

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

**Análise comparativa *in silico* de novos peptídeos derivados de proteínas
imunodominantes de *Toxoplasma gondii*, com potencial para serem aplicados como
ferramentas para o diagnóstico da toxoplasmose humana**

ANGELIS DEL VALLE BENITEZ BETANCOURT

UBERLÂNDIA - MG

Maio - 2022

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

**Análise comparativa *in silico* de novos peptídeos derivados de proteínas
imunodominantes de *Toxoplasma gondii*, com potencial para serem aplicados como
ferramentas para o diagnóstico da toxoplasmose humana**

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

Angelis Del Valle Benitez Betancourt

Orientador: Prof. Dr. Jose Roberto Mineo

UBERLÂNDIA - MG

Maio – 2022

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

B562 Betancourt, Angelis Del Valle Benitez, 1993-
2022 Análise comparativa in silico de novos peptídeos
derivados de proteínas imunodominantes de *Toxoplasma
gondii*, com potencial para serem aplicados como
ferramentas para o diagnóstico da toxoplasmose humana
[recurso eletrônico] / Angelis Del Valle Benitez
Betancourt. - 2022.

Orientador: José Roberto Mineo.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.406>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

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

CDU: 612.017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 · www.imunoparasito.ufu.br · coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado nº 278				
Data:	27/05/2022	Hora de início:	09h00	Hora de encerramento:	11 h_42_min
Matrícula do Discente:	11922IPA001				
Nome do Discente:	Angelis Del Valle Benitez Betancourt				
Título do Trabalho:	Análise comparativa <i>in silico</i> de novos peptídeos derivados de proteínas imunodominantes de <i>Toxoplasma gondii</i> , com potencial para serem aplicados como ferramentas para o diagnóstico da toxoplasmose humana				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Identificação e caracterização de moléculas alvo de formas taquizoítas e bradizoítas de <i>Toxoplasma gondii</i> e <i>Neospora caninum</i> de importância na indução da resposta imune protetora em hospedeiros susceptíveis				

Reuniu-se no dia 27 de maio, as 09:00 horas, por vídeo conferência, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos titulares: Silas Silva Santana - UFVJM; Nilson Nicolau Junior - IBTEC-UFU; José Roberto Mineo - ICBIM-UFU - (Presidente) orientador da candidata.

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

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

APROVADA.

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

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 **Silas Silva Santana**, Usuário Externo, em 27/05/2022, às 11:45, 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 **Nilson Nicolau Junior, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/05/2022, às 11:45, 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 **José Roberto Mineo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 27/05/2022, às 11:45, 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 **Foued Salmen Espindola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/05/2022, às 10:36, 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 **Yara Cristina de Paiva Maia, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/06/2022, às 17:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3571842** e o código CRC **077D2F0A**.

DEDICATÓRIA

A minha mãe que mesmo sem estar presente fisicamente esteve sempre olhando por mim.

AGRADECIMENTO

A Deus, que tem sido meu protetor, por ter sempre me guiado e iluminar meu caminho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Mineo pela oportunidade e conhecimentos transmitidos durante a execução deste trabalho.

Ao o Prof. Dr. Tiago Mineo pelos conhecimentos e a valiosa contribuição para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas e companheiros de bancada, Ana Cláudia e Caroline Mota pela companhia, assistência no planejamento e execução dos meus primeiros experimentos, por me ensinar tantas coisas desde o começo do mestrado.

A Tamires pela ajuda incondicional na realização deste trabalho de pesquisa, pelos conselhos, pela paciência, pela amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunoparasitologia por me acolher no grupo desde o primeiro dia, pelo incentivo, amizade e conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos Cristina, Henrique, Marley e Zilda pelo apoio fornecido durante os experimentos.

Aos meus amigos Uriel e Anna Laura pelo apoio, valiosos conselhos e palavras de incentivo sempre que eu precisei delas.

A minha família e amigos dentro e fora da Venezuela por serem uma inspiração, e que mesmo na distância torcem sempre pelo meu sucesso, me apoiam e confortam em cada momento.

Às agências financiadoras CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todas aquelas pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram e contribuíram para a conclusão bem-sucedida deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

Os testes sorológicos para o diagnóstico da infecção por *Toxoplasma gondii* têm limitações para diferenciar a infecção aguda da infecção crônica, o que é importante para determinar o manejo clínico e o tratamento de mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos com toxoplasmose. No presente estudo, foram realizadas análises *in silico* para caracterizar epítomos imunogênicos das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A, as quais podem emergir como novas alternativas para melhorar o diagnóstico da toxoplasmose. Uma vez que as sequências proteicas foram recuperadas do banco de dados Toxodb, diferentes parâmetros foram calculados, incluindo características físico-químicas, valores de acessibilidade e antigenicidade. Alinhamento de sequências múltiplas, modelagem de estrutura 3D, refinamento e validação também foram realizados entre todos os 11 peptídeos. Considerando os resultados obtidos da combinação de todos os parâmetros analisados, pode-se concluir que os peptídeos das proteínas SAG1, GRA3 e BSR4 foram considerados os mais promissores, por serem estáveis, hidrofílicos, com valores significativos de antigenicidade e acessibilidade na superfície da proteína. Portanto, a aplicação destes peptídeos pode ser caracterizada como boas alternativas para a padronização de novos ensaios de imunodiagnóstico para toxoplasmose.

Palavras-chaves: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, análise *in silico*, peptídeos, epítomos imunodominantes, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Serological tests for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection have limitations in differentiating acute from chronic infection, which is important in determining the clinical management and treatment of pregnant women and immunocompromised individuals with toxoplasmosis. Here, an *in silico* analysis was performed to characterize immunogenic epitopes of SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A proteins that may emerge as alternatives to improve the diagnosis of toxoplasmosis. Once the protein sequences were retrieved from the Toxodb database, different parameters were calculated including physicochemical characteristics, accessibility values, and antigenicity. Multiple sequence alignment, 3D structure modeling, refinement, and validation were also performed among all 11 peptides. Considering the results from the combination of all parameters analyzed, it can be concluded that the peptides of SAG1, GRA3, and BSR4 proteins were found to be stable, hydrophilic, with significant antigenicity values, and accessibility on the protein surface. Thus, the use of these peptides may suggest alternative measures for the design and standardization of new immunodiagnostic assays for toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, *in silico* analysis, peptides, immunodominant epitopes, immunodiagnostic.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMA1** - Antígeno de membrana apical 1
- CDC** - Center for Disease Control and Prevention
- DHFR** - Enzima dihidrofolato redutase
- DHPS** - Enzima dihidropteroato sintetase
- ELISA** - Ensaio imunoabsorvente ligado a enzimas
- GRA** - Grânulos densos
- GPI** - Glicosil-fosfatidil-inositol
- HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana
- IFI** - Imunofluorescencia indireita (IFI)
- Ig** - Imunoglobulina
- IL** - Interleucina
- INF** - Interferon
- MIC** - Micronemas
- MHC** - Complexo principal de histocompatibilidade
- NK** - Natural Killer
- NO** - Oxido nítrico
- µm** - Micrometro
- pH** - Potencial hidrogênico
- ROP** - Roptrias
- ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- TNF** - Fator de necrose tumoral
- UFU** - Universidade Federal de Uberlândia
- VP** - Vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

CAPITULO I	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. A toxoplasmose.....	13
1.2. Agente etiológico e estágios infecciosos	13
1.3. Ciclo de vida e vias de transmissão	15
1.3. Manifestações clínicas	17
1.4. Relação parasito-hospedeiro: invasão da célula do hospedeiro.....	19
1.5. Resposta imune	20
1.6. Tratamento	20
1.7. Diagnóstico	21
1.8. Análise <i>in silico</i>	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II	31
<i>In silico</i> comparative analysis of novel peptides derived from <i>Toxoplasma gondii</i> immunodominant proteins as potential tools for the diagnosis of human toxoplasmosis	
Title	32
Abstract	33
Introduction	34
Materials and methods	36
Results	38
Discussion	42
Conclusion	45
Acknowledgments	45
Conflict of interest	45
References	46
Figures and tables	52

CAPITULO I
Revisão bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

1.1. A toxoplasmose

A toxoplasmose é uma zoonose amplamente disseminada à nível mundial, causada pelo parasito intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (MACÊDO et al., 2013; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Com mais de 40 milhões de pessoas infectadas nos Estados Unidos, a CDC (Center for Disease Control and Prevention) classificou a toxoplasmose como uma das infecções parasitárias negligenciadas que requerem de um controle sanitário ativo (BEN-HARARI; CONNOLLY, 2019).

Como resultado, a importância de *T. gondii* na saúde pública, segurança alimentar e na economia (com a criação de animais) tem sido bem estudada (SUN et al., 2013). Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial está cronicamente infectada, e que a prevalência da doença varia amplamente dependendo da região geográfica, sendo reportado entre 10-30% em regiões de América do Norte, Ásia e Europa e entre 60-80% em algumas regiões da América Latina e países tropicais da África, onde a alta prevalência é bem reconhecida (DA SILVA et al., 2021; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Como se pode ver, a infecção é comumente relatada em países com climas quentes e altitudes mais baixas que países em com climas frios e áreas montanhosas (MCAULEY, 2014). Certamente, as variações na prevalência da toxoplasmose indicam que a doença depende de diversos fatores e é resultado das práticas culturais, fatores antropogênicos, condições socioeconômicas e ambientais da população (MOLAN et al., 2019).

Em relação a criação de animais, a toxoplasmose é responsável por grandes perdas econômicas, levando à morte embrionária precoce, aborto, morte fetal e neonatal na maioria dos animais destinados ao consumo humano, causando grandes prejuízos nesta indústria (DUBEY, 2009).

1.2. Agente etiológico e estágios infecciosos

Inicialmente, *Toxoplasma gondii* foi descrito em 1908 por Charles Nicolle e Louis Manceaux, enquanto realizavam investigações com *Leishmania* nos tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi*. Neste mesmo ano no Brasil, Alfonso Spendore identificou o mesmo parasito em coelhos de laboratórios. O parasito foi designado *Toxoplasma gondii* baseando em sua morfologia característica de meia-lua (do grego *toxos*, que quer dizer forma de arco, e *plasma*

que significa vida) e no nome do hospedeiro no qual foi encontrado inicialmente (DUBEY, 2008).

Devido a suas características morfológicas e relação filogenética, o protozoário é taxonomicamente classificado dentro filo Apicomplexa, classe Coccidea, subclasse Coccidiana, ordem Eimeriida, subordem Eimeriorina, família Sarcocystidae, subfamília Toxoplasmatinae, gênero *Toxoplasma*, onde podem se encontrar outros parasitos apicomplexos de importância médica como *Plasmodium* spp., causador da malária e *Cryptosporidium* spp., causador de diarreia (BLACK; BOOTHROYD, 2000; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Embora *T. gondii* tenha uma ampla distribuição mundial, e possivelmente a maior gama de hospedeiros do que qualquer parasita, existe apenas uma espécie no gênero *Toxoplasma*. Devido a sua ampla diversidade genética, as cepas desse protozoário têm sido agrupadas em genótipos, e isto tem sido correlacionado com a gravidade da infecção. Sendo considerado o genótipo I de mais virulência, e os genótipos II e III menos virulentos (ATTIAS et al., 2020; KAŇKOVÁ; FLEGR; CALDA, 2015; SIBLEY; BOOTHROYD, 1992).

T. gondii apresenta três estágios infecciosos bem caracterizados: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos (DAHER et al., 2021). Os quais apresentam diferentes propriedades replicativas, metabólicas, antigênicas e de transmissão (SKARIAH; MCINTYRE; MORDUE, 2010; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Esses estágios infecciosos compartilham uma morfologia comum alargada com formato de meia-lua, de aproximadamente 5 µm de comprimento e 2 µm de largura, com um extremo apical onde se encontram estruturas como o conoide que garante a invasão celular, e várias organelas secretórias como micronemas, roptrias e grânulos densos. Um complexo de membranas externas e internas delimitam e mantêm a integridade estrutural do parasito (ATTIAS et al., 2020; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Os taquizoítos tem alta taxa de disseminação e replicação, sendo capazes de invadir praticamente todos os tipos de células nucleadas nos animais vertebrados, onde se multiplicam dentro de um vacúolo parasitóforo (**Figura 1A**). Devido a isto, são responsáveis pela infecção aguda que provoca enormes danos aos tecidos (DAHER et al., 2021; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Após uma potente resposta imune, os taquizoítos se diferenciam na forma intracelular bradizoítos que formam cistos teciduais (**Figura 1B**). Os cistos, são mais ou menos esferoides e variam de 10 a 100 µm dependendo da quantidade de parasitos no interior. Esse estágio apresentam um metabolismo latente que permite a sobrevivência dentro do hospedeiro a longo

prazo, caracterizando a infecção crônica (FERGUSON, 2004; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Os esporozoítos estão presentes no interior dos oocistos de uns 12 μm . Após o processo de esporulação, os oocistos apresentam dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos (**Figura 1C e 1D**). Estas formas originam-se exclusivamente a partir da reprodução sexuada dentro de seus hospedeiros definitivos, os quais liberam os oocistos ao ambiente (ATTIAS et al., 2020). A robusta parede do oocisto protege o parasito dos danos mecânicos e químicos no ambiente, permitindo com que o parasito sobreviva por longos períodos de tempo (MAI et al., 2009).

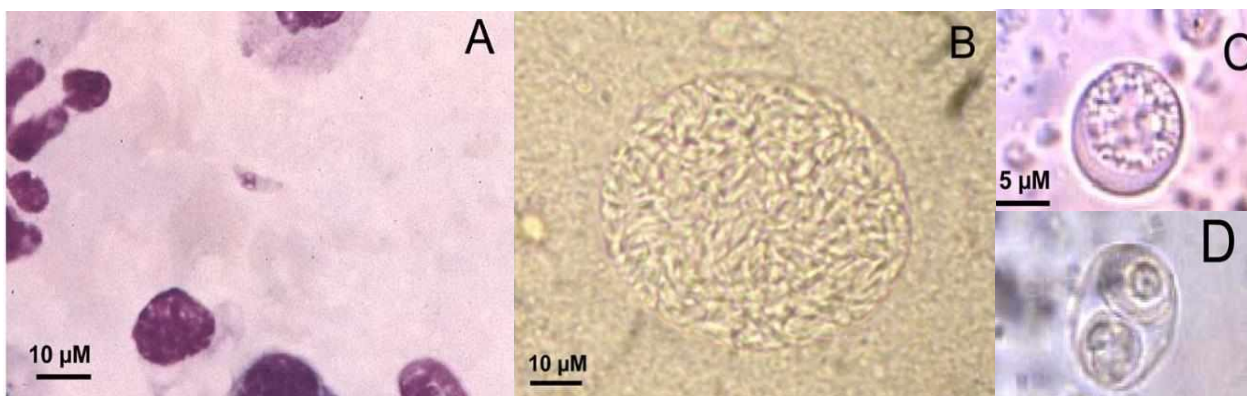


Figura 1. Estágios infecciosos do *Toxoplasma gondii*. (A) Taquizoítos em uma amostra de lavagem broncoalveolar corada com Giemsa. (B) Cisto no cérebro de um camundongo infectado. (C) Oocisto não esporulado e (D) Oocisto esporulado (D). Fonte: Imagem adaptada de Robert-Gangneux e Dardé (2012).

1.3. Ciclo de vida e vias de transmissão

T. gondii apresenta um ciclo de complexo, facultativamente heteroxênico que abrange inúmeros de hospedeiros intermediários como mamíferos e aves homeotérmicos, e hospedeiros definitivos membros da família Felidae, sendo seu principal representante o gato doméstico (**Figura 2**) (INNES et al., 2009; TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). A característica importante no sucesso da infecção por *T. gondii* é sua habilidade em infectar e replicar em qualquer animal de sangue quente, através de um ciclo de vida que exhibe tanto a reprodução sexuada, exclusiva dos hospedeiros definitivos, como a reprodução assexuada que acontece nos hospedeiros intermediários (CRAWFORD et al., 2010; DUBEY, 2008).

Inicialmente, o processo de infecção dos hospedeiros definitivos, começa quando esses ingerem animais que contenham cistos teciduais, embora também possam se contaminar pela ingestão de oocistos excretados por outro felino. A partir da ingestão, os cistos liberam bradizoítos que experimentam um número limitado de divisões assexuais se transformando em merozoítos (esquizogonia) nas células epiteliais intestinais. Em seguida, a reprodução sexual

permite a formação de gametas masculinos e femininos (gametogonia), que após a fertilização originam oocistos não esporulados ou imaturos que são liberados à luz intestinal dos felinos. Após um período no ambiente externo, a esporulação nos oocistos permite que estes sejam infecciosos para uma ampla gama de hospedeiros intermediários (DUBEY, 1998). Os felinos podem eliminar grandes quantidades de oocistos por uns 7 a 15 dias, superando os 100 000 por gramas de fezes (MCAULEY, 2014).

