

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Karina Karla de Oliveira Nogueira**

Modelagem molecular *in silico* da proteína de choque térmico de 70 kDa de  
*Toxoplasma gondii*

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOLOGIA**  
**GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Karina Karla de Oliveira Nogueira**

Modelagem molecular *in silico* da proteína de choque térmico de 70 kDa de *Toxoplasma gondii*

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Biologia (INBIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Neide Maria da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

**Modelagem molecular *in silico* da proteína de choque térmico de 70 kDa de *Toxoplasma gondii***

Uberlândia, 24 de novembro de 2023

Banca Examinadora:

---

Profª. Dra. Neide Maria da Silva

---

Profª. Dra. Elisângela Rosa da Silva, Instituto de Ciências Biomédicas

---

Prof. Dr. Newton de Medeiros Vidal, Instituto de Ciências Biomédicas

**UBERLÂNDIA - MG**

**2023**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, Profa. Dra. Neide Maria da Silva e Prof. Dr. Jair Pereira da Cunha Júnior, que me receberam nesta pesquisa e me ensinaram tanto sobre o assunto, vocês foram essenciais para esse momento. Ao laboratório de Imunopatologia por terem me recebido e apoiado sempre que necessário, e a Ms. Anna Laura de Jesus Gomes pelas dicas e apoio na escrita, você será uma doutora e orientadora incrível!

Deixo o meu mais sincero agradecimento à minha família, primeiramente aos meus pais, Caren Carla de Oliveira e Weligton Nogueira Costa por me apoiarem a entrar em uma universidade pública e sempre fazerem de tudo para me dar o melhor conforto mesmo em meio ao caos, além de me incentivarem a ir atrás dos meus sonhos, sem vocês eu não teria conseguido correr atrás de tantas coisas na minha vida! Segundamente ao meu irmão mais velho, Mestre Weligton Nogueira Costa Junior, por ser o meu espelho na vida universitária, se recebo este diploma devo muito aos seus ensinamentos em exatas e sobre a vida, nada disso seria possível sem todo conhecimento que você sempre me passou! Não menos importante, ao meu irmão mais novo, Willian Henrique de Oliveira Nogueira, ter te visto crescer me tornou um ser humano melhor, mesmo com todas as brigas clássicas de irmãos, cada pergunta sua como: “ainda não estudou isso?” me preparou para ser uma adulta e bióloga melhor, admiro muito seu crescimento e todas suas conquistas. Eu amo todos vocês!

Ao meu companheiro, Eliabe Vinicius, obrigada por estar ao meu lado neste momento e por sempre me escutar reclamar e chorar, viver o momento de conclusão de curso juntos não foi fácil, mas passamos por essa juntos com muito amor e companheirismo!

A vida é muito sem graça com um diploma se você não tem pessoas especiais com quem dividir essa conquista, por isso deixo minha gratidão pelas amigas que estiveram ao meu lado ao longo da minha formação e nos momentos de descoberta sobre como ser adulta. Por isso, agradeço à Victoria Marchetto por ter entrado na minha vida em nosso segundo período e não ter me abandonado mesmo com a distância, por sempre me dar seu colo para chorar mesmo sem mudar o repertório de reclamações! Agradeço à Marina Ranhel pela resiliência em nossa amizade e ter buscado compreender o meu jeito de ser, ter a sua companhia, ombro, conselhos e parceria nessa reta final foi extremamente essencial, amo você. Ao Gustavo Nunes, por ser o melhor amigo que eu tive em muitos momentos, por me inspirar a conquistar o mundo e por nunca ter me deixado desistir de meus sonhos! A Vitória Normandia por tornar parte desse ano mais leve me fazendo buscar sempre minha melhor versão e correr atrás de finalizar tudo isso. Deixo também meu agradecimento à minha querida amiga e roommate

