M., BOUSEMA, T., et al. Naturally acquired immunity to sexual stage *P. falciparum* parasites. **Parasitology**, v. 143, p. 187–98, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182015001341>
- SUMARI, D., MWINGIRA, F., SELEMANI, M., MUGASA, J., MUGITTU, K., GWAKISA, P. Malaria prevalence in asymptomatic and symptomatic children in Kiwangwa, Bagamoyo district, Tanzania. **Malaria Journal**, v. 16, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1870-4>
- SUZUKI, Y., ORELLANA, M. A., SCHREIBER, R. D., REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516–518, 1988. <https://doi.org/10.1126/science.3128869>
- SUZUKI, Y., CONLEY, F. K., REMINGTON, J. S. Importance of endogenous IFN-gamma for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. **J. Immunol.**, v. 143, p. 2045–2050, 1989.
- TA, T.H., HISAM, S., LANZA, M., JIRAM, A.I., ISMAIL, N., RUBIO, J.M. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malar J.**, v. 13, 2014. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-68>
- TAKEHARA, H. A.; MOTA, I. The possible mechanism of action of IgG antibodies and platelets protecting against *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 759-765, 1991.
- TARGETT, G., DRAKELEY, C., JAWARA, M., VON SEIDLEIN, L., COLEMAN, R., DEEN, J, et al. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. **J Infect Dis.**, v. 183, p. 1254– 9, 2001. <https://doi.org/10.1086/319689>
- TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Semin. Immunopathol.**, v. 37, p. 233-238, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>
- TIKUNOVA, N. V.; MOROZOVA, V. V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: application for recombinant antibodies selection. **Acta nature**, v. 1, n. 3, p. 20–8, 2009. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.10751>
- TOLEDO-MACHADO, C. M.; AVILA, R.A.M.; NGUYEN, C. et al., Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from Phage Displayed combinatorial libraries. **BioMed Research International**, vol. 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/401509>
- TOMAVO, S., SCHWARZ, R.T., DUBREMETZ, J.F. Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Mol Cell Biol.**, v. 9, p. 4576-4580, 1989. <https://doi.org/10.1128/MCB.9.10.4576>



TORGERSON, P.R., MASTROIACOVO, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. **Bull. World Health Organ.**, v. 91, p. 501–508, 2013. <https://doi.org/10.2471/BLT.12.111732>

TOSH, K. W., MITTEREDER, L., BONNE-ANNEE, S., HIENY, S., NUTMAN, T. B., SINGER, S. M., et al. The IL-12 response of primary human dendritic cells and monocytes to *Toxoplasma gondii* is stimulated by phagocytosis of live parasites rather than host cell invasion. **J. Immunol.**, v. 196, p. 345–356, 2016. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501558>

TRAN, T. M., LI, S., DOUMBO, S., DOUMTABE, D., HUANG, C. Y., DIA, S., BATHILY, A., SANGALA, J., KONE, Y., TRAORE, A., NIANGALY, M., DARA, C., KAYENTAO, K., ONGOIBA, A., DOUMBO, O. K., TRAORE, B., CROMPTON, P. D. An intensive longitudinal cohort study of Malian children and adults reveals no evidence of acquired immunity to *Plasmodium falciparum* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, p. 40–47, 2013. <https://doi.org/10.1093/cid/cit174>

TREVIZAN, A. R., VICENTINO-VIEIRA, S. L., DA SILVA WATANABE, P., GÓIS, M. B., DE MELO GDE, A., GARCIA, J. L., et al. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. **Exp. Parasitol.**, v. 165, p. 22–29, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.015>

UDOMSANGPETCH, R., PIPITAPORN, B., KRISHNA, S., et al. Antimalarial drugs reduce cytoadherence and rosetting *Plasmodium falciparum*. **J Infect Dis.**, v. 173, p. 691–698, 1996. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.3.691>

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 495–501, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.001>

VASCONCELOS, J.R.C, HIYANE, M.I., MARINHO, C.R.F., CLASER, C., et al. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection in a highly susceptible mouse strain after vaccination with genes encoding the amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. **Human Gene Therapy**, v. 15, p. 878–886, 2004. <https://doi.org/10.1089/hum.2004.15.878>

VÁZQUEZ-CHAGOYÁN, J. C.; GUPTA, S.; GARG, N. J. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. **Adv. Parasitol.**, v. 75, p. 121–146, 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00006-X>

VUKOVIC, P.; CHEN, K.; QIN LIU, X.; FOLEY, M.; BOYD, A.; KASLOW, D.; GOOD, M. F. Single-chain antibodies produced by phage display against the C-terminal 19 kDa region of merozoite surface protein-1 of *Plasmodium yoelii* reduce parasite growth following challenge. **Vaccine**, v. 21, p. 2826–2835, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00197-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00197-4)