Uma vez que os oocistos ou cistos teciduais são ingeridos por hospedeiros intermediários, os esporozoítos ou bradizoítos, respectivamente, são liberados no intestino devido à ação das enzimas proteolíticas e o pH baixo (ATTIAS et al., 2020). Ambos se diferenciam rapidamente em taquizoítos, capazes de invadir e atravessar o epitélio intestinal. Posteriormente, *T. gondii* invade qualquer célula nucleada e começa a se reproduzir de maneira assexuada dentro dela. Esta replicação intracelular acontece sucessivamente até que a quantidade do parasito alcança entre 64 e 128, de forma que o vacúolo parasitóforo e a célula hospedeira são destruídos. Os taquizoítos são liberados ao fluxo sanguíneo, disseminando-se por todos os tecidos do corpo e iniciando a infecção aguda (COSTA; VILARIÑO, 2018; DÍAZ et al., 2010; MUÑIZ HERNÁNDEZ; MONDRAGON, 2009). Como resultado da resposta imune, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos e após de 7-10 dias da infecção os cistos tissulares aparecem, podendo permanecer durante toda a vida do hospedeiro, predominantemente no músculo cardíaco, esquelético e tecido nervoso (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Em casos em que ocorre uma deficiência da resposta imune, os bradizoítos podem se diferenciar novamente em taquizoítos, produzindo reativação da doença, o qual é causa importante de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (ÁLVAREZ et al., 2021).

A alimentação constitui a principal via de transmissão para os humanos. Assim, a infecção através da ingestão de água, frutas e verduras contaminados com oocistos esporulados após da prévia eliminação pelos gatos; consumo de carne crua ou malcozida, contaminada com as formas bradizoítos presentes nos cistos teciduais tem um papel relevante nos surtos de toxoplasmose clínica em humanos (ATTIAS et al., 2020; DUBEY, 2021; ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Práticas culinárias em alguns países, como França, representam um fator de risco importante para a toxoplasmose, onde mais do 50% das mulheres já tem sido infectadas, devido à preferência de carne pouca cozida (ROBINSON et al., 2021).

A infecção congênita também é possível, por meio da transmissão vertical de taquizoítos da mãe ao feto em desenvolvimento (BLADER et al., 2015). A toxoplasmose congênita

representa uma carga importante para a doença em humanos, sendo a suas manifestações clínicas as que direcionaram os primeiros estudos sobre a biologia do parasito, fisiopatologia e epidemiologia (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). A frequência da transmissão vertical e as complicações variam com a idade gestacional onde a doença é adquirida, nesse sentido, o controle imunológico durante a gestação poderia representar um fator relevante na aparição da doença e suas complicações (PFAFF et al., 2007).

Outras formas possíveis de transmissão incluem transfusões sanguíneas quando o doador tem adquirido a infecção recentemente, transplantes de órgãos que contem cistos teciduais ou taquizoítos, bem como acidentes de laboratório através da manipulação de agulhas contaminadas por profissionais da saúde (BOJAR; SZYMAŃSKA, 2010; HERWALDT, 2001).

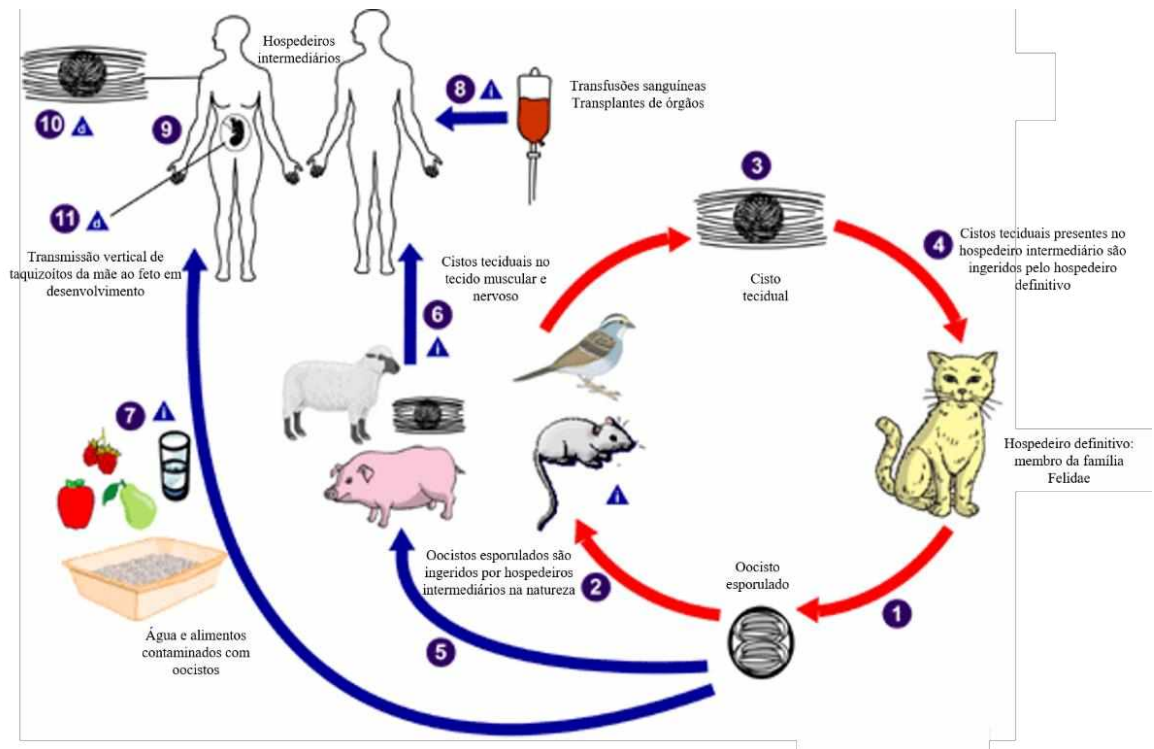


Figura 2. Ciclo biológico do *Toxoplasma gondii*. O parasito apresenta um ciclo de complexo, facultativamente heteroxênico que abrange inúmero de hospedeiros intermediários, e hospedeiros definitivos membros da família Felidae. Fonte: Imagem adaptada do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (<https://www.cdc.gov/dpdx/toxoplasmosis/index.html>).

1.3. Manifestações clínicas

As complicações da toxoplasmose, estão principalmente determinadas pelo estado imunológico do hospedeiro (DA SILVA et al., 2021). Geralmente, a infecção aguda pode ser assintomática em indivíduos imunocompetentes ou causar sintomas clínicos inespecíficos,

similares a uma gripe. Do ponto de vista médico, o reconhecimento da infecção é relevante em mulheres gestantes, onde o risco de transmissão do parasito ao feto e as complicações associadas são elevadas. A incidência da toxoplasmose congênita varia de acordo com o trimestre durante o qual a infecção materna foi adquirida. A taxa de transmissão é de quase 25% no primeiro trimestre, 54% no segundo trimestre e 65% no terceiro trimestre em mulheres não tratadas (MCAULEY, 2014). Assim mesmo, a idade gestacional é um fator determinante na gravidade da toxoplasmose congênita, sendo observado que quando a infecção é adquirida durante o primeiro trimestre pode causar abortos espontâneos, morte fetal, malformações neonatais, dano ocular e neurológico, como hidrocefalia, calcificações intracraniais, convulsões, coriorretinite (usualmente bilateral) e cegueira nos recém-nascidos (FATOOHI et al., 2002; SINGH, 2016). Durante o segundo e terceiro trimestre, o parasito pode causar uma doença subclínica que produz alterações oculares como coriorretinite, estrabismo, cegueira, retardo no crescimento e dificuldades de aprendizagem que podem se manifestar até meses ou anos após do nascimento (MCAULEY, 2014; WEISS; DUBEY, 2009). Em geral, o prognóstico dos pacientes com toxoplasmose congênita é desfavorável, sendo que mais de 10% falece, e daqueles que sobrevivem 80% apresenta alterações oculares e mais do 80% retardo mental (MCAULEY, 2014). Desde que a toxoplasmose congênita resulta de uma infecção antes ou durante da gestação, é crucial estimar o tempo aproximado da infecção para o acompanhamento clínico e controle adequado da gravidez, no intento de mitigar a gravidade da doença (DRAPAŁA et al., 2014).

A detecção do parasito também é importante em indivíduos imunossuprimidos como pacientes com HIV, doença autoimune, câncer, transplantados ou pacientes realizando terapia imunossupressora, onde a reativação da doença e propagação sistêmica do parasito pode provocar problemas severos de saúde. Em pacientes com HIV, a encefalite toxoplásmica é a complicação do sistema nervoso central mais frequente, havendo sido reportado uma prevalência de até 40% nestes pacientes (LUFT; REMINGTON, 1992). Geralmente, as manifestações da doença incluem encefalites, meningoencefalites, lesões tumorais, ataques epilépticos, danos importantes ao sistema nervoso, assim como conjuntivites, miocardites e pneumonia, os quais dependendo de diversos fatores podem inclusive levar à morte dos pacientes (AMBROISE-THOMAS, 2001; LUFT; REMINGTON, 1992).

Atualmente algumas investigações sugerem, associações entre a infecção por *T. gondii* e alterações neurológicas e psiquiátricas, como esquizofrenia, doença de Alzheimer,

comportamento ansioso/depressivo e inclusive pensamentos de suicídio, sendo necessário ainda mais estudos para avaliar essas associações (MCAULEY, 2014).

1.4. Relação parasito-hospedeiro: invasão da célula do hospedeiro

A invasão é um evento crucial na sobrevivência e persistência da infecção por *T. gondii*. Este evento envolve a secreção de três organelas principais: micronemas, roptrias e grânulos densos; os quais são liberados por meio do complexo apical do parasito durante o processo de invasão celular e são os responsáveis de manter a relação parasito-hospedeiro (LUO et al., 2019). Outro grupo importante de proteínas são os antígenos de superfície, os quais tem um papel relevante no processo inicial de reconhecimento e invasão celular, como na evasão e manipulação da resposta imune do hospedeiro (LEKUTIS et al., 2001).

O processo de invasão é iniciado pelo reconhecimento da célula hospedeira a partir dos antígenos de superfície do *T. gondii*. Estas proteínas denominadas SRS (sequências relacionadas SAG1) estão expressas na membrana do parasito ancoradas através do glicosilfosfatidil-inositol (GPI) (JUNG; LEE; GRIGG, 2004). Em seguida, o parasito se une à membrana da célula do hospedeiro, a partir da secreção de adesinas por parte das micronemas (MIC). A MIC2, interage com os receptores da célula hospedeira permitindo a reorientação e adesão inicial do parasito através do seu extremo apical. A invasão celular é possível, através de um processo complexo denominado junção de movimento, que permite uma associação íntima entre a superfície da célula a ser invadida e o parasito, prévio a internalização deste dentro de um vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). Esse processo complexo é possível pela distribuição de um antígeno de membrana apical (AMA1) na superfície do *T. gondii*, também secretados pelas micronemas, assim como as proteínas das organelas roptrias (ROP) que são inseridas na membrana plasmática da célula hospedeira (DUBREMETZ, 2007).

Após a invasão, para a formação do vacúolo parasitóforo (VP) é requerida a secreção de proteínas das ROP assim como proteínas de grânulos densos (GRA). Durante esse processo o citoesqueleto do parasito sofre modificações que favorecem a entrada na célula. As ROP participam na formação da membrana do VP donde o *T. gondii* sobreviverá e multiplicará, além disso, induzem mudanças bioquímicas no citosol da célula evitando a fusão de lisossomas ou qualquer outra vesícula que consiga alterar o VP. As GRA formam uma rede complexa de tubos de membrana e estruturas filamentosas que permitem a troca de nutrientes entre o parasito e a célula hospedeira. Finalmente, o VP fornece proteção ao parasito enquanto esse se multiplica

sucessivamente por endodiogenia, até atingir a quantidade de 64 a 128 parasitos. Neste momento, se produz a ruptura da membrana da célula hospedeira e a liberação dos taquizoítos no espaço extracelular, os quais podem infectar outras células iniciando novamente o ciclo (ATTIAS et al., 2020; BLACK; BOOTHROYD, 2000).

1.5. Resposta imune

Uma vez que o parasito é ingerido e infecta as células do hospedeiro, células da imunidade inata são atraídas pela liberação local de citocinas, como TNF- α , IL-6 e IL-12 pelas células infectadas (SASAI; YAMAMOTO, 2019). As primeiras células a responder são neutrófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos. Inicialmente os neutrófilos contribuem diminuindo a carga parasitária ao fagocitar os parasitos livres (BLISS et al., 2001). A IL-12 produzidas pelas células dendríticas e os macrófagos durante a resposta imunitária inata estimula a proliferação de células NK, e eventualmente células T CD4⁺ e células T CD8⁺ citotóxicas após a apresentação de antígenos parasitários pelo MHC, o que resulta numa produção massiva de IFN- γ . A produção de IFN- γ durante a resposta imune inata e adaptativa permite controlar a infecção parasitaria. Os sinais gerados pelo IFN- γ , ativam o fator de transcrição nuclear STAT1, que controla expressão de diversos genes, permitin que monócitos e macrófagos aumentem a sua atividade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), que finalmente contribuem com a eliminação de parasitos (HUNTER; SIBLEY, 2012).

1.6. Tratamento

Geralmente, o tratamento tradicional para a toxoplasmose adquirida e congênita está limitado ao uso de fármacos antimicrobianos. O regime de tratamento convencional compreende a combinação sinérgica de três fármacos: pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico. A pirimetamina é um inibidor da enzima dihidrofolato redutase (DHFR), por isto atua como um agonista do ácido fólico, bloqueando a síntese de ácidos nucleicos e a multiplicação do parasito. O mecanismo de ação deste medicamento, é reforçado quando é administrado em combinação com sulfonamidas, como a sulfadiazina, que também é capaz de bloquear a via metabólica dos folatos de *T. gondii*, ao inibir competitivamente a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS). Para reduzir os efeitos colaterais, como potencial teratogênico e supressão da medula óssea, essas drogas são administradas com o ácido folínico (leucovorina) (DA SILVA et al., 2021). Desafortunadamente esses medicamentos apenas são efetivos contra

taquizoítos responsáveis pela infecção aguda, e não tem nenhum efeito sobre o estágio latente da doença (DAHER et al., 2021). Devido aos efeitos prejudiciais e as limitações associadas ao tratamento atualmente disponível novas estratégias de imunização estão sendo pesquisadas, porém ainda não existe uma vacina disponível para a administração em humanos (BARROS et al., 2021).

1.7. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção por *T. gondii* através de métodos sensíveis e específicos é um passo fundamental no tratamento e manejo dos pacientes com suspeita de toxoplasmose. Existem numerosas técnicas classicamente utilizadas para o diagnóstico desta doença, como o teste de Sabin-Fieldman, imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunossorvente ligado a enzimas (ELISA), visualização direta do parasito, detecção histológica do parasito e/ou antígenos específicos, isolamento e cultivo do parasito no modelo animal ou através da cultura celular, e amplificação do DNA específico de *T. gondii* por PCR (MURAT et al., 2013; POMARES; MONTOYA, 2016; VILLARD et al., 2016). Apesar desta grande variedade de testes, os testes serológicos adaptados para a detecção de anticorpos específicos IgA, IgM e IgG, contra antígenos do parasito, são os mais utilizados.

Enquanto os humanos podem ser infectados por qualquer um dos três estádios infecciosos (esporozoítos, bradizoítos e taquizoítos), a maioria dos testes comerciais disponíveis utilizam antígenos nativos derivados dos taquizoítos de *T. gondii*. Apesar da alta sensibilidade e especificidade destes antígenos, apresentam desvantagens relacionadas aos altos custos em sua obtenção, procedimentos trabalhosos, e variações na qualidade devido aos diferentes métodos de preparação, que finalmente ocasionam resultados ambíguos e evitam assim um diagnóstico preciso (SUDAN; JAISWAL; SHANKER, 2013; TOMASZ FERRA et al., 2019). Além disso, estudos demonstram que estas preparações antigênicas não apresentam a capacidade de diferenciar as fases clínicas da infecção (aguda e crônica) (MURAT et al., 2013; ROIKO et al., 2018).

Devido às dificuldades associadas ao uso de antígenos nativos de *T. gondii*, novas ferramentas de diagnóstico estão sendo investigadas. Neste sentido, os antígenos recombinantes de *T. gondii* têm sido sugeridos por poderem oferecer importantes vantagens como: melhor conhecimento da composição do antígeno, maior facilidade de otimizar a expressão e padronização da quantidade das proteínas o qual aumenta a reprodutibilidade dos resultados, e possibilidade de ser utilizados de maneira individual ou em conjunto como marcadores seletivos

das fases da infecção, o que é relevante desde o ponto de vista clínico (LUO et al., 2019; SANTANA et al., 2012; TOMASZ FERRA et al., 2019). Apesar dos resultados promissores com estes antígenos recombinantes, nenhum tem demonstrado as propriedades necessárias para substituir os antígenos nativos de taquizoítos nos métodos sorológicos, o que indica a necessidade de mais estudos para a identificação de um antígeno que possa ser utilizado com fins clínicos (BEGHETTO et al., 2006).