Luísa Burgardt que foi meu conforto em casa sempre que precisei e não tive forças para algo, você tornou tudo mais leve e dividir meu dia a dia com você foi a melhor experiência de vida, juntamente agradeço ao Ms.Thiago Vieira que foi um braço a mais nos dias de luta no cheer e na graduação, obrigada por me inspirar tanto! À Brennda Valyery e Monise Alves, obrigada pelas noites das meninas lá em casa e por todas as fofocas que aqueceram o coração! Ao Thiago Gomes, você é um extremamente parceiro para todas as horas, obrigada por sempre estar disponível quando precisei de companhia ou de algum apoio! Deixo também a minha gratidão àqueles que passaram pela minha caminhada e moldaram em algum momento lembranças e ensinamentos: Luana Luz, Bianca Leticia, Rodrigo Nascimento, Maria Eduarda Hathenher, Juliana Alves, Mariah, Marcela Arata, David Silva, Gabriel Nogueira, Bruna Fernanda, Tatiana Vecchi. Vocês são incríveis!

Aos programas que participei durante minha vida acadêmica, agradeço ao Programa de Extensão tutorial (PET Biologia), em especial a tutora Ariádine Cristine de Almeida por sempre acreditar no meu potencial e aos integrantes de 2023, em especial Emily, Daniel, Bruna por tornarem o caos mais calmo e engraçado, e aos outros integrantes gratidão por toda paciência com essa reta final e por todas as risadas e viagem foi incrível crescer academicamente com vocês. À 89ª turma de Biologia, por todo amor e ódio ao longo da graduação, por todo apoio, risadas e surtos, agradeço vocês por todos os momentos. Agradeço também à BAYER, pela oportunidade de realizar dois anos de estágio com a chance de conhecer um outro lado da vida profissional e ter tanto desenvolvimento pessoal. Ao meu gestor do estágio, Felipe Finazzi, por ter me ensinado tanto sobre a vida, sobre o mundo corporativo e universitário, me formo uma profissional muito melhor por todas as oportunidades e reuniões de desenvolvimento que tivemos!

E por último, agradecer ao meu descanso mental da vida universitária e profissional, o cheerleading. Os domingos às 8 horas da manhã foram essenciais para aguentar esses últimos anos. Obrigada a todos do Cheer Supreme, eu amo vocês e sou grata por estarem comigo nesta evolução diária!

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que causa a toxoplasmose, uma doença global e que possui um ciclo de vida complexo com estágios bem definidos, taquizoítos com multiplicação rápida e bradizoítos, no qual, formam cistos no tecido. A infecção por esse parasita pode ocorrer por meio da ingestão de carne crua contaminada com cistos teciduais ou por oocistos excretados por felinos. A proteína de choque térmico (HSP), 70 kDa de *T. gondii*, desempenha um papel fundamental na sobrevivência do parasita, pois este expressa a TgHSP70 durante a sua conversão do estágio de taquizoíta para bradizoítas, assim como de bradizoítas para taquizoítas, por isso podem ser um alvo potencial para estudos de novos tratamentos contra a doença. A modelagem *in silico* é uma forma de visualizar a estrutura molecular de uma proteína sem a necessidade de testes experimentais, para isso a utilização de programas de alinhamento, criação de modelos, análises de qualidade, são essenciais. Então, realizou-se a modelagem tridimensional da proteína de choque térmico de 70 kDa de *T. gondii*, utilizando o programa SWISS-MODEL, partir da estrutura “template” mais favorável de HSP70 (PDB7 sqc.391.A de *Chlamydomonas reinhardtii*) de *Chlamydomonas reinhardtii*. O modelo gerado para HSP70 de *T. gondii* foi validado por meio dos programas VERIFY3D e PROCHECK, demonstrando alta qualidade da proteína modelada.