WAHEED, A.A., GHANCHI, N.K., REHMAN, K.A., RAZA, A., MAHMOOD, S.F., BEG, M.A. Vivax malaria and chloroquine resistance: a neglected disease as an emerging threat. **Malaria Journal**, v. 14, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0660-0>

WALLIKER, D., QUAKYI, I.A., WELLEMS, T.E., MCCUTCHAN, T.F., SZARFMAN, A., LONDON, W.T., CORCORAN, L.M., BURKOT, T.R., CARTER, R. Genetic analysis of the

human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Science**, v. 236, p. 1661–1666, 1987. <https://doi.org/10.1126/science.3299700>

WANG, A., HUEN, S.C., LUAN, H.H., et al. Glucose metabolism mediates disease tolerance in cerebral malaria. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 115, p. 11042-11047, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806376115>

WANG, Y.; LIN, Y; LV, J. Phage Display technology and its applications in cancer immunotherapy. **Anticancer Agents Med. Chem.**, 2019. <https://doi.org/10.2174/1871520618666181029140814>

WEISSER, N.E., HALL, J.C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics. **Biotechnol Adv.**, v. 27, p. 502-520, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.004>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Severe and complicated malaria. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 84, p. 1-65, 1990. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90363-J](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90363-J)

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1995. Model prescribing information: drugs used in parasitic diseases - Second Edition. Disponível em: <https://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2922e/2.8.html>. Acesso em 20 de fevereiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Severe malaria. *Tropical Medicine and International Health*. v. 19, p. 7-131, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Organization Guidelines for the treatment of malaria. Third edition. 2015. Disponível em: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241549127/en/>. Acesso em 24 de janeiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. 2015b. Disponível em: [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0011/294599/Factsheet-Toxoplasmosis-en.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0011/294599/Factsheet-Toxoplasmosis-en.pdf?ua=1). Acesso em 10 de fevereiro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report. Geneva: World Health Organization; 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Organization Weekly epidemiological record. v. 91, p. 33–52, 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epidemiological Update Malaria in the Americas. 2019a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2019b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em: 12 de Fevereiro de 2020.

- WÖRN A, PLÜCKTHUN A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. **J Mol Biol.**, v. 305, p. 989-1010, 2001. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4265>
- WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; HORN, D.; KELLY, J. M.; CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 5022-5027, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- WILLATS, W.G.T.: Phage display: practicalities and prospects. **Plant Mol.Biol.**, v. 50, p. 837–854, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1021215516430>
- WITTHAUER, J., SCHLERETH, B., BRISCHWEIN, K., et al. Lysis of cancer cells by autologous T cells in breast cancer pleural effusates treated with anti-EpCAM BiTE antibody MT110. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 117, p. 471-481, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0185-0>
- YAMAMOTO, M., OKUYAMA, M., MA, J. S., KIMURA, T., KAMIYAMA, N., SAIGA, H., et al. A cluster of interferon-g-inducible p65 GTPases plays a critical role in host defense against *Toxoplasma gondii*. **Immunity**, v. 37, p. 302–313, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.06.009>
- YAMAMOTO, K., TRAD, A., BAUMGART, A., et al. A novel bispecific single-chain antibody for ADAM17 and CD3 induces T-cell-mediated lysis of prostate cancer cells. **Biochem J.**, v. 445, p. 135-144, 2012. <https://doi.org/10.1042/BJ20120433>
- YIN, H., ZHAO, L., WANG, T., ZHOU, H., HE, S., CONG, H. A *Toxoplasma gondii* vaccine encoding multistage antigens in conjunction with ubiquitin confers protective immunity to BALB/c mice against parasite infection. **Parasit Vectors.**, v. 8, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1108-7>
- YOSHIDA, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **An Acad Bras Cienc.**, v. 78, p. 87-111, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000100010>
- YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. Transfusion acquired *Trypanosoma cruzi* infection. **Transfusion**, v. 47, p. 540-544, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.01147.x>
- ZHOU, S. J.; WEI, J.; SU, S.; CHEN, F. J.; QIU, Y. D.; LIU, B. R. Strategies for Bispecific Single Chain Antibody in Cancer Immunotherapy. **J. Cancer**, v. 17, p. 3689-3696, 2017. <https://doi.org/10.7150/jca.19501>
- ZULPO, D.L, IGARASHI, M. SAMMI, A.S., SANTOS, J.R., SASSE, J.P. CUNHA, I.A.L, TARODA, A., BARROS, L.D., ALMEIDA, J.C. JENKINS, M.C., NAVARRO, I.T., GARCIA, J.L. rROP2 de *Toxoplasma gondii* como potencial vacina contra a eliminação de oocistos em gatos domésticos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 26, p.67-73, 2017. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017007>