1.8. Análise *in silico*

Na busca de melhorar o diagnóstico da toxoplasmose, tem-se sugerido o uso de diferentes sequências de antígenos de *T. gondii*, determinadas a partir de métodos imunoinformáticos. Essas regiões antigênicas, conhecidas como epítomos de células B, podem ser divididos em dois tipos: contínuos ou lineares, e descontínuos ou conformacionais. Os epítomos lineares estão formados por resíduos de aminoácidos que se dispõem de forma contínua, enquanto que os epítomos conformacionais estão constituídos por aminoácidos que se acham separados na sequência da estrutura primária que se juntam no espaço pelo dobramento da estrutura. Se tem reconhecido a ampla utilidade de ferramentas de bioinformática na predição da estrutura, características e função biológica das proteínas, bem como no análise de epítomos lineares de células B, que podem ser utilizados no desenho de vacinas e testes de imunodiagnóstico (DAI et al., 2012; L. DUDEK et al., 2010; LIU et al., 2010).

O uso de epítomos de células B se tem convertido numa alternativa interessante por serem determinantes antigênicos com diversas vantagens como um conhecimento preciso do antígeno, produção em grande escala com menor custo e tempo e facilidade da padronização de métodos de diagnóstico usando inclusive mais de um epítomo identificado (LIU et al., 2010). Assim, peptídeos multiepítomos tem surgido como uma ferramenta promissora no diagnóstico da toxoplasmose em humanos ao utilizar antígenos característicos das fases aguda e crônica (DAI et al., 2013).

Segundo a literatura, as moléculas de *T. gondii* mais imunogênicas e promissórias para o desenvolvimento de vacinas e imunoenaios incluem proteínas de grânulos densos (GRA), antígenos de superfície (SAG), roptrias e micronemas (MIC), sendo expressas em diferentes fases da infecção (COUPER et al., 2003; MAKSIMOV et al., 2012; REZAEI et al., 2019; YBAÑEZ; NISHIKAWA, 2022).

Neste sentido o uso de ferramentas *in silico* na identificação precisa de epítomos antigênicos expressados nos estádios diferentes de *T. gondii*, poderiam representar a melhor

estratégia no desenvolvimento de ensaios sorológicos eficazes para detectar anticorpos anti- *T. gondii* (COSTA; DURÉ, 2016; JAVADI MAMAGHANI et al., 2019).

A sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico dependem dos antígenos utilizados. As investigações tem demonstrado que o uso peptídeos sintéticos melhoram significativamente o desempenho dos testes sorológicos disponíveis, portanto, neste trabalho foi realizado uma análise bioinformático de peptídeos derivados de proteínas imunodominantes de *T. gondii*, com o objetivo de caracterizar e selecionar as regiões mais antigênicas com potencial diagnóstico da infecção em futuros imunoensaios, bem como na determinação da fase clínica e vias de infecção, que contribuía finalmente com o desenvolvimento de medidas para controlar e manejar os pacientes afetados.

2. JUSTIFICATIVA

A toxoplasmose é um importante problema de saúde pública que afeta um terço da população humana. A maioria das vezes, a infecção aguda é assintomática em indivíduos imunocompetentes podendo evoluir para uma fase crônica sem que seja percebida pelo paciente ou profissionais de saúde. Em casos de ausência de uma potente resposta imunitária em indivíduos imunocomprometidos, e nos casos de toxoplasmose congênita, as consequências associadas a esta infecção podem ser graves, inclusive levando à morte. Geralmente, o diagnóstico da infecção por *T. gondii* é feito através de testes sorológicos que detectam os anticorpos específicos IgA, IgM e IgG; e utilizam antígenos nativos derivados de taquizoítos de *T. gondii*. Estas técnicas oferecem suficiente sensibilidade e precisão para detectar a presença ou ausência do parasito, porém o problema surge em diferenciar a infecção aguda da infecção crônica, que resulta importante em gestantes e indivíduos imunocomprometidos. Além disso, as técnicas disponíveis não são capazes de diferenciar as vias de infecção, que podem ocorrer de forma horizontal pela ingestão de oocistos ou cistos teciduais; o que evita a implementação de medidas preventivas para controlar a infecção, e garantir uma melhor qualidade de vida às pessoas afetadas. Por conseguinte, nesta investigação se avaliou, através de ferramentas *in silico*, o potencial de peptídeos derivados das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A como possíveis ferramentas para melhorar o diagnóstico da infecção por *T. gondii*, e oferecer alternativas que apresentem maior sensibilidade e especificidade em futuros imunoenaios para identificar a fonte de infecção bem como a diferenciação sorológica das fases da toxoplasmose.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Determinar por meio de um análise *in silico* o potencial dos peptídeos SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A como possíveis ferramentas para o diagnóstico da toxoplasmose humana

3.2. Objetivos específicos

- Identificar epítomos lineares de células B a partir das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A de *T. gondii*;
- Determinar as propriedades físico-químicas dos epítomos preditos a partir das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A de *T. gondii*;
- Analisar a acessibilidade e antigenicidade dos epítomos preditos a partir das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A de *T. gondii*;
- Construir e validar modelos 3D das proteínas SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4 e CCp5A de *T. gondii*, e seus respectivos epítomos lineares.

4. REFERÊNCIAS

- ÁLVAREZ, G. G. et al. Identification of Oocyst-Driven *Toxoplasma gondii* Infections in Humans and Animals through Stage-Specific Serology-Current Status and Future Perspectives. **Microorganism**, v. 9, n. 11, p. 2346, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112346>.
- AMBROISE-THOMAS, P. Parasitic diseases and immunodeficiencies. **Parasitology**, v. 122, n. S1, p. S65-71, 2001. <https://doi.org/10.1017/S0031182000017339>.
- ATTIAS, M. et al. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 588, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04445-Z>.
- BARROS, M. et al. Vaccines in Congenital Toxoplasmosis: Advances and Perspectives. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 621997, p.1-9, 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.621997>.
- BEGHETTO, E. et al. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2133–2140, 2006. <https://doi.org/10.1128/JCM.00237-06>.
- BEN-HARARI, R. R.; CONNOLLY, M. P. High burden and low awareness of toxoplasmosis in the United States. **Postgraduate Medicine**, v. 131, n. 2, p. 103–108, 2019. <https://doi.org/10.1080/00325481.2019.1568792>.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 607, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>.
- BLADER, I. J. et al. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 463–485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>.
- BLISS, S. K. et al. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4898–4905, 2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.4898-4905.2001>.
- BOJAR, I.; SZYMAŃSKA, J. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii* – state of the art. **Annals of agricultural and environmental medicine**, v. 17, n. 2, p. 209-214, 2010. PMID: 21186761.
- CARRUTHERS, V.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 83–89, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>.
- COSTA, J. G.; DURÉ, A. B. Effectiveness of two sequences of *Toxoplasma gondii* SAG2 protein to differentiate toxoplasmosis infection stages by measuring IgG, IgA and IgM antibodies. **Tropical Biomedicine**, v. 33, n. 2, p. 246–259, 2016. PMID: 33579091.
- COSTA, J. G.; VILARIÑO, M. J. Antigens to detect the acute phase of toxoplasmosis in pregnant women: Standardized comparison. **Biomarkers in Medicine**, v. 12, n. 5, p. 517–534, 2018. <https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0345>.
- COUPER, K. N. et al. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface

antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. **Vaccine**, v. 21, n. 21–22, p. 2813–2820, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00163-4).

CRAWFORD, J. et al. Structural and functional characterization of SporoSAG: A SAG2-related surface antigen from *Toxoplasma gondii*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 16, p. 12063–12070, 2010. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.054866>.

DA SILVA, M. et al. Promising drug targets and compounds with anti-*toxoplasma gondii* activity. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1960, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091960>.

DAHER, D. et al. Comprehensive Overview of *Toxoplasma gondii*-Induced and Associated Diseases. **Pathogens**, v. 10, n. 11, p. 1351, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111351>.

DAI, J. et al. *Toxoplasma gondii*: Enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 95–100, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.016>.

DAI, J. et al. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 3, p. 338–342, 2012. <https://doi.org/10.1128/CVI.05553-11>.

DÍAZ, L. et al. Toxoplasmosis y embarazo. **Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela**, v. 70, n. 3, p. 190–205, 2010. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0048-77322010000300006&lng=es&nrm=iso.

DRAPAŁA, D. et al. A new human IgG avidity test, using mixtures of recombinant antigens (rROP1, rSAG2, rGRA6), for the diagnosis of difficult-to-identify phases of toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 3, p. 342–346, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.005>.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 7, p. 1019–1024, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X).

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis in sheep—The last 20 years. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1–2, p. 1–14, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.026>.

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

DUBEY, J. P. Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, p. 263, 2021. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04769-4>.

DUBREMETZ, J. F. Rhoptries are major players in *Toxoplasma gondii* invasion and host cell interaction. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 841–848, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00909.x>.

FATOOHI, A. F. et al. Cellular Immune Responses to Recombinant Antigens in Pregnant

- Women Chronically Infected with *Toxoplasma gondii*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 3, p. 704, 2002. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.3.704-707.2002>.
- FERGUSON, D. J. P. Use of molecular and ultrastructural markers to evaluate stage conversion of *Toxoplasma gondii* in both the intermediate and definitive host. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 347–360, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.024>.
- HERWALDT, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659–688, 2001. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>.
- HUNTER, C. A.; SIBLEY, L. D. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 766–778, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2858>.
- INNES, E. A. et al. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, n. 14, p. 1887–1894, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0031182009991636>.
- JAVADI MAMAGHANI, A. et al. Candidate antigenic epitopes for vaccination and diagnosis strategies of *Toxoplasma gondii* infection: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, n. 103788, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103788>.
- JUNG, C.; LEE, C. Y. F.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 285–296, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.004>.
- KAŇKOVÁ, Š.; FLEGR, J.; CALDA, P. An elevated blood glucose level and increased incidence of gestational diabetes mellitus in pregnant women with latent toxoplasmosis. **Folia Parasitologica (Praha)**, v. 62, n.56, p. 1-6, 2015. <https://doi.org/10.14411/fp.2015.056>.
- DUDEK, L. N. et al. Epitope Discovery and Their Use in Peptide Based Vaccines. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3149–3157, 2010. <https://doi.org/10.2174/138161210793292447>.
- LEKUTIS, C. et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 1285-1292, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00261-2](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00261-2).
- LIU, X. et al. Identification of a novel linear B-cell epitope in the UL26 and UL26.5 proteins of Duck Enteritis Virus. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2010. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-223>.
- LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic Encephalitis in AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 211–222, 1992. <https://doi.org/10.1093/clinids/15.2.211>.
- LUO, J. et al. Identification of novel antigens for serum IgG diagnosis of human toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v. 204, n. 222, p. 107722, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107722>.
- MACÊDO, A. G. et al. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 163, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-163>.

- MAI, K. et al. Oocyst wall formation and composition in coccidian parasites. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 2, p. 281-289, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200022>.
- MAKSIMOV, P. et al. Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 6, p. 865–874, 2012. <https://doi.org/10.1128/CVI.00119-12>.
- MCAULEY, J. B. Congenital Toxoplasmosis. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. 1, p. S30–S35, 2014. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu077>.
- MOLAN, A. et al. Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. **Tropical Biomedicine**, v. 36, n. 4, p. 898–925, 2019. PMID: 33597463.
- MUÑIZ-HERNANDEZ, S.; MONDRAGON, R. F. *Toxoplasma gondii*, un patógeno asesino re-emergente. **Revista de Educación Bioquímica**, v. 28, n. 2, p. 52–58, 2009. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2009/reb092d.pdf>.
- MURAT, J. B. et al. Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations? **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 9, p. 943–956, 2013. <https://doi.org/10.1586/14787210.2013.825441>.
- PFUFF, A. W. et al. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: The dual role of IFN- γ . **Parasitology**, v. 134, n. 13, p. 1895–1902, 2007. <https://doi.org/10.1017/S0031182007000200>.
- POMARES, C.; MONTOYA, J. G. Laboratory Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 10, p. 2448–2454, 2016. <https://doi.org/10.1128/JCM.00487-16>.
- REZAEI, F. et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 172–184, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.003>.
- ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, M. L. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 2, p. 264–296, 2012. <https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>.
- ROBINSON, E. et al. National perinatal survey demonstrates a decreasing seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women in France, 1995 to 2016: impact for screening policy. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 5, p.1-12, 2021. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.5.1900710>.
- ROIKO, M. S. et al. *Toxoplasma gondii*-positive human sera recognize intracellular tachyzoites and bradyzoites with diverse patterns of immunoreactivity. **International journal for parasitology**, v. 48, n. 3–4, p. 225, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.08.016>.
- SANTANA, S. S. et al. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v. 143, n. 2, p. 193–201, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.02.008>.
- SASAI, M.; YAMAMOTO, M. Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against

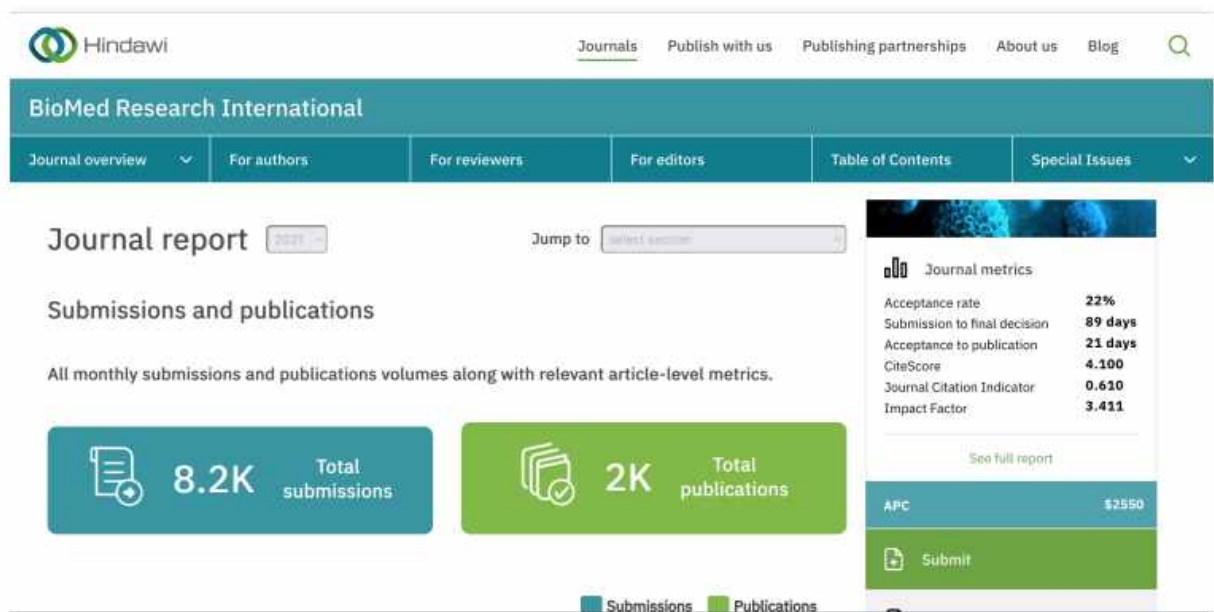
- Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 12, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>.
- SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, n. 6390, p. 82–85, 1992. <https://doi.org/10.1038/359082a0>.
- SINGH, Sarman. Congenital toxoplasmosis: Clinical features, outcomes, treatment, and prevention. **Tropical Parasitology**, v. 6, n. 2, p. 113, 2016. <https://doi.org/10.4103/2229-5070.190813>.
- SKARIAH, S.; MCINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitology Research**, v. 107, n. 2, p. 253, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>.
- SUDAN, V.; JAISWAL, A. K.; SHANKER, D. Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis. **Clinical Reviews and Opinions**, v. 5, n. 2, p. 11–17, 2013. <https://doi.org/10.5897/CRO11.022>.
- SUN, X. et al. A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens. **Parasites and Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-241>.
- TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1217–1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7).
- TOMASZ-FERRA, B. The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in mouse and human sera. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–23, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217866>.
- VILLARD, O. et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection: Recommendations from the French National Reference Center for Toxoplasmosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 84, n. 1, p. 22–33, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.09.009>.
- WEISS, L. M.; DUBEY, J. P. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 8, p. 895–901, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>.
- YBAÑEZ, R. H.; NISHIKAWA, Y. Comparative Performance of Recombinant GRA6, GRA7, and GRA14 for the Serodetection of *T. gondii* Infection and Analysis of IgG Subclasses in Human Sera from the Philippines. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 277, 2022. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020277>.