**Palavras chave:** Toxoplasmose, modelagem, proteína, *in silico*, qualidade química, estrutura molecular.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan that causes toxoplasmosis, a global disease that has a complex life cycle with well-defined stages: rapidly multiplying tachyzoites and bradyzoites, which form cysts in the tissue. Infection with this parasite can occur through eating raw meat contaminated with tissue cysts or through oocysts excreted by cats. The 70 kDa heat shock protein (HSP) of *T. gondii* plays a key role in the parasite's survival, as it expresses TgHSP70 during its conversion from the tachyzoite stage to bradyzoites, as well as from bradyzoites to tachyzoites, so it could be a potential target for studies into new treatments against the disease. *In silico* modeling is a way of visualizing the molecular structure of a protein without the need for experimental tests, for which the use of alignment programs, model creation and quality analysis are essential. Three-dimensional modeling of the 70 kDa heat shock protein from *T. gondii* was carried out using the SWISS-MODEL program, starting from the most favorable template structure of HSP70 (PDB 7 sqc.391.A *Chlamydomonas reinhardtii*) from *Chlamydomonas reinhardtii*. The model generated for HSP70 from *T. gondii* was validated using the VERIFY3D and PROCHECK programs, demonstrating the high quality of the modeled protein.

**Keywords:** Toxoplasmosis, modeling, protein, *in silico*, chemical quality, molecular structure.

# SUMÁRIO

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	9
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	9
1.2 Proteínas de Choque Térmico: .....	12
1.3 Análise <i>in silico</i> e a modelagem tridimensional (3D).....	13
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
3. METODOLOGIA .....	16
3.1 Banco de Dados.....	17
3.2 BLAST .....	17
3.3 SWISS MODEL.....	17
3.4 Avaliação da qualidade do modelo da proteína.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4.1 Alinhamento das sequências de aminoácidos .....	18
4.2 Modelagem da proteína.....	20
4.3 Validação da modelagem .....	22
5. CONCLUSÃO .....	25
REFERÊNCIAS.....	26



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário intracelular obrigatório, capaz de infectar diversos hospedeiros, acometendo inclusive o ser humano, isto ocorre devido à sua excelente capacidade de invadir e replicar dentro de qualquer célula hospedeira e infectar diversos órgãos (MITRA et al, 2020). O parasito foi descrito inicialmente em 1908 por Nicolle e Manceaux quando analisaram tecidos de um roedor, *Ctenodactylus gundi*, na África (DUBEY, 2010). Pertence à Família: Sarcocystidae, Gênero: *Toxoplasma*, Espécie: *T. gondii* (SALOMÃO, 2017). Recebeu este nome devido a sua característica morfológica, em formato de meia-lua (do grego *toxos*: forma de arco, e *plasma* que significa vida), sendo responsável pela doença conhecida como toxoplasmose (DUBEY, 2008).

A toxoplasmose é uma doença de epidemiologia complexa, global e de múltiplas manifestações (SMITH et al, 2021) estima-se que cerca de 2 bilhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com o parasito (MITRA et al, 2020). Sendo prevalente em animais e em seres humanos (DUBEY, 2008). Apesar da sua distribuição mundial, existe apenas uma espécie do gênero. Sua diversidade genética está diretamente correlacionada com a gravidade da doença, suas cepas estão agrupadas em genótipos, o genótipo I são cepas com maior virulência, já os genótipos II e III os genótipos com menor virulência (SIBLEY; BOOTHROYD, 1992).

No Brasil até 2011, considerava-se uma média de 5-23 infecções congênicas a cada 10.000 nascimentos, sendo esse dado obtido em pequenas amostragens com pessoas que tinham possibilidade de pagar pelos testes. Em dados analisados em 2012, Dubey (2021) menciona com base em seus estudos que a taxa e gravidade da infecção por *T. gondii* em crianças no Brasil é maior que na Europa (DUBEY, 2021).