CAPÍTULO II

Manuscrito redigido e formatado para ser submetido na Revista:

Biomed Research International

***In silico* comparative analysis of novel peptides derived from *Toxoplasma gondii* immunodominant proteins as potential tools for the diagnosis of human toxoplasmosis.**



Title:

***In silico* comparative analysis of novel peptides derived from *Toxoplasma gondii* immunodominant proteins as potential tools for the diagnosis of human toxoplasmosis**

AUTHORS:

Angelis del Valle Benitez Betancourt, Tamires Lopes Silva, Tiago Wilson Patriarca Mineo, José Roberto Mineo*

Laboratory of Immunoparasitology Dr. Mario Endsfieldz Camargo, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia - Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Av. Amazonas, Bloco 4C - Campus Umuarama, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil – Phone: +55 34 3225-866 – E-mail: jrmineo@ufu.br

Abstract

Serological tests for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection have limitations in differentiating acute from chronic infection, which is important in determining the clinical management and treatment of pregnant women and immunocompromised individuals with toxoplasmosis. Here, an *in silico* analysis was performed to characterize immunogenic epitopes of SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A proteins that may emerge as alternatives to improve the diagnosis of toxoplasmosis. Once the protein sequences were retrieved from the Toxodb database, different parameters were calculated including physicochemical characteristics, accessibility values, and antigenicity. Multiple sequence alignment, 3D structure modeling, refinement, and validation were also performed among all 11 peptides. Considering the results from the combination of all parameters analyzed, it can be concluded that the peptides of SAG1, GRA3, and BSR4 proteins were found to be stable, hydrophilic, with significant antigenicity values, and accessibility on the protein surface. Thus, the use of these peptides may suggest alternative measures for the design and standardization of new immunodiagnostic assays for toxoplasmosis.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, immunodiagnosis, *in silico*, peptide predictions, immunodominant epitopes.

Introduction

Toxoplasmosis is a widely spread zoonosis worldwide, caused by the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, a protozoan with the ability to infect a large number of warm-blooded animal species, including humans [1,2]. With approximately one-third of the world's population chronically infected by different genotypes, and a prevalence that varies extensively depending on the geographic region, toxoplasmosis is one of the neglected parasitic infections requiring active health control [3-6]. In this regard, the development of effective diagnostic methods, as well as vaccines, is necessary to avoid the consequences of toxoplasmosis on the global public health, and economy [7].

Usually, infection is asymptomatic in immunocompetent individuals, sometimes causing nonspecific clinical signs [8]. From the medical point of view, the recognition of the infection is relevant in pregnant women, where the risk of transmission of the parasite to the fetus is high, and the associated consequences can compromise the life of the fetus and infected mothers. The detection of the parasite is also important in immunosuppressed individuals, such as HIV, cancer, and transplant patients, where the reactivation of the disease can cause severe health problems, which depending on various factors can even lead to death of these patients [9,10].

The diagnosis of *T. gondii* infection through sensitive and specific methods is a fundamental step in treating and managing patients with suspected toxoplasmosis. *T. gondii* is capable of inducing a potent immune response generating persistent antibody titers, thus, the diagnosis of toxoplasmosis carried out by serological tests, with emphasis for the detection of specific IgA, IgM, and IgG antibodies, against antigens of the parasite is useful [11,12]. While humans can be infected by any of the three infectious stages (sporozoites, bradyzoites, and tachyzoites), most commercial tests use native antigens derived from *T. gondii* tachyzoites. Despite of their high sensitivity and specificity, it has been shown that the use of these antigens has limitations associated with different production and purification methods, laborious procedures, and difficulties in standardizing which finally cause ambiguous results, avoiding the accurate diagnosis and effective therapeutic and preventive procedures [11,13]. Moreover, it has been described in the literature that these antigenic preparations lack the ability to differentiate the clinical phases of infection (acute and chronic) [14,15].

Due to the currently difficulties associated with the use of native *T. gondii* antigens, new diagnostic tools are being investigated. Recombinant antigens, chimeric antigens, and peptides

derived from *T. gondii* proteins have been suggested by various studies, not only to improve the diagnosis of *T. gondii* infection but also to improve the ways to discriminate the different stages of toxoplasmosis [11,12,16-18]. The use of bioinformatics tools, for the characterization of these new antigenic peptides capable of selectively stimulating the B-cell response, has a relevant role to make possible to understand the antigenic structure of pathogens and to design new diagnostic methods and vaccine applications for several diseases [19].

The life cycle of *T. gondii* is complex and the expression of its proteins changes during different stages of development, some of which have been recognized to activate the immune system generating antibody titers that remain throughout the life of the host [20,21]. The surface antigens SAG1 and SAG2A of *T. gondii* are highly immunogenic proteins that are expressed primarily on tachyzoites [22,23]. SAG1 has been used in several serodiagnosis studies that have suggested the usefulness of this antigen in detecting IgG antibodies in chronically infected individuals [24,25]. SAG2A has been considered a potential marker for the diagnosis of acute toxoplasmosis in humans [26].

Dense granule proteins (GRA) play an important role in the process of host cell invasion. They have been shown good antigenicity expressed, and being expressed by both tachyzoites and bradyzoites they have been recognized as both acute and chronic phase markers [7,27-29]. The GRA 1, 2, 3, 5, 6, 7 antigens have demonstrated utility in the detection of antibodies to *T. gondii* with high sensitivity in acute and chronic phases of toxoplasmosis [27,30-33].

The surface antigen BSR4 and matrix antigen 1 (MAG1) are bradyzoite-specific proteins involved in human B and T cell responses [34,35]. In an ELISA assay, BSR4 protein demonstrated specific immunoreactivity in sera from patients in the chronic phase and MAG1 detected antibodies in the acute stage more frequently than in the chronic stage of toxoplasmosis [34,36]. CCp5A is a polypeptide specifically expressed by *T. gondii* sporozoites and is considered a good molecular marker to differentiate infectious stages [18]. Thus, the identification of B cell epitopes from *T. gondii* immunodominant proteins could be a determining factor in the diagnosis of *T. gondii* infection and differentiation of clinical stages, from the appropriate selection of epitopes of antigens expressed in different stages of the parasite [37].

In the present study, an *in silico* analysis was performed to characterize B-cell epitopes from the sequence of immunodominant proteins using different bioinformatics tools, aiming to provide new alternatives to improve the diagnosis of *T. gondii* infection. Our results suggested that peptides derived from SAG1, GRA3, and BSR4 proteins presented potential to be

considered in the design of new serological methods for the diagnosis of toxoplasmosis.

Materials and methods

1. Prediction and analysis of linear B-cell epitopes

To analyze the presence of linear B cell epitopes in *T. gondii* immunodominant antigens, complete sequences of the proteins SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A were obtained from the ToxoDB database (<https://toxodb.org/toxo/>). The sequences of each protein were thoroughly analyzed using bioinformatics tools for immunological epitope prediction, available online in the IEDB software (epitope database and analysis resource - <https://www.iedb.org/>). The prediction of linear epitopes was made based on data obtained from the Bepipred version 2.0 linear epitope prediction method (BepiPred-2.0: Sequential B-Cell Epitope Predictor), using as reference *scores* equal to or greater than 0.5. Using the Random Forest Regression algorithm, the BepiPred 2.0 server is able to predict linear B-cell epitopes from the 3D structure of the protein. Bepipred 2.0 represents a method with improved predictive power compared to other methods available online, which predicts that residues with values above the threshold (predetermined value 0.5) are part of a B-cell epitope [38].

2. Sequence alignment and estimation of phylogenetic trees

The multiple sequence alignment of the immunodominant proteins of *T. gondii*, was done on the MUSCLE website (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). The obtained information was used to analyze and evaluate the homology and conservation of the chosen peptides among *T. gondii* strains, as well as for the estimation of phylogenetic trees, using the Jalview software (<https://www.jalview.org/>) [39].

3. Prediction of physicochemical properties, accessibility, and antigenicity

To estimate the physicochemical properties of the selected epitopes, the web tool ProtParam (ExPASy) was used (<https://web.expasy.org/protparam/>), which calculated the main parameters of the sequences such as molecular weight (MW), theoretical isoelectric point (pI), aliphatic index, instability index and average hydrophobicity (GRAVY). From this analysis, it was possible to characterize the peptides.

The solvent accessibility of the selected peptides was determined using the Emini

method [40] available on the IEDB website. The Emini method calculates the probability of amino acids being exposed on the surface of a given protein when the peptides' score is greater than the set threshold value (greater than or equal to 1).

The antigenicity of peptides was analyzed using the web tool VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). The prediction of antigens through the VaxiJen v2.0 website is based solely on the physicochemical characteristics of the proteins of a given organism (parasites, bacteria, fungi, viruses) and the transformation of the sequences into uniform vectors of the main amino acid properties using the automatic cross-covariance (ACC) system [41].

4. 3D modeling of the proteins

The construction of the three-dimensional structure of SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A proteins was done in the I-TASSER software (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). The I-TASSER tool predicts the 3D structure of proteins by identifying structural templates from Protein Data Bank (PDB) and iterative simulations of fragment structural assembly with high accuracy [42]. The reliability of the generated models is estimated according to the C-score, which is generally in the range of -5 to 2, with higher or positive values indicating a model of high reliability. The server produces PDB extension files that enabled analysis of the generated structures in Discovery Studio and PYMOL.

5. 3D modeling of the peptides

Using the Pep Fold website (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>) the 11 predicted peptides were modeled. For 3D modeling of peptides of up to 52 amino acid residues, Pep Fold uses the structural alphabet (SA) concept derived from the hidden Markov model and ensembles the predicted fragments using an algorithm and modified version of the coarse-grained force field (OPEP) [43].

6. Refinement and validation of the 3D modeling of proteins and peptides

The best 3D models obtained from the I-TASSER and Pep Fold servers were subjected to structural refinement, where necessary, on the Modrefiner website (<https://zhanggroup.org/ModRefiner/>). Modrefiner uses an algorithm to structurally refine proteins with high resolution. Whether it is from the C-alpha trace, main-chain model or atomic

model Modrefiner allows to significantly improve the physical quality of the structures [44]. Next, the quality of the refining and the 3D structure was checked by analyzing the Ramachandran diagram obtained in the PROCHECK program, a tool available on the PDB SUM website (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>). With the Ramachandran diagram, it is possible to detect phi-psi torsion angles for all amino acid residues in a structure, allowing analysis of which residues lie outside the energetically favorable regions and thus verifying the conformational or stereochemical stability of the protein [45].

7. 3D structure alignment of proteins and peptides

Once modeled and validated, the 3D structures of the proteins and their respective predicted peptides were aligned using PYMOL software (<https://pymol.org/2/>). PYMOL is a tool that allowed visualization of the 3D models as well as analysis of the arrangement of the peptides calculating the RMSD and their accessibility on the protein surface.

Results

1. B-cell epitope prediction design

Using as reference scores equal to or greater than 0.5 in each prediction, as suggested in the Bepipred 2.0 method, it was possible to identify a total of 11 linear B-cell epitopes from the *T. gondii* immunodominant proteins SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A, with amino acid sequences between 12 and 21 residues, arranged in the least polymorphic regions of the proteins and with the best scores, as shown in **Figure 1**. The numbers of predicted epitopes, their length, size, as well as the protein to which they belong, are shown in **Table 1**.

2. Homology and phylogenetic relationship

To verify that the predicted peptides were conserved among the *T. gondii* strains of interest, multiplex sequence alignment was performed. The results of alignment and phylogenetic tree construction are shown in **Figure 2**.

According to the alignment, it was possible to observe that the predicted peptides for SAG1, GRA1, GRA2, GRA3, GRA6, and CCp5A showed a high degree of conservation and identity in the different *T. gondii* strains, such as types I, II, and III of epidemiological

importance. The BSR4 peptide was totally conserved only in 5 strains for which the protein has been described, among them the RH and ME49 strains (**Figure 2J**).

Regarding the SAG2A peptide, it was possible to observe that most residues were highly conserved, with good alignment quality and consensus among amino acids, however, it is known that the SAG2A protein is highly polymorphic. Only the addition of glycine (G) residue was present in strains ME49, MAS, ARI, and PRC2, with a consensus of 31%. It was not present in type I and type III strains. The substitution of the amino acid alanine (A), for threonine (T) at position 128, was observed in *T. gondii* strain VAND (**Figure 2B**).

For GRA5, most residues were conserved, a conservative substitution of histidine (H) by an asparagine (N) was observed at position 71 in the *T. gondii* MAS strain (**Figure 2F**). After analyzing the GRA7 peptide, some amino acid substitutions were observed, and the predicted peptide did not show a high degree of conservation between different strains (**Figure 2H**). Also, the sequence alignment of MAG1 resulted in a high percentage of identity and similarity, but the strains ME49, GARI, PRC2 showed a non-conservative substitution of the amino acid arginine (R) by glutamine (Q) at position 111 (**Figure 2I**). In this regard, it would be interesting to consider whether differences between amino acid residues could affect the recognition of infection by other *T. gondii* strains.

3. General characteristics of peptides: physicochemical properties, accessibility, and antigenicity

The physicochemical parameters calculated using ExPASy's ProtParam tool are shown in **Table 2**. The server results showed that all peptides had a molecular weight above 1000 kDa. For most peptides, the isoelectric point values were less than 7 and were considered to be acidic. The isoelectric point indicates the pH at which a protein has zero net charges. At this pH there is a decrease in repulsive interactions and, therefore, the interaction between the molecules is improved, thus even the proteins are more stable [46]. In this case, the predicted peptides would be more stable at acidic pH, except for peptides GRA5, GRA6, and BSR4 which would be more stable at basic pH.

Defined as the relative volume occupied by aliphatic side chains (alanine, valine, isoleucine, and leucine), the aliphatic index provides an estimate of the thermal stability of a protein. The aliphatic index of the peptides ranged from 16.67 to 60.00, with the higher the aliphatic index the peptides may be more stable over a wide temperature range. The predicted peptides showed an acceptable aliphatic index, with the GRA5 peptide having the highest index,

and were thus considered to be thermostable [47].

The instability index estimates the stability of the protein in a test tube. A protein with an instability index lower than 40 is considered stable, while a value higher than 40 predicts that the protein may be unstable [48]. SAG1, GRA3, GRA5, and BSR4 peptides were more stable when compared to GRA2, SAG2A, MAG1, GRA1, GRA7, GRA6, and CCp5A peptides.

Regarding the hydropathicity index (GRAVY), the calculated values for the peptides were between -1.713 and -0.281. Negative values indicate better interaction with water, greater solubility, that is, more hydrophilic peptides, while positive GRAVY values indicate, in turn, greater hydrophobicity [49].

Using the Emini method, the solvent accessibility of epitopes was evaluated [40]. It was observed that when the amino acid residues had a score equal to or greater than the 1.0 threshold, the probability of this peptide being found on the protein surface increased (**Figure 3**). In this sense, peptides from SAG1, GRA2, GRA3, GRA6, MAG1, and BSR4 were found in more accessible regions within the protein structures. Whereas SAG2A, GRA1, GRA5, and CCp5A peptides were less exposed with only a few solvent-accessible residues making it difficult for them to interact with water molecules.

Using the VaxiJen 2.0 server, the antigenic potential of each predicted linear B-cell epitope was analyzed. The results showed that the epitopes had antigenicity values ranging from 0.3953 to 1.4757, being considered antigenic epitopes those that demonstrated values above the threshold of 0.5. All selected peptides were considered as probable antigens, except for the GRA6 peptide that showed the lowest score according to the server. **Table 3** demonstrates the antigenicity values for each epitope.

4. 3D Modeling of Proteins and Peptides

The three-dimensional structures of 10 *T. gondii* proteins were not yet available in PDB format. Therefore, the 3D structures for the proteins SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A were modeled using the homology modeling program, I-TASSER. The 3D structure for SAG1 was not modeled because it was available in PDB format.

As a measure of confidence, each predicted model has a C-score, which is calculated from multiplex LOMETS subprocess alienations and is generally in the value of -5 and 2, with higher values relating to a higher confidence model [42]. The 3D models generated by I-TASSER showed a C-score of -3.83 to -1.05. The graphical representation of the 3D models of

T. gondii proteins, obtained by the I-TASSER website are shown in **Figure 4**.

The total of 11 linear B-cell epitopes predicted, were modeled using the Pep fold server. From the amino acid sequence, the site predicts a consistent peptide structure on a large scale, providing a total of 5 models for each of the epitopes, the best of which were selected. The generated 3D models are shown in **Figure 5**.

5. Refinement and validation of the 3D structures

The best-ranked 3D models of proteins and peptides by the I-TASSER and Pep fold servers, respectively, were subjected to high-resolution structural refinement at the atomic level using the Modrefiner server. In terms of stereochemical quality, the predicted models were analyzed after structural refinement using the Ramachandran plot. Ramachandran plots are presented in **Figures 6** and **7**, showing the phi-psi torsion angles for all residues in the 3D structure of proteins and peptides respectively. The different regions in the graph are shown in different colors, with the darker areas in red representing the most favorable regions of phi-psi values and where it is expected to have at least 90% of the residues.