O parasito possui ciclo de vida heteroxeno e possui duas fases bem estabelecidas que acontecem dentro das células de seus hospedeiros, uma assexuada e outra sexuada alternando assim entre hospedeiros intermediários, os animais de sangue quente e seres humanos, e hospedeiros definitivos, os felídeos. Dentro do ciclo existem três formas (Figura 1), o estágio conhecido como taquizoíto que é caracterizado por rápida multiplicação e ocorre na fase aguda da infecção (TENTER et al, 2000). Sob pressão do sistema imune, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, estágio de latência, onde a multiplicação é lenta, sendo marcante na fase crônica (JEFFERS et al., 2018), ocorrendo a formação de cistos teciduais, observados

nos tecidos musculares e neurais. A quantidade de bradizoítos dentro de um cisto muda de acordo com sua dimensão e tempo de formação, aqueles mais jovens geralmente são menores e possuem cerca de 10  $\mu\text{m}$  enquanto os mais velhos podem chegar a apresentar diâmetro 10 vezes maior (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012). Os oocistos são liberados do intestino do hospedeiro definitivo no ambiente pelas fezes, liberando dois esporocistos e cada um com quatro esporozoítos (TENTER et al, 2000).

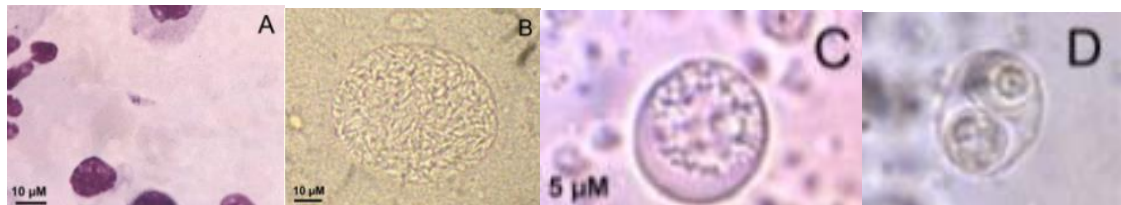


Figura 1: Estágios do parasito: em (A) Taquizoítos em uma amostra de lavagem broncoalveolar corada com Giemsa; (B) Cisto em cérebro de um camundongo infectado; (C) Oocisto não esporulado; (D) Oocisto esporulado. (Adaptada de Robert-Gangneux e Dardé, 2012).

A infecção do hospedeiro definitivo começa com a ingestão de carne crua contaminada com cistos teciduais e também pode ocorrer através da ingestão de oocistos excretados por felinos presente em alimentos contaminados. Após a ingestão, os bradizoítos são liberados dos cistos, sofrem divisão e originam merozoítos nas células epiteliais intestinais. Posteriormente, ocorre a formação de gametas masculinos e femininos (gametogênese), nos quais oocistos não esporulados ou imaturos são liberados na luz intestinal do felino, onde, no ambiente externo, a esporulação dos oocistos torna-os infecciosos para o hospedeiro intermediário (DUBEY, 1998) (Figura 2).

Se uma gestante ingerir alimentos contaminados, os taquizoítas podem penetrar na placenta, e a transmissão de *T. gondii* da mãe para o feto poderá acontecer, sendo mais eficaz na segunda metade da gestação devido a fatores imunológicos, assim como a espessura da placenta (DUNN et al., 1999; BLASZKOWSKA e GÓRALSKA, 2014). A transmissão transplacentária pode ocorrer quando uma mulher é infectada durante a gestação, sendo que a transmissão congênita raramente ocorre em mulheres infectadas antes da gestação, ou seja, infectadas cronicamente. Em mulheres imunossuprimidas, pode ocorrer uma reativação da infecção no período gestacional, o que pode levar à toxoplasmose congênita (VILLENA et al., 1998; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009; WALLON & PEYRON, 2018).