Analysis of the Ramachandran plot shows that more than 90% of the residues from each of the proteins are in the allowed zones of the diagram. However, some residues from proteins SAG2A, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, and CCp5A are in the forbidden zones of the graph, indicating that these amino acids are energetically forced into these zones (**Table 4**).

For all peptides, residues were arranged in both the most favorable and allowed regions of the diagram. These parameters suggest that the 3D structure of the peptides is adequate, stable, and of good stereochemical quality (**Table 5**).

6. PYMOL Alignment

To compare the predicted structures and visualize the arrangement of peptides in the proteins, a structural alignment was performed. Initially, the PYMOL server performs the sequence alignment and then the structure alignment, calculating the RMSD. The RMSD informs the average deviation between the corresponding atoms of two proteins, and the smaller the RMSD is, the more similar and optimized the structures will be [50]. The alignment of proteins GRA5 and GRA6 and their respective peptides resulted in RMSD values smaller than 3 Å, 1.236, and 1.502 Å respectively, indicating that these structures are highly homologous when compared with proteins SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA7, MAG1, BSR4,

and CCp5A that presented higher RMSD values, however, acceptable for being smaller than 10 Å. **Figure 8** shows the graphical representation of the structural alignment made in the PYMOL program. It can be seen that the peptides showed differences in structural conformation. The secondary structure analysis suggested that peptides from SAG1, SAG2A, GRA2, presented a more distended disposition forming random coils, while peptides GRA1, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A adopted folding conformations forming α -helix and in the case of CCp5A forming β -hairpin in their respective proteins.

Discussion

The sensitivity and specificity of immunodiagnostic assays for toxoplasmosis depend on the antigens used [37]. New alternative immunoassays have been proposed in the literature to replace the use of native *T. gondii* antigens, aiming to solve the limitations related to production cost and standardization of those antigenic preparations and making possible to obtain significant improvements in the detection of phase of infection by this parasite [11].

Advances in methodologies to identify epitopes by combining computational methods and mathematical algorithms using an extensive biological database have contributed to the development of bioinformatics. This novel tool makes it possible to analyze the structure of antibodies, B cells and T cells, evaluate intermolecular interactions, characterize and model immunogenic epitopes, design new vaccines and diagnostic methods [51]. Synthetic peptides predicted using bioinformatics tools offer distinct advantages such as shorter production time and cost, when compared to lysed *T. gondii* antigens, accurate knowledge of antigen composition with a high degree of purity, and ease of method standardization [16,52]. Using a set of bioinformatics web servers, it was assessed a group of 11 peptides from the antigenic components of *T. gondii*, as follow: SAG1, SAG2A, GRA1, GRA2, GRA3, GRA5, GRA6, GRA7, MAG1, BSR4, and CCp5A, which are expressed in the different infectious stages of the parasite, as sporozoites, tachyzoites, and bradyzoites, as previously characterized [7,18,22,23,27-29,35].

When the whole data were analyzed and compared, peptides predicted from SAG1, GRA3, and BSR4 proteins in particular showed superior physicochemical, accessibility, and antigenic properties. The theoretical isoelectric point for these peptides was 5.83, 3.71, and 8.41, respectively, indicating that the stability and solubility of these peptides hold between acidic and basic pH [46]. The calculated isoelectric point will be useful for determining the

solutions and buffer system needed to establish conditions for standardization and development of new designed immunoassays. In terms of aliphatic index and instability index values, the peptides were stable and moderately thermotolerant, with high hydrophilicity due to negative GRAVY values, which is one of the important characteristics of antigenic epitopes that allow understanding the protein folding, predicting the secondary structure, and interaction sites [7,53].

The peptides from the SAG1, GRA3, and BSR4 proteins presented significant antigenicity values of 1.1163, 1.2841 1.4757 respectively according to the Vaxijen 2.0 server [41]. In addition, the multiple sequence alignment demonstrated that the peptides selected from SAG1, GRA3, and BSR4 proteins showed a high degree of conservation and identity in different *T. gondii* strains, such as the epidemiologically important types I, II, and III strains [54]. Approximately 30% of the human population is infected by various widely distributed genotypes of *T. gondii*, with clonal lineages type I, II and III being the most important [6]. In addition to the classical clonal lineages, further genetic diversity of *Toxoplasma* associated with other divergent lineages called atypical strains has been described [54]. The classical clonal lineages represent a large majority of isolates in North America and Europe, with the type II lineage being the most predominant in these continents and the rest of the world. In South America, *T. gondii* strains show great genetic variability, with unique polymorphisms [54]. The identification of significantly antigenic epitopes that are also conserved among the different strains of *T. gondii* could aid the diagnosis of toxoplasmosis by increasing case detection independently of the infecting strain.

The prediction of the 3D models and the validation of the structure by Ramachandran plot analysis revealed that these peptides had more than 90% of their residues in energetically favorable regions of the diagram. This means that the quality of the modeling has been satisfactory from a stereochemical point of view compared to the initial model [45]. Thus, most of the amino acid residues for these peptides were found exposed on the surface of the proteins, adopting distinct structural conformations, which facilitates their interaction with molecules of the immune system. Secondary structures are of great importance for the epitopes, the α -helices and β -turns have high energy hydrogen bonds that maintain the structural conformation of the protein and therefore strengthen interactions with antibodies [55].

Numerous bioinformatics tools have been useful in the identification of immunogenic epitopes of various *T. gondii* antigens that may have better potential to ensure an accurate diagnosis [56]. SAG1 is known to be one of the most immunogenic *T. gondii* antigens and is

considered a promising molecule for the development of diagnostic methods and vaccines by eliciting a strong immunodominant response [57]. In this sense, the reactivity of SAG1-derived epitopes have been tested with different clinical forms of toxoplasmosis in some studies suggesting potential for detecting infected individuals [58]. GRA3 has been used in association with the most immunoreactive regions of other *T. gondii* proteins demonstrating a relevant performance in serodiagnosis [27].

BSR4 protein has demonstrated immunogenicity and protein-specific immunoreactivity in sera from patients in the chronic phase in ELISA assay, however, the diagnostic utility of peptides derived from this protein for the serodiagnosis of toxoplasmosis has not been described, so it would be interesting to further investigate its potential for detecting *T. gondii* infection [34].

The characterization and use of new immunodominant epitopes from these proteins would allow us to formulate strategies to improve the diagnosis of *T. gondii* infection. Studies suggest the use of chimeric antigens for ELISA, based on multiplex antigenic epitopes expressed at different stages of the parasite, which should be recognized by antibodies against individual antigens and increase the sensitivity and specificity of diagnostic tests for toxoplasmosis. [59]. Using an *in silico* approach, Beghetto et al. (2006) [27] designed a multi-epitope with sequences of 6 immunodominant *T. gondii* proteins, among which SAG1 and GRA3 were present. The study suggested significant diagnostic performance of the chimeric antigen in detecting acquired infection in adults and in infants born to mothers with a primary *T. gondii* infection. Holec-Gąsior et al (2012) [60] using peptides of MIC1, MAG1 and SAG1 bound in a chimera obtained significant results when compared to the multi-epitope with just MIC1 and MAG1 sequences, suggesting the immunogenicity of SAG1. The use of individual recombinant or chimeric formulations has shown potential to differentiate *T. gondii* infected individuals from uninfected individuals, as well as the stage of infection [11,12,61,62].

The use of chimerical antigens in the diagnosis of infections offers a high density of immunoreactive epitopes of various antigens that increase the chances of detection of antibodies in serum samples and, therefore, improve the performance of the immunoassay [63]. The *in silico* analysis performed here, therefore, suggests that the peptides from SAG1, GRA3, and BSR4 protein could be used individually or together in new immunodiagnostic assays and to validate their potential in detecting specific anti-*T. gondii* antibodies.

Conclusion

The current limitations of the antigens used in the immunodiagnosis of *T. gondii* infection suggest the necessity to develop new antigenic preparations, aiming to increase the accuracy of toxoplasmosis, particularly to characterize the phase of infection. Bioinformatic methods allow the identification of immunodominant regions of a particular antigen in less time and cost. Through *in silico* analysis, it was selected 3 out of 11 peptides from the parasite, SAG1, BSR4, and GRA3. These selected components were found to be stable, hydrophilic, protein surface accessible, and antigenic role, suggesting their potential use in future immunodiagnostic assays as a single or multiepitope epitopes to validate their performance.

Acknowledgments

We are indebted to Ana Claudia Arantes Marques Pajuaba for her technical assistance. This study was financially supported by Brazilian Research Agencies (CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior and FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest concerning the results from this study.

References

1. Macêdo, A. G. et al. "SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts". *Parasites and Vectors*. vol. 6, no. 1, pp. 163, 2013.
2. Tenter, A. M., Heckeroth, A. R. and Weiss, L. M. "Toxoplasma gondii: From animals to humans". *International Journal of Parasitology*. vol 30, no. 12-13, pp. 1217–1258, 2000.
3. Ben-Harari, R. R. and Connolly, M. P. "High burden and low awareness of toxoplasmosis in the United States". *Postgraduate Medicine*. vol. 131, no. 2, pp. 103–108, 2019.
4. Robert-Gangneux, F. and Dardé, M. L. "Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis". *Clinical Microbiology Reviews*. vol. 25, no. 2, pp. 264–296, 2012.
5. Da Silva, M., Teixeira, C., Gomes, P. and Borges, M. "Promising Drug Targets and Compounds with Anti-Toxoplasma gondii Activity". *Microorganisms*. vol. 9, no. 9, pp. 1960, 2021.
6. Dubey, J. P. "Outbreaks of clinical toxoplasmosis in humans: five decades of personal experience, perspectives and lessons learned". *Parasites & Vectors*. vol. 14, no. 1, pp. 263 2021.
7. Wang, Y. H., Wang, G. X. and Cai, J. P. "Identifying Novel B Cell Epitopes within *Toxoplasma gondii* GRA6". *Korean Journal of Parasitology*. vol. 54. no. 4, pp. 431–437, 2016.
8. Dubey, J. "Toxoplasmosis-an overview". *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. vol. 22, pp. 88–92, 1991.
9. Luft, B. J. and Remington, J. S. "Toxoplasmic Encephalitis in AIDS". *Clinical Infectious Diseases*. vol. 15, no. 2, pp. 211–222, 1992.
10. Ambroise-Thomas, P. "Parasitic diseases and immunodeficiencies". *Parasitology*. vol. 122, no. S1, pp. 65-71, 2001.
11. Tomasz Ferra, B. et al. "The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-Toxoplasma gondii antibodies in mouse and human sera". *PLoS One*. vol. 14, no. 6, pp. 1–23, 2019.
12. Ybañez, R. H. D., Ybañez, A. P. and Nishikawa, Y. "Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. vol. 10, no. 204, pp. 204, 2020.
13. Sudan, V., Jaiswal, A. K. & Shanker, D. "Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis". *Clinical Reviews and Opinions*. vol. 5, no. 2, pp. 11–17, 2013.

14. Murat, J. B., Hidalgo, H. F., Brenier-Pinchart, M. P. and Pelloux, H. "Human toxoplasmosis: which biological diagnostic tests are best suited to which clinical situations?". *Expert review of anti-infective therapy*. vol. 11, no. 9, pp. 943–956, 2013.
15. Roiko, M. S., LaFavers, K., Leland, D. and Arrizabalaga, G. "Toxoplasma gondii-positive human sera recognize intracellular tachyzoites and bradyzoites with diverse patterns of immunoreactivity". *International Journal of Parasitology*. vol. 48, no. 3-4, pp. 225, 2018.
16. Santana, S. S. et al. "A peptide originated from *Toxoplasma gondii* microneme 8 displaying serological evidence to differentiate recent from chronic human infection". *Parasitology International*. vol. 84, pp. 102394, 2021.
17. Sun, X. et al. "A comparative study of *Toxoplasma gondii* seroprevalence in three healthy Chinese populations detected using native and recombinant antigens". *Parasites and Vectors*. vol. 6, no. 1, pp. 1–7, 2013.
18. Santana, S. S. et al. "CCp5A protein from *Toxoplasma gondii* as a serological marker of oocyst-driven infections in humans and domestic animals". *Frontiers in Microbiology*. vol. 6, no. 1305, pp. 1–12, 2015.
19. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Sharma, G. and Lee, S. S. "Immunoinformatics Approach for the Identification and Characterization of T Cell and B Cell Epitopes towards the Peptide-Based Vaccine against SARS-CoV-2". *Archives of Medical Research*, vol. 52, no. 4, pp. 362, 2021.
20. Arranz-Solis, D. et al. "Serotyping of *Toxoplasma gondii* Infection Using Peptide Membrane Arrays". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. vol. 9, no. 408, pp. 408, 2019.
21. Kong, J. T., Grigg, M. E., Uyetake, L., Parmley, S. and Boothroyd, J. C. "Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides". *Journal of Infectious Diseases*, vol. 187, no. 9, pp. 1484–1495, 2003.
22. Lekutis, C., Ferguson, D. J. P., Grigg, M. E., Camps, M. and Boothroyd, J. C. "Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: Variations on a theme". *International Journal for Parasitology*. vol. 31, no. 12, pp. 1285–1292, 2001.
23. Tomavo, S., Schwarz, R. T. and Dubremetz, J. F. "Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens". *Molecular and Cellular Biology*. vol. 9, no. 10, pp. 4576, 1989.
24. Jalallou, N. et al. "Recombinant SAG1 Antigen to Detect *Toxoplasma gondii* Specific Immunoglobulin G in Human Sera by ELISA Test". *Iranian Journal of Parasitology*. vol. 5, no. 2, pp. 1, 2010.
25. Bel-Ochi, N. C., Bouratbine, A. and Mousli, M. "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant SAG1 Antigen To Detect *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G Antibodies in Human Sera and Saliva". *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. vol. 20, no. 4, pp. 468, 2013.

26. Béla, S. R. et al. "Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. vol. 62, no. 3, pp. 245–254, 2008.
27. Beghetto, E., Spadoni, A., Bruno, L., Buffolano, W. and Gargano, N. "Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: Toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products". *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 44, no. 6, pp. 2133–2140, 2006.
28. Costa, J. G. and Vilariño, M. J. "Semiquantitative Dot Blot with the GRA8 antigen to differentiate the stages of toxoplasmosis infection". *Journal of Microbiological Methods*. vol. 149, pp. 9–13, 2018.
29. Kotresha, D. et al. "Recombinant proteins from new constructs of SAG1 and GRA7 sequences and their usefulness to detect acute toxoplasmosis". *Tropical Biomedicine*. vol. 29, no. 1, pp. 129–137, 2012.
30. Pietkiewicz, H. et al. "Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis". *Journal of Clinical Microbiology*. vol. 42, no. 4, pp. 1779, 2004.
31. Holec-Źsior, L., Kur, J. and Hiszczyńska-Sawicka, E. "GRA2 and ROP1 Recombinant Antigens as Potential Markers for Detection of *Toxoplasma gondii*-Specific Immunoglobulin G in Humans with Acute Toxoplasmosis". *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. vol. 16, no. 4, pp. 510, 2009.
32. Holec-Gasior, L. and Kur, J. "*Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay". *Experimental Parasitology*. vol. 124, no. 3, pp. 272–278, 2010.
33. Elyasi, H. et al. "Use of Dense Granule Antigen GRA6 in an Immunoglobulin G Avidity Test To Exclude Acute *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy". *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. vol. 17, no. 9, pp. 1349, 2010.
34. Xing-zhi, C. et al. "Recombinant expression and immunologic identification of bradyzoite-specific antigen BSR4 of *Toxoplasma gondii*". *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Disease*. vol. 30, no. 3, pp. 170–173, 2012.
35. Di Cristina, M. et al. "The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection". *Microbes Infection*. vol. 6, no. 2, pp. 164–171, 2004.
36. Holec, L., Hiszczyńska-Sawicka, E., Źsior, A., Brillowska-Dąbrowska, A. and Kur, J. "Use of MAG1 Recombinant Antigen for Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Humans". *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. vol. 14, no. 3, pp. 220, 2007.
37. Ybañez, R. H. and Nishikawa, Y. "Comparative Performance of Recombinant GRA6, GRA7, and GRA14 for the Serodetection of *T. gondii* Infection and Analysis of IgG