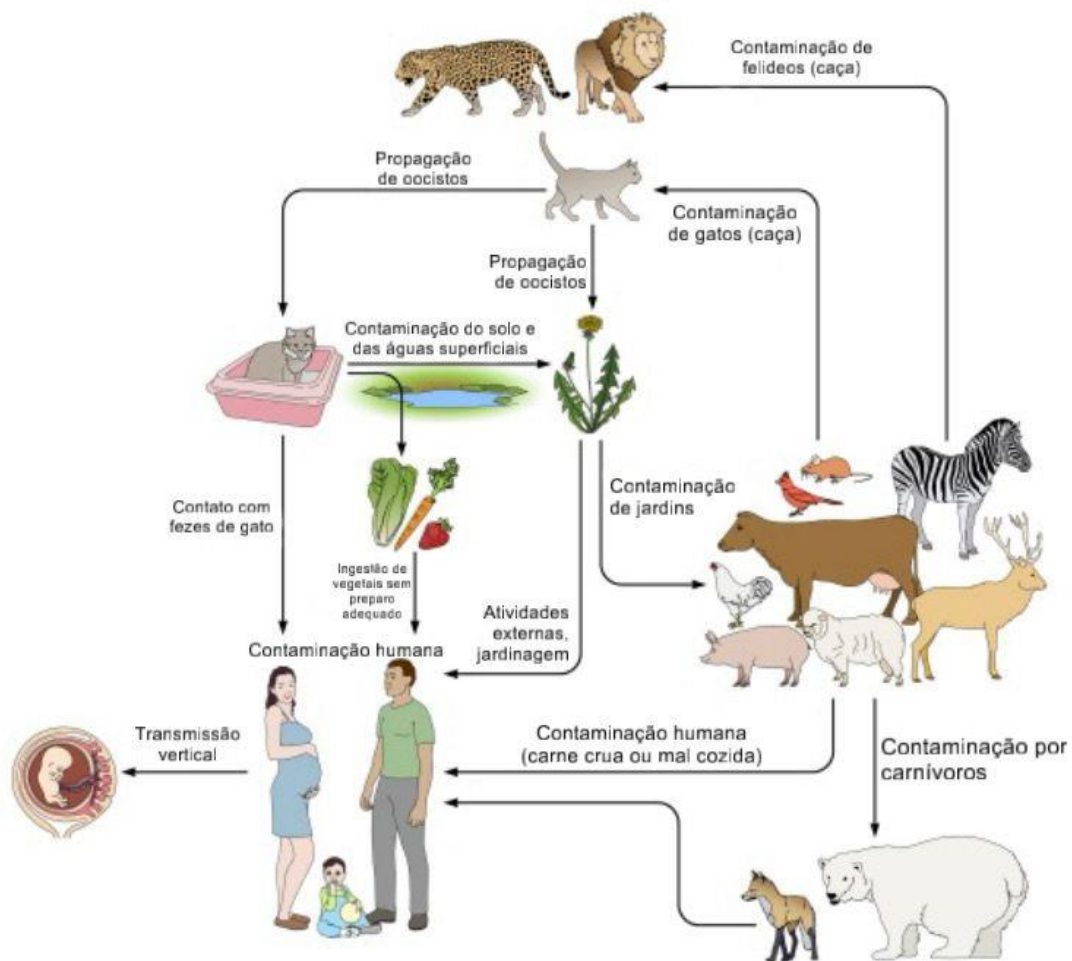


Figura 2 Ciclo e formas de infecção parasitária – Pode haver 3 tipos de transmissão: Ingestão de alimentos infectados, como carne mal cozida que contém bradizoítos encistados, ou ingestão de água contaminada com oocistos. Os oocistos de *T. gondii* podem ser eliminados pelas fezes de um gato infectado no meio ambiente. Caixas sanitárias contaminadas são particularmente preocupantes para gestantes porque a infecção inicial durante a gravidez pode resultar na transmissão do parasita ao embrião/feto (MODIFICADO DE ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012)

Um momento importante na infecção por *T. gondii* é a entrada do parasita na célula, que ocorre com a participação de três organelas principais presentes no citoplasma do parasita: micronemas essencial no reconhecimento da célula hospedeira; roptrias: envolvidas na formação do vacúolo parasitóforo e o conteúdo de grânulos densos que sofrem exocitose durante e após invasão (LUO et al., 2019). Esse processo é iniciado pela identificação da célula hospedeira a partir dos antígenos de superfície do parasita ancorados por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPIs) e proteínas relacionadas aos antígenos de superfície, SAGs (SRS). O parasita utiliza de sua extremidade apical para iniciar a penetração na célula alvo (JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

A infecção por *T. gondii* ativa uma imunidade inata com liberação de interleucinas, como IL-12 providas de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos que estimulam a proliferação de células *Natural killers* - NK, células T CD4+ e células T CD8+ citotóxicas, resultando na produção massiva de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), que ativa um conjunto de proteínas induzíveis por IFN- $\gamma$ , que participa da inibição do crescimento do parasito (SASAI et al 2019). A imunidade adaptativa à *T. gondii* depende tanto das células T CD4 como das células T CD8, sendo que estas últimas desempenham um papel dominante na manutenção da infecção crônica sob controle (KHAN et al 2019).

Em humanos, uma forma de identificar o parasita diretamente é por meio de detecção direta inoculando amostras em culturas de células ou inoculando em animais de laboratório (BIRADAR et al., 2014; BOURDIN et al., 2014; SWITAJ et al., 2005). Um outro meio de diagnóstico é baseado na detecção de anticorpos contra o parasito, utilizando-se de técnicas como imunofluorescência indireta, ensaios imunoenzimáticos (ELISA) entre outros (MARCOLINO et al., 2000). Não há necessidade de tratamento em imunocompetentes, caso o sistema imunológico não esteja debilitado. Porém em imunocomprometidos, o uso dos fármacos: sulfonamida e pirimetamina é recomendado (PEREIRA, et al 2010).

## 1.2 Proteínas de Choque Térmico:

As proteínas *Heat Shock Protein* (HSPs) são classificadas em famílias e pelo seu peso molecular, estão incluídas nelas: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 (BROCCHIERI et al, 2008). Essas proteínas são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência intracelular dos protozoários e, portanto, podem ser potenciais alvos durante o estresse celular, as HSPs têm um papel crítico na reparação e/ou desnaturação de proteínas danificadas para restaurar a homeostase proteica e promover a sobrevivência celular (ASHWINDER et al, 2017), estão presentes em processos de enovelamento e montagem de proteínas recentemente sintetizadas (MAYER, 2005).

Um exemplo das HSPs são as chaperonas moleculares muito conservadas evolutivamente e encontradas em todos organismos, incluindo os parasitos e protozoários, sendo essenciais para a sobrevivência da célula exposta a situações de estresses, um exemplo desta família é a HSP70 a qual possui peso de 70 kDa e é encontrada em baixas concentrações na maior parte de células e tecidos (MITRA et al, 2020; MAYER, 2005).

As HSP70s possuem um sítio de ligação de proteínas alvo e sítios de ligação e quebra de ATP, são proteínas que colaboram e são reguladas por vários cofatores, seu ciclo é

sensibilizado por interações com nucleotídeos. Possuem então duas porções: (1) Região N-terminal e (2) C-terminal, com sítio de atividade enzimática (KAMPINGA, et al 2010).

Em infecção por *T. gondii*, o parasito expressa TgHSP70 durante as conversões, na mudança de taquizoíto para bradizoítos e vice-versa, sendo considerada um fator de virulência do parasito (SILVA et al., 1998; BARENCO et al 2014).

### 1.3 Análise *in silico* e a modelagem tridimensional (3D)

O termo "*in silico*" é uma análise aplicada quando se conduzem experimentos por meio de abordagens tecnológicas, sendo muitas vezes um complemento do contexto biológico *in vivo* e *in vitro*. Isso pode envolver o uso de dados na construção de modelos ou simulações computacionais que têm a capacidade de realizar previsões, propor suposições e, em última análise, contribuir para descobertas e avanços no campo da medicina e da terapêutica (EKINS, 2007).

Para a compreensão das funções de uma proteína é essencial a utilização de um modelo tridimensional (3D), embora muitas proteínas já tenham tido sua estrutura definida experimentalmente *in vitro*, a quantidade de resoluções experimentais disponíveis é insuficiente em relação à abundância de proteínas identificadas, sendo assim, um modelo computacional é essencial para essas resoluções. Uma forma de realizar essa modelagem é a utilização do método por homologia, o qual, se inicia com a seleção de homólogos com identidade maior que 30 %, com estruturas conhecidas em *Protein Data Bank* (PDB) (XIANG, 2006).

Utiliza-se programas de banco de dados como o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para realizar consultas ou alinhamentos de sequências (XIANG, 2006). Posteriormente, é possível fazer uma modelagem molecular por homologia utilizando estruturas de proteínas 3D por meio de programas automatizados, como o SWISS-MODEL, um servidor desenvolvido por um grupo do Instituto Suíço de Bioinformática (SIB) e pelo Biozentrum da Universidade de Basileia conhecido como grupo de Biologia Estrutural Computacional (SIB - *Swiss Institute of Bioinformatics e Biozentrum of the University of Basel*), é um programa de fácil acesso podendo ser utilizado via WEB, no qual é possível criar modelos tridimensionais de proteínas, utilizando-se de uma biblioteca de modelos em paralelo com o BLAST (BIASINI, 2014)

Após o alinhamento das sequências e a modelagem em 3D, é necessário utilizar várias plataformas para verificar a qualidade do modelo construído computacionalmente, visto que, pode se encontrar modelos tridimensionais de proteínas de baixa qualidade, pois, uma simples molécula torção molecular ou com dobras incorretamente enoveladas pode afetar toda a estrutura molecular da proteína (EISENBERG et al, 1997). Um desses servidores é o PROCHECK, que permite a avaliação da estereoquímica da proteína e destaca regiões que necessitem de mais investigações, simetrias, geometrias e parâmetros como quiralidade, comprimentos de ligação, ângulos de ligação, ângulos de torção, entre outros. Além disso, é importante avaliar a qualidade estrutural. Outra ferramenta disponível online para essa finalidade é o VERIFY3D, que verifica a adequação da sequência à estrutura e atribui pontuações com base em matrizes construídas por meio de análises estatísticas (XIANG, 2006; LASKOWSKI, et al, 1993).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1 Objetivo geral

O trabalho teve como objetivo realizar a modelagem da proteína TgHSP70 do parasito *Toxoplasma gondii* por meio de programas de bioinformática.

### 3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado de acordo com os passos no fluxograma (figura 3). Inicialmente pesquisou-se as sequências no banco de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Foram detectadas sequências da proteína das cepas RH e ME-49 (Lyons & Johnson, 1998). As sequências depositadas por Lyons & Johnson (1998) da cepa RH e ME-49 apresentaram 99% de identidade entre si. A sequência da proteína HSP70 da cepa ME-49 (GenBank: AAC72002.1) apresenta 7 resíduos adicionais na extremidade C-terminal em comparação com cepa RH (GenBank: AAC72001.1) (Lyons & Johnson, 1998). Como a maioria dos trabalhos do grupo de pesquisa utilizam a cepa ME-49, decidimos avaliar a sequência dessa cepa.

O alinhamento das sequências das proteínas foi realizado no BLASTP para identificar a porcentagem de identidade e similaridade. O programa SWISS MODEL foi utilizado para realizar a modelagem por homologia da HSP70 da cepa ME-49. Com o modelo da proteína pronto foi realizada uma verificação para compreender se o modelo apresentou parâmetros adequados.

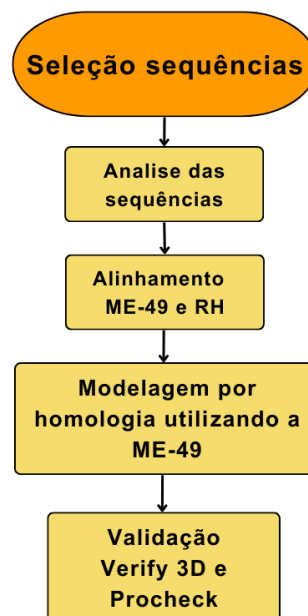


Figura 3 Fluxograma da metodologia utilizada durante o trabalho.



### 3.1 Banco de Dados

Inicialmente neste trabalho, sequências de proteínas TgHSP70 foram selecionadas a partir do banco de dados NCBI do Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia da Biblioteca Nacional de Medicina dos EUA. Neste banco de dados foi possível obter sequências FASTA da proteína, um código com as letras que representam os aminoácidos, permitindo a leitura da sequência dentro dos programas de alinhamento, sequenciamento e modelagens.

### 3.2 BLAST

O programa Web ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local, BLAST, realiza alinhamento entre sequências e aponta regiões de similaridades, comparando sequências de proteínas, nucleotídeos ou aminoácidos, com base nos bancos de dados do NCBI e traduz em formato estatístico a identidade e similaridade das sequências (National Library Of Medicine – NCBI)

### 3.3 SWISS MODEL

O SWISS-MODEL é uma ferramenta que permite criação de modelos moleculares *in silico* por alinhamento de homólogos.

Para criar um modelo dentro deste programa, foi necessário utilizar o PDB da proteína de interesse, neste caso foi utilizado a TgHSP70 da cepa ME-49. Ao iniciar a modelagem foi selecionado a opção “pesquisar modelo”, na qual, é realizado uma modelagem por homologia com a proteína selecionada, isso gera um resultado em comparação com outras proteínas com alguma similaridade.

Ao executar a pesquisa de modelos, o servidor SWISS-MODEL gerou diversos modelos moleculares diferentes, variando desde o mais similar ao menos similar em relação à proteína de interesse. O critério de seleção para o modelo a ser usado pode depender de diversos fatores, incluindo a similaridade na sequência de aminoácidos, a qualidade do modelo e a adequação química da proteína. Neste trabalho, o modelo escolhido como molde (“*template*”) para a modelagem molecular foi a proteína HSP70 (PDB: 7sqc.391.A) de *Chlamydomonas reinhardtii* já que esta proteína apresentou maior similaridade na sequência de aminoácidos relacionada a TgHSP70 da cepa ME-49 de *T. gondii*.

### 3.4 Avaliação da qualidade do modelo da proteína

Com o modelo do PDB: 7 sqc.391.A de *Chlamydomonas reinhardtii* pronto, foi necessário realizar validações para verificar se o modelo atômico tridimensional (3D) era compatível com a sua sequência de aminoácidos e realizar uma análise da qualidade, utilizando a plataforma SAVES v6.0 para verificação em diversos parâmetros e saber sobre a qualidade/validação da proteína, sendo eles: VERIFY, PROCHECK.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Alinhamento das sequências de aminoácidos

Os resultados visualizados no quadro I mostraram um alinhamento local da proteína HSP70 de *T. gondii* das cepas ME-49 e RH. Foi observado que estas cepas são homologas, com 99% de similaridade e identidade, com 667 aminoácidos conservados entre 674 (Tabela 1). A similaridade é equivalente a semelhança apresentada entre as sequências sendo o seu valor baseado no número de posições que se relacionam, ou seja, é a característica bioquímica similar entre as duas sequências, tendo sido utilizado a identidade e a conservação dos nucleotídeos ou aminoácidos. A identidade é o número das posições sem diferenças entre duas sequências alinhadas (PROTASIO et al, 2020).

Dentre os aminoácidos é possível observar que as duas sequências alinhadas, ME-49 e RH, são homologas com bastante similaridade, não ultrapassando os 99% devido as 7 “lacunas” observadas na linha dos aminoácidos 601 a 653, esses espaços acontecem por