- Subclasses in Human Sera from the Philippines". *Pathogens*. vol. 11, no. 2, pp. 277, 2022.
38. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M. and Marcatili, P. "BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes". *Nucleic Acids Research*. vol. 45, no. W1, pp. W24, 2017.
 39. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. and Barton, G. J. "Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench". *Bioinformatics*. vol. 25, no. 9, pp. 1189, 2009.
 40. Emini, E. A., Hughes, J. V., Perlow, D. S. and Boger2, J. "Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide". *Journal of Virology*. vol. 55, no. 3, pp. 836 (1985).
 41. Doytchinova, I. A. and Flower, D. R. "VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines". *BMC Bioinformatics*. vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2007.
 42. Yang, J. and Zhang, Y. "I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions". *Nucleic Acids Research*. vol. 43, no. W1, pp. W174 2015.
 43. Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P. and Tufféry, P. "Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Miniprotein Structure Prediction". *Journal of Chemical Theory and Computation*. vol. 10, no. 10, pp. 4745–4758 2014.
 44. Xu, D. and Zhang, Y. "Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization". *Biophysical Journal*. vol. 101, no. 10, pp. 2525, 2011.
 45. Morris, A. L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. and Thornton, J. M. "Stereochemical quality of protein structure coordinates". *Proteins*. vol. 12, no. 4, pp. 345–364 1992.
 46. Gasteiger, E. et al. "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server". *The Proteomics Protocols Handbook*. pp. 571–607, 2005. doi:10.1385/1-59259-890-0:571.
 47. Ikai, A. "Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins". *The Journal of Biochemistry*. vol. 88, no. 6, pp. 1895–1898, 1980.
 48. Guruprasad, K., Reddy, B. V. B. and Pandit, M. W. "Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence". *Protein Engineering*. vol. 4, no. 2, pp. 155–161, 1990.
 49. Kyte, J. and Doolittle, R. F. "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". *Journal of Molecular Biology*, vol. 157, no. 1, pp. 105–132, 1982.
 50. Reva, B. A., Finkelstein, A. V. and Skolnick, J. "What is the probability of a chance

- prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?". *Folding and Design*. vol. 3, no. 2, pp. 141–147, 1998.
51. Potocnakova, L., Bhide, M. and Pulzova, L. B. "An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction". *Journal of Immunology Research*. vol. 2016, pp. 1-11, 2016.
 52. Sanchez-Trincado, J. L., Gomez-Perosanz, M. and Reche, P. A. "Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction". *Journal of Immunology Research*. vol. 2017, no. 2680160, pp. 1-14, 2017.
 53. Bai, Y. et al. "Toxoplasma gondii: Bioinformatics analysis, cloning and expression of a novel protein TgIMP1". *Experimental Parasitology*. vol. 132, no. 4, pp. 458–464, 2012.
 54. Dardé, M. L. "Toxoplasma gondii, “new” genotypes and virulence. *Parasite*. vol. 15, no. 3, pp. 366–371, 2008.
 55. Shaddel, M., Ebrahimi, M. and Tabandeh, M. R. "Bioinformatics analysis of single and multi-hybrid epitopes of GRA-1, GRA-4, GRA-6 and GRA-7 proteins to improve DNA vaccine design against Toxoplasma gondii". *Journal of Parasitic Diseases*. vol. 42, no. 2, pp. 269–276, 2018.
 56. Javadi Mamaghani, A. et al. "Designing Diagnostic Kit for Toxoplasma gondii Based on GRA7, SAG1, and ROP1 Antigens: An In Silico Strategy". *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, vol. 26, no. 4, pp. 2269–2283, 2020.
 57. Burg, J. L., Perelman, D., Kasper, L. H., Ware, P. L. and Boothroyd, J. C. "Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of Toxoplasma gondii". *Journal of Immunology*. vol. 141, no. 10, pp. 3584-3591, 1988.
 58. Cardona, N., de-la-Torre, A., Siachoque, H., Patarroyo, M. A. and Gomez-Marin, J. E. "Toxoplasma gondii: P30 peptides recognition pattern in human toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. vol. 123, no. 2, pp. 199–202, 2009.
 59. Holec-gąsior, L., Ferra, B. and Graźlewska, W. "Toxoplasma gondii Tetravalent Chimeric Proteins as Novel Antigens for Detection of Specific Immunoglobulin G in Sera of Small Ruminants". *Animals an Open Access Journal from MDPI*. vol. 9, no. 12, pp. 1146, 2019.
 60. Holec-Gąsior, L., Ferra, B. and Drapała, D. "MIC1-MAG1-SAG1 Chimeric Protein, a Most Effective Antigen for Detection of Human Toxoplasmosis". *Clinical and Vaccine Immunology: CVI*. vol. 19, no. 12, pp. 1977, 2012.
 61. Dai, J. fang et al. "Toxoplasma gondii: Enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera". *Experimental Parasitology*. vol. 133, no. 1, pp. 95–100, 2013.
 62. Holec-Gasior, L. "Toxoplasma gondii recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies". *Clinical and Vaccine Immunology*. vol. 20, no. 9, pp. 1343–1351, 2013.

63. De Souza, M. Q. et al. "A recombinant multiepitope protein for hepatitis B diagnosis". *BioMed research international*. vol. 2013, pp. 1-7, 2013.

Figures and tables

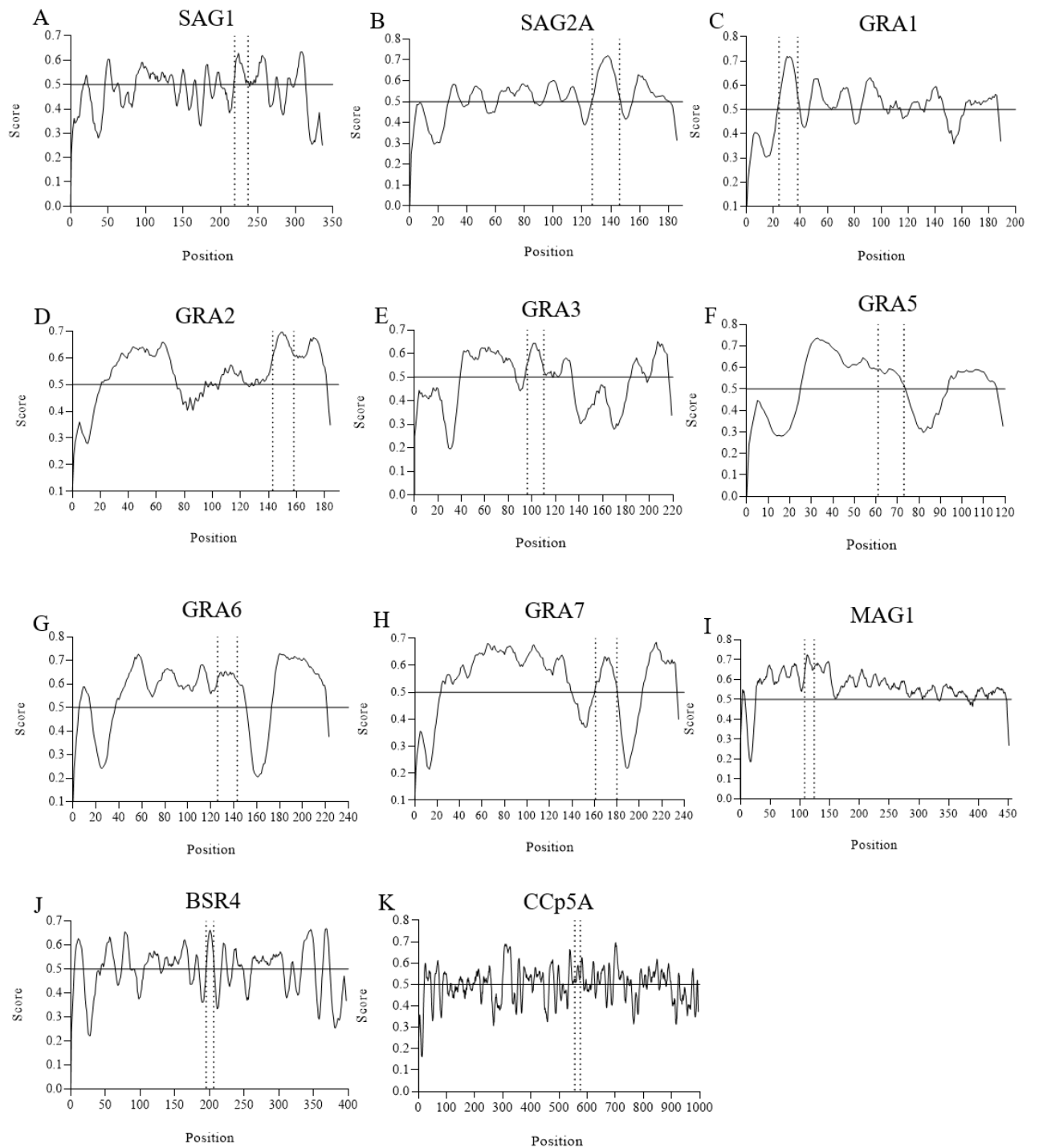
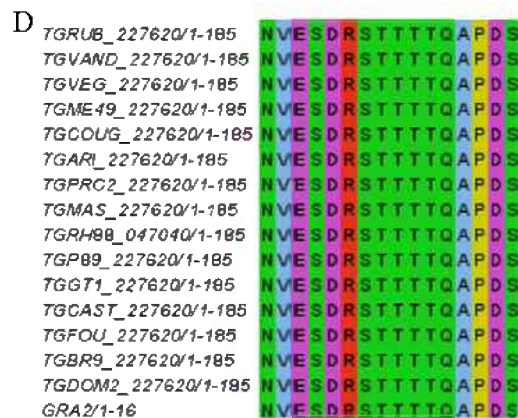
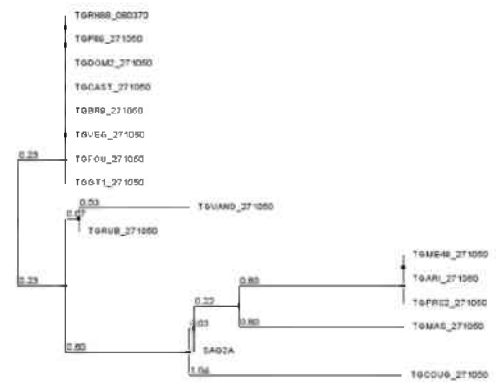
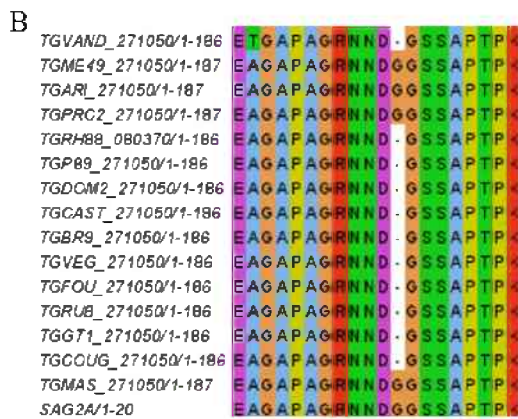
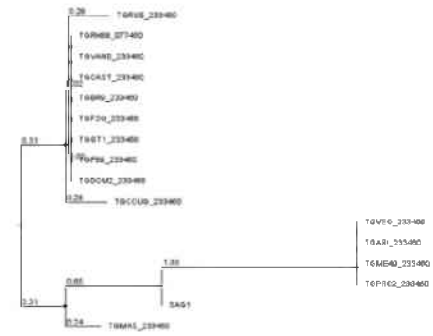
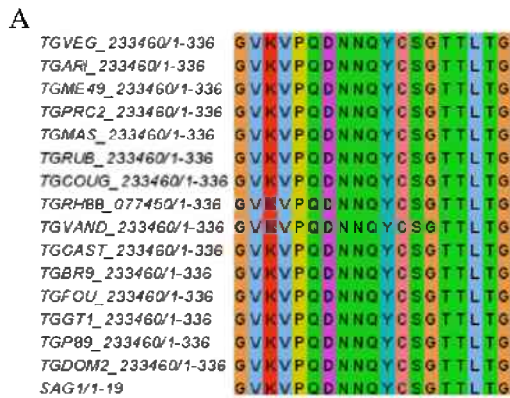


FIGURE 1. Linear epitope prediction from *T. gondii* immunodominant proteins using Bepipred version 2.0 prediction method available on the IEDB website (<https://www.iedb.org/>). The figure demonstrates the peptides delimited by the dashed lines that showed the best scores (≥ 0.5) on the following *T. gondii* proteins: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A.



E

TGVAND_227280/1-222	DAESD	VD	NQ	AE	GG	E							
TGRUB_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGVEG_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGMAS_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGGT1_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGRH8_046790/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGCAST_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGDOM2_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGRP9_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGFOL_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGNE49_227280/1-220	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGPRC2_227280/1-220	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGP89_227280/1-222	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGCCUG_227280/1-220	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
TGAR1_227280/1-220	DAESD	K	VD	NQ	AE	GG	E						
GRAY1-15	DAE	E	D	K	V	D	N	Q	A	E	G	G	E

F

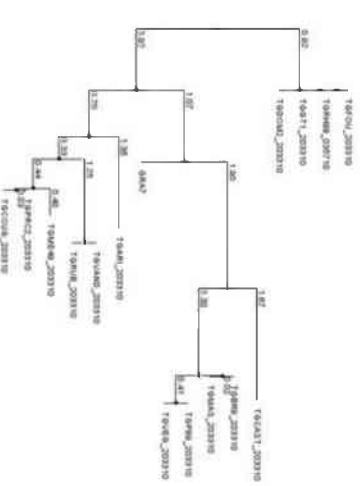
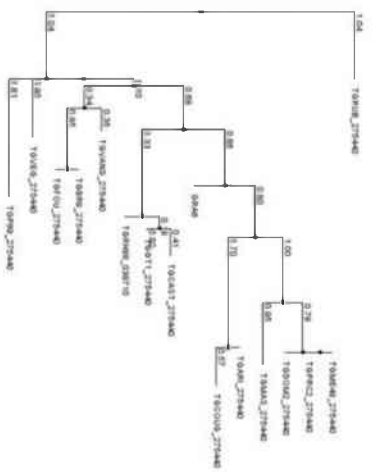
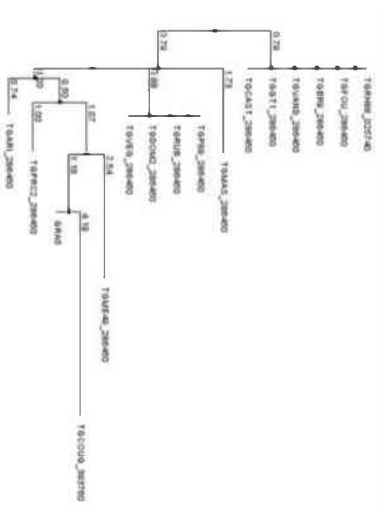
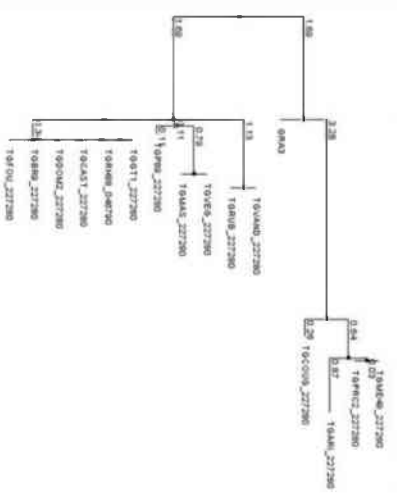
TGMAS_286450/1-119	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGP89_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGRUB_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGDMW2_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGVEG_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGRH8_025740/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGFOL_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGBR9_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGVAND_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGGT1_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGCAST_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGNE49_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGAR1_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGPRC2_286450/1-120	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
TGCCUG_393760/1-119	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V
GRAY1-13	F	E	R	G	R	A	A	V	T	G	H	P	V

G

TGME49_275440/1-224	I	G	T	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V	F	
TGPRC2_275440/1-224	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGDOM2_275440/1-224	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGVEG_275440/1-230	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGAR1_275440/1-226	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGRUB_275440/1-230	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGCAST_275440/1-223	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGVAND_275440/1-230	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGMAS_275440/1-229	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGP89_275440/1-225	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGGT1_275440/1-223	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGRH8_038710/1-201	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGCCUG_275440/1-231	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGBR9_275440/1-230	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
TGFOL_275440/1-230	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V
GRAY1-18	I	G	T	R	R	R	R	S	S	V	O	E	P	D	A	V

H

TGCAST_203310/1-236	M	P	E	L	T	E	O	O	A	G	D	E	P	L	T	T	G	O	N
TGBR9_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	G	D	E	P	L	S	T	G	O	N
TGMAS_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	G	D	E	P	L	S	T	G	O	N
TGP89_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	G	D	E	P	L	S	T	G	O	N
TGVEG_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	G	D	E	P	L	S	T	G	O	N
TGFOL_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	G	D	E	P	L	S	T	G	O	N
TGRH8_035710/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	R	G	D	E	P	L	T	T	G	O	N
TGGT1_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	R	G	D	E	P	L	T	T	G	O	N
TGDOM2_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	R	G	D	E	P	L	T	T	G	O	N
TGAR1_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	R	G	D	E	P	L	T	T	G	O	N
TGVAND_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	A	G	E	E	P	L	T	T	G	O	N
TGRUB_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	A	G	E	E	P	L	T	T	G	O	N
TGME49_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	I	E	E	P	L	T	T	G	O	N
TGPRC2_203310/1-235	L	P	E	L	T	E	O	O	T	I	E	E	P	L	T	T	G	O	N
TGCCUG_203310/1-236	L	P	E	L	T	E	O	O	T	I	E	E	P	L	T	T	G	O	N



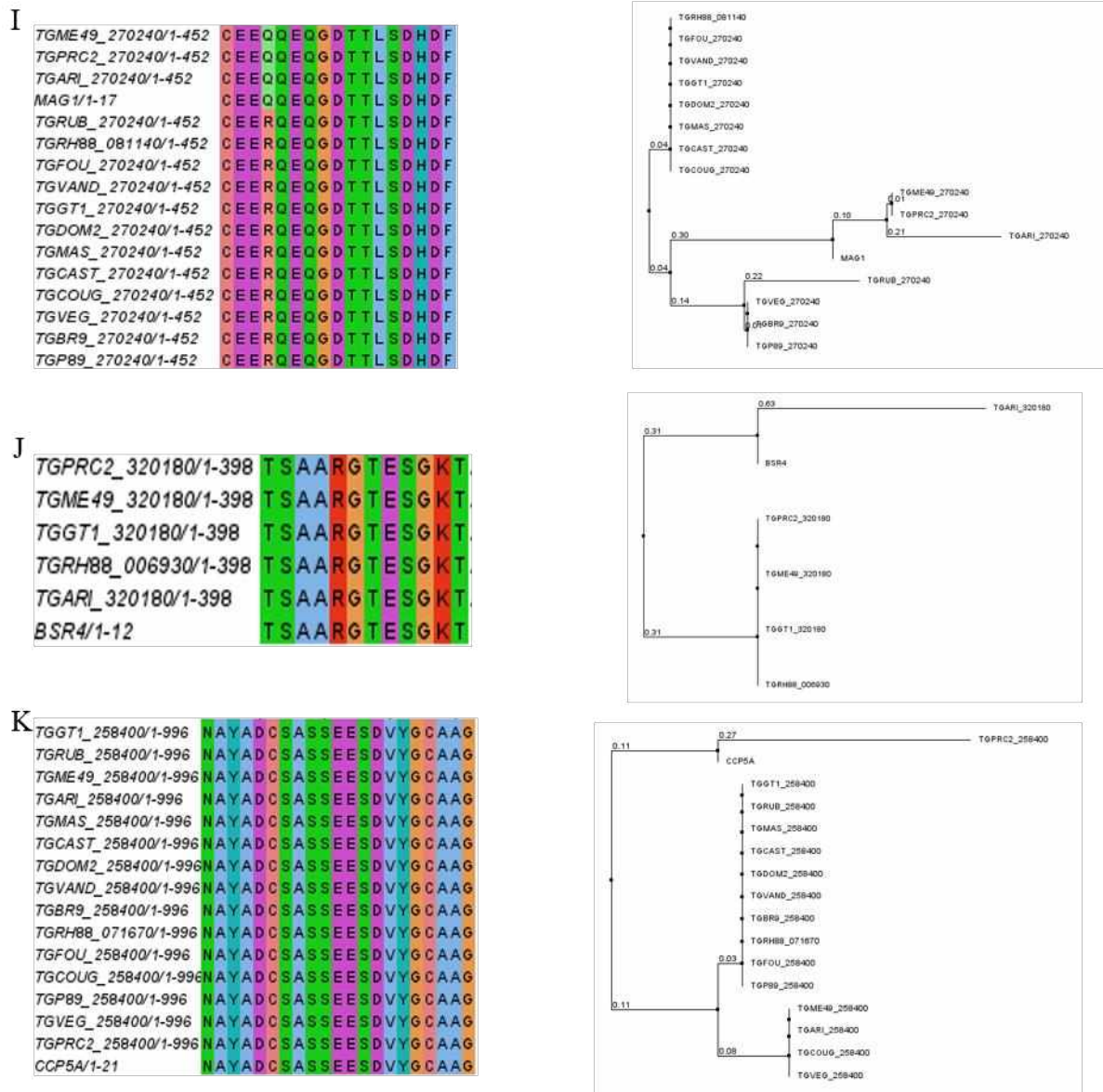


FIGURE 2. Phylogenetic analysis of predicted epitopes from *T. gondii* immunodominant proteins. The figure shows the multiple sequence alignment for each predicted epitope and the respective phylogenetic trees designed in Jalview software. The alignment of protein sequences in up to 15 strains of toxoplasma gondii is shown, with the exception of BSR4 where the alignment was performed only in 5 strains for which information on this protein was available on the Toxobd website. The different colors in the alignment refer to the polarity of the amino acids in the sequences of the peptides of: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A.

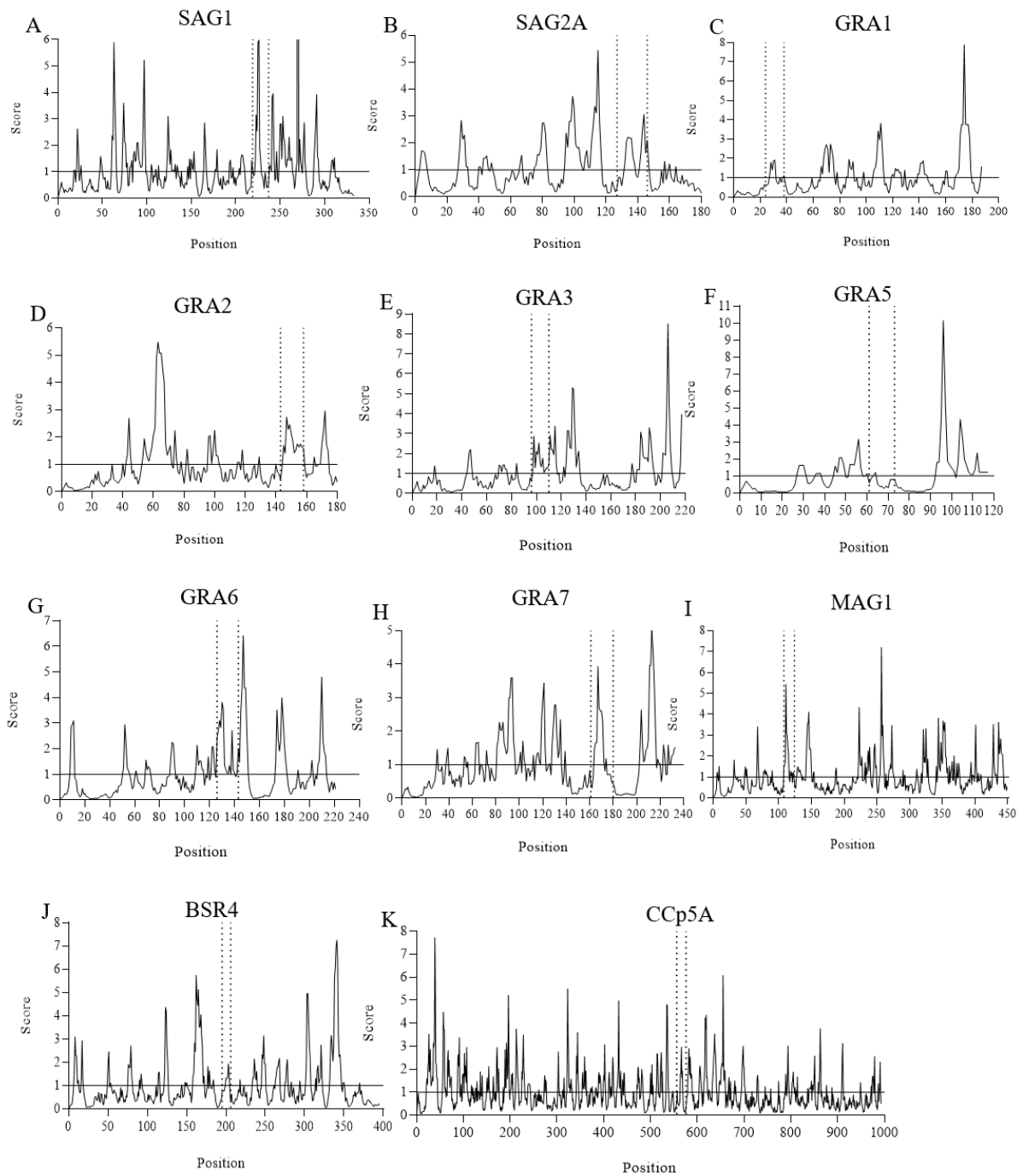


FIGURE 3. Solvent accessibility of the predicted epitopes determined by Emini's method. The image shows the amino acid residues delimited by the dashed lines that had a score equal or greater than 1.0, indicating the probability of this peptide being found on the surface of the respective *T. gondii* proteins: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A.

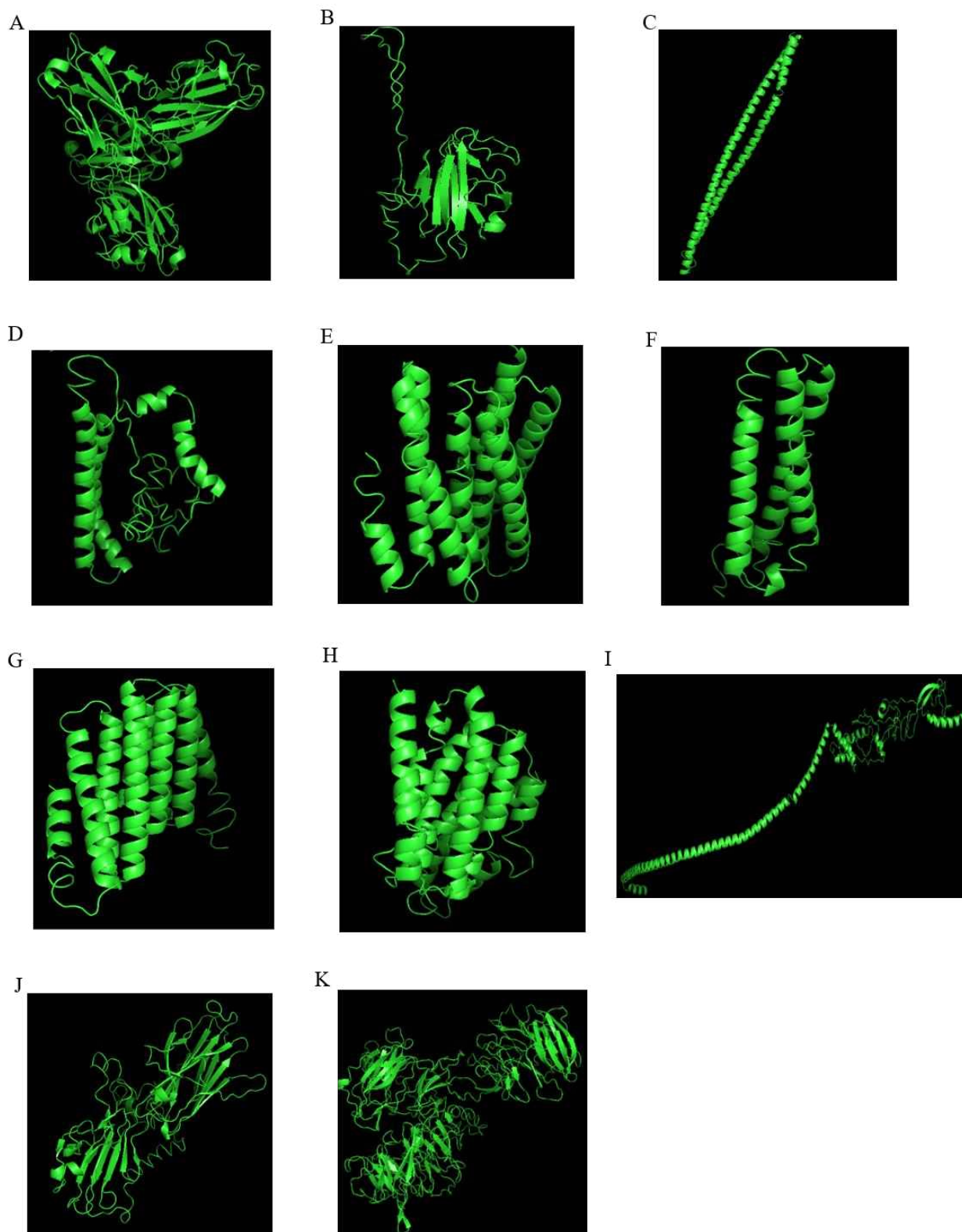


FIGURE 4. *Toxoplasma gondii* 3D proteins modeling by I-TASSER server (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>). The figure shows the 3D structures (green) that presented the best C-score for each *T. gondii* protein, with the exception of the SAG1 protein whose 3D structure was taken from PDB for this work. The 3D models are shown in the following order (A) SAG1, (B) SAG2A/ C-score -1.45, (C) GRA1/ C-score -2.33, (D) GRA2/ C-score -3.83, (E) GRA3/ C-score -2.51, (F) GRA5/ C-score -3.77, (G) GRA6/ C-score -2.61, (H) GRA7/ C-score -3.43, (I) MAG1/ C-score -2.56, (J) BSR4/ C-score -1.05, (K) CCp5A/ C-score -2.08.

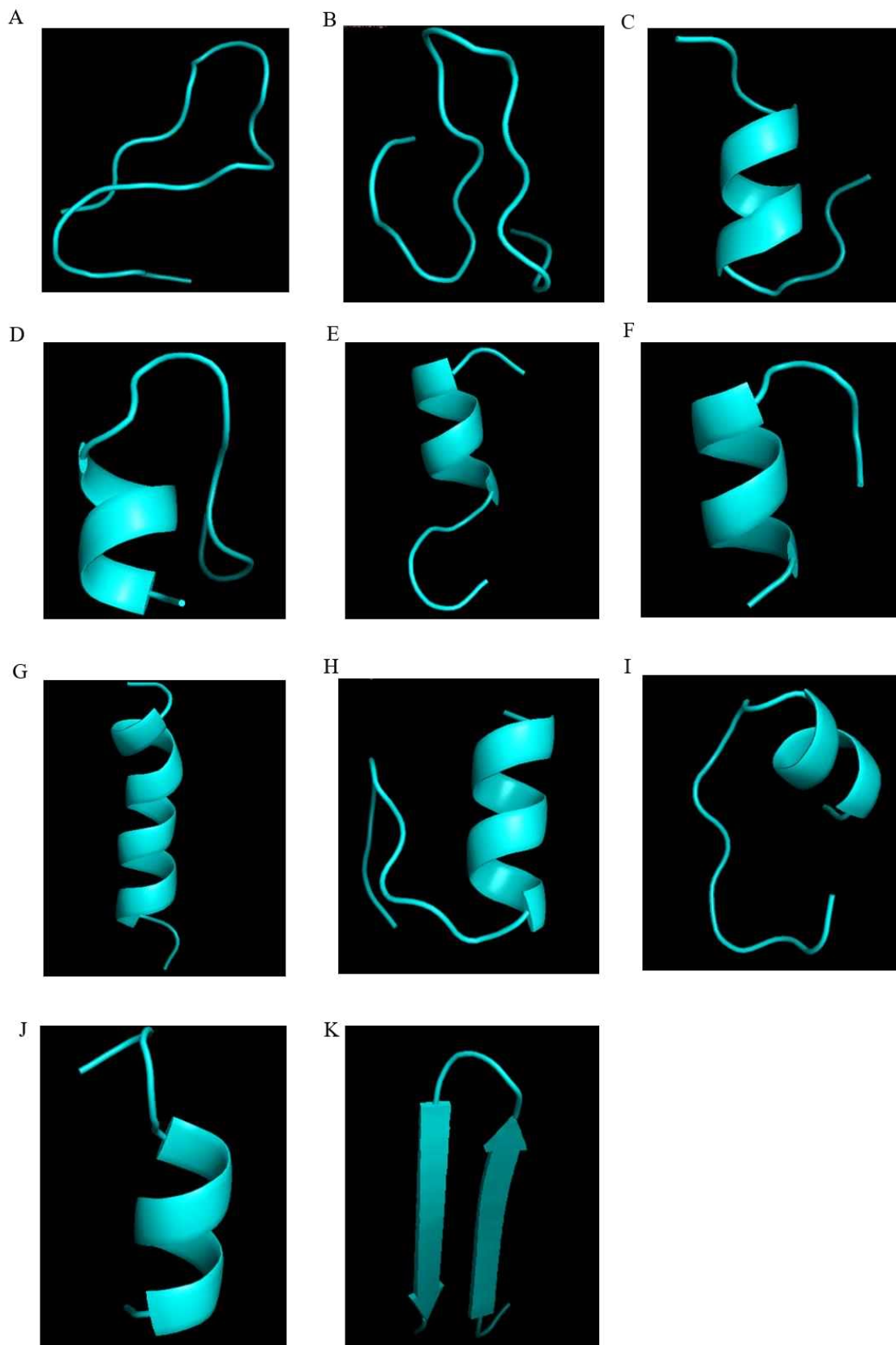


FIGURE 5. 3D peptides modelling by Pep fold (<https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD/>). The peptides from different proteins of *T. gondii* are shown in blue: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A.

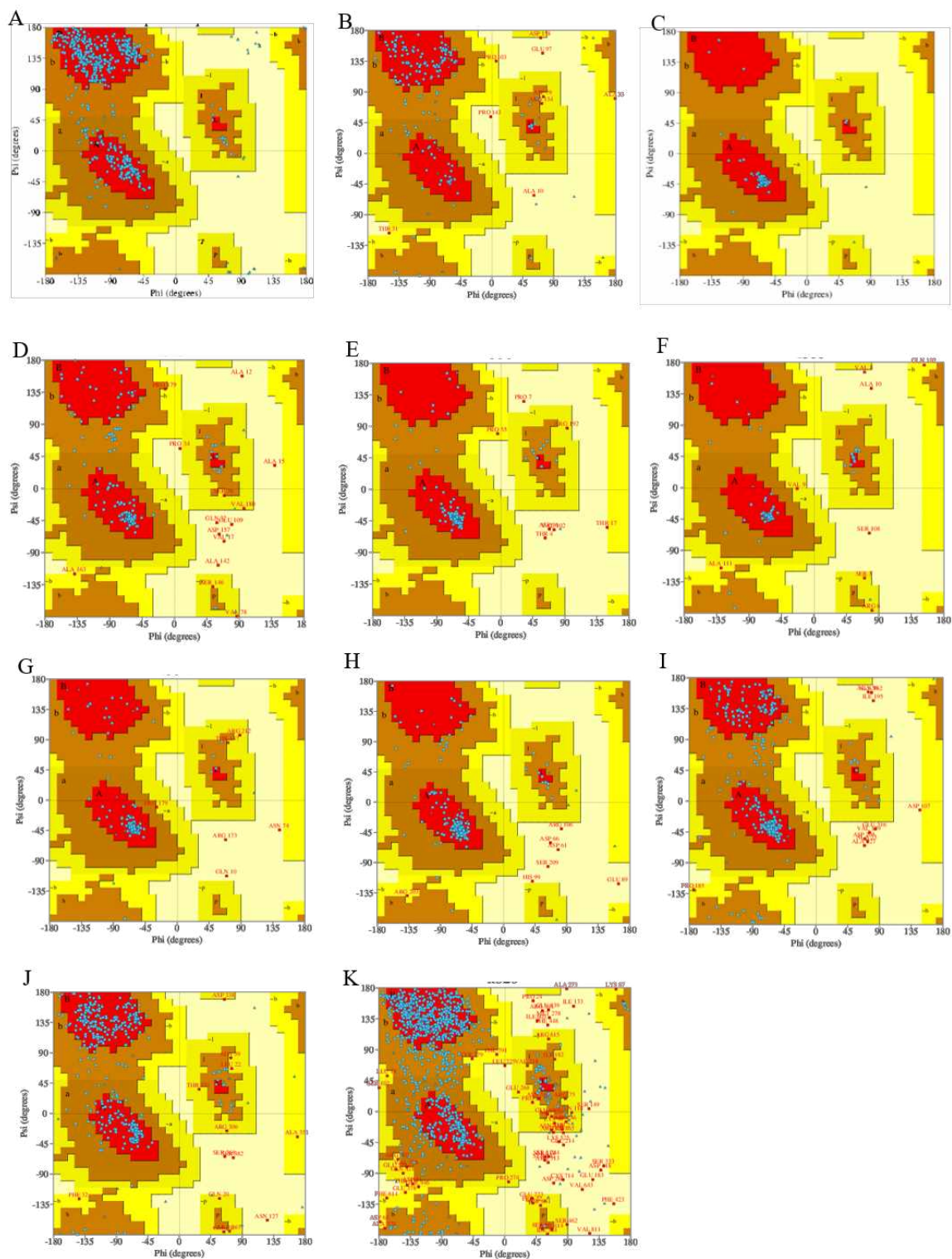


FIGURE 6. Ramachandran plot analysis obtained in the PROCHECK program (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>) to validated stereochemical stability of the modelled proteins 3D structure. O plot shows that in favored region, allowed region, generously allowed region and outlier region residues were present for each *T. gondii* proteins: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A.

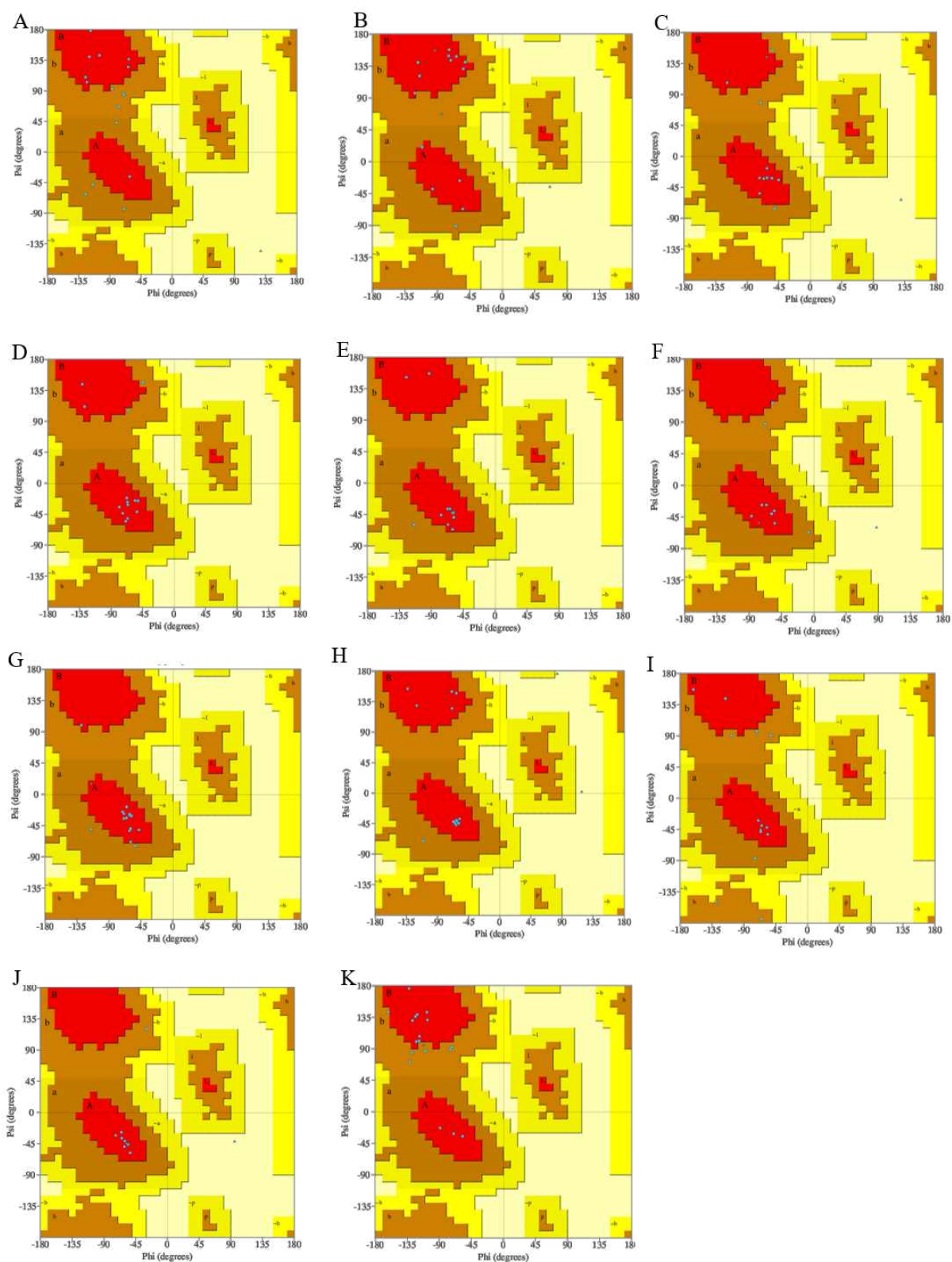


FIGURE 7. Ramachandran plot analysis of modelled peptide obtained in the PROCHECK program (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl?pdbcode=index.html>) . O plot shows that in favored and allowed regions the most of residues were present for each peptide from: (A) SAG1, (B) SAG2A, (C)

GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K)
CCp5A.

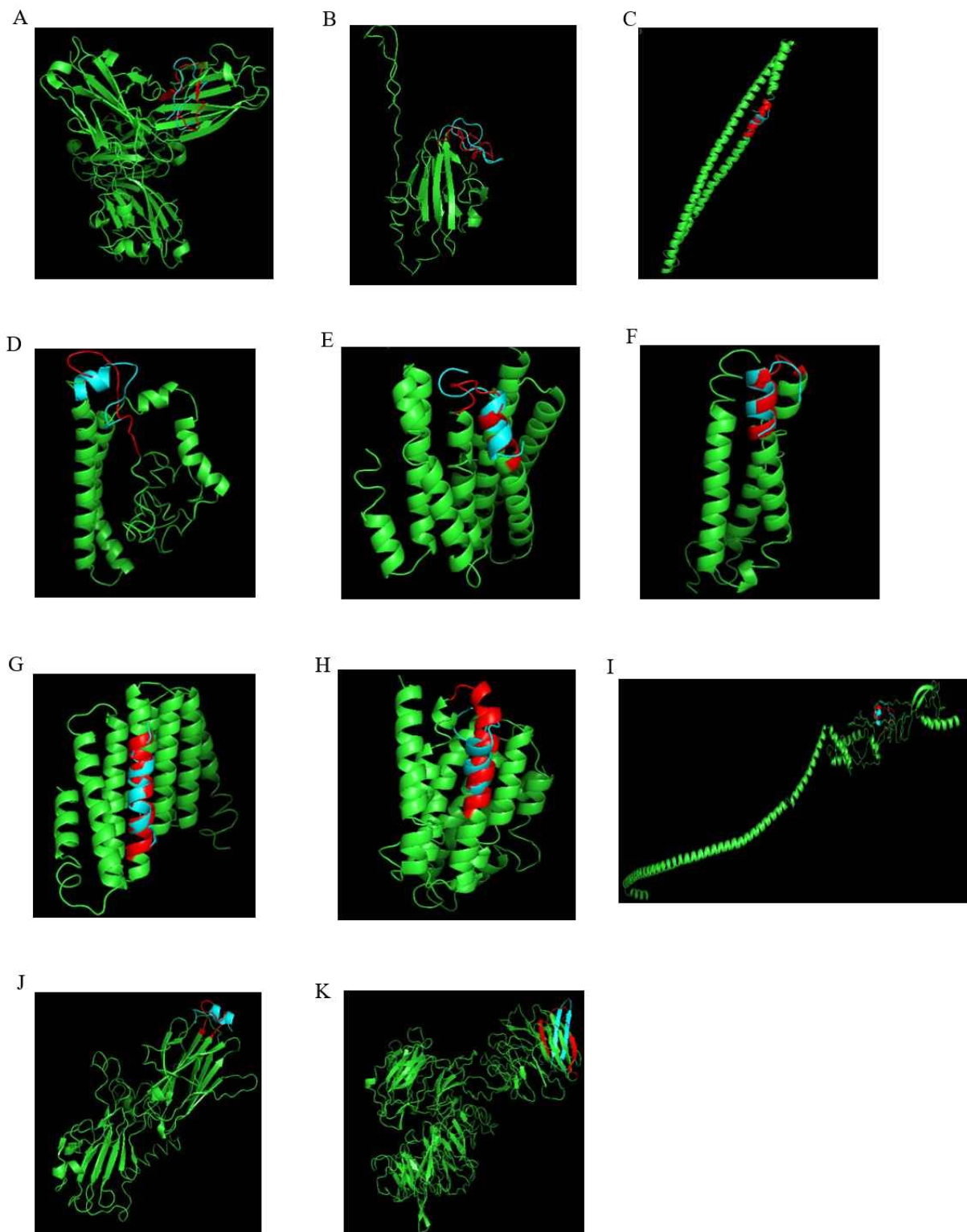


FIGURE 8. Structural representation of the alignment of the 3D structures of proteins and peptides obtained through PYMOL. The colors were used to indicate the 3D structure of the *T. gondii* proteins (green), the peptide region (red) and the 3D structures of the aligned peptides (blue) by PYMOL with (A) SAG1, (B) SAG2A, (C) GRA1, (D) GRA2, (E) GRA3, (F) GRA5, (G) GRA6, (H) GRA7, (I) MAG1, (J) BSR4, (K) CCp5A proteins.

TABLE 1. Peptides predicted from immunodominant *Toxoplasma gondii* proteins using Bepipred version 2.0 prediction method.

Protein	Peptide identification	Peptide sequences	Length	Position
SAG1	Pep1	GVKVPQDNNQYCSGTTLTG	19	219 - 237
SAG2A	Pep2	EAGAPAGRNDGGSSAPTPK	20	127 - 146
GRA1	Pep3	AAEGGDNQSSAVSDR	15	24 - 38
GRA2	Pep4	NVESDRSTTTTQAPDS	16	143 - 158
GRA3	Pep5	DAESDKVDNQAEGGE	15	96 - 110
GRA5	Pep6	FERGRAAVTGHPV	13	61 - 73
GRA6	Pep7	QGTRRRYSSVQEPQAKVP	18	126 - 143
GRA7	Pep8	VPELTEEQQRGDEPLTTGQN	20	161 - 180
MAG1	Pep9	CEEQQEQGDTTSLSDHDF	17	108 - 124
BSR4	Pep10	TSAARGTESGKT	12	195 - 206
CCp5A	Pep11	NAYADCSASSEESDVYGCAAG	21	556 - 576

TABLE 2. Physicochemical properties of the selected peptides, calculated using ExPASy's ProtParam tool.

Peptide	Molecular weight (kDa)	Theoretic pI	Aliphatic Index	Instability index	GRAVY
SAG1	1982.15	5.83	51.05	17.03	-0.721
SAG2A	1853.92	6.17	20.00	56.12	-1.195
GRA1	1463.44	4.03	39.33	49.64	-1.040
GRA2	1708.71	4.03	24.38	58.81	-1.425
GRA3	1563.51	3.71	32.67	-0.99 9	-1.713
GRA5	1396.57	9.61	60.00	2.24	-0.308
GRA6	2087.33	10.90	37.78	112.97	-1.578
GRA7	2241.35	3.91	53.50	74.159	-1.515
MAG1	1981.98	3.71	22.94	60.63	-1.659
BSR4	1165.23	8.41	16.67	20.04	-1.067
CCp5A	2070.10	3.43	37.62	52.16	-0.281

Abbreviations: pI=isoelectric point, GRAVY=Grand Average of Hydropathy.

TABLE 3. Predicted linear B-cell epitopes and their antigenicity value obtained from the VaxiJen 2.0 server

Peptide	VaxiJen 2.0 Antigenicity value
SAG1	1.1163
SAG2A	1.2736
GRA1	1.2842
GRA2	1.0249
GRA3	1.2841
GRA5	0.7496
GRA6	0.3953
GRA7	0.5835
MAG1	1.2375
BSR4	1.4757
CCp5A	1.3231

Antigenicity value: => 0.5 probable ANTIGEN, <0.5 probable NOT ANTIGEN.

TABLE 4. Ramachandran plot analysis of protein modelled structures.

Proteins	Regions			
	Most favored	Additional allowed	Generously allowed	Disallowed
SAG1	87.6%	12.4%	0.0%	0.0%
SAG2A	76.5%	18.8%	2.7%	2.7%
GRA1	98.8%	1.2%	0.0%	0.0%
GRA2	76.1%	16.1%	3.2%	4.5%
GRA3	90.0%	7.4%	0.5%	2.1%
GRA5	79.0%	13.3%	4.8%	2.9%
GRA6	91.5%	5.7%	1.1%	1.7%
GRA7	84.9%	11.7%	0.5%	2.9%
MAG1	84.2%	13.6%	0.0%	2.3%
BSR4	79.6%	16.7%	2.5%	1.1%
CCp5A	64.2%	28.7%	4.1%	2.9%

TABLE 5. Ramachandran plot analysis of peptide modelled structures.

Peptide	Regions			
	Most favored	Additional allowed	Generously allowed	Disallowed
SAG1	46.7%	53.3%	0.0%	0.0%
SAG2A	81.8%	18.2%	0.0%	0.0%
GRA1	72.7%	27.3%	0.0%	0.0%
GRA2	84.6%	15.4%	0.0%	0.0%
GRA3	90.9%	9.1%	0.0%	0.0%
GRA5	75.0%	25.0%	0.0%	0.0%
GRA6	85.7%	14.3%	0.0%	0.0%
GRA7	92.9%	7.1%	0.0%	0.0%
MAG1	57.1%	42.9%	0.0%	0.0%
BSR4	87.5%	12.5%	0.0%	0.0%
CCp5A	66.7%	33.3%	0.0%	0.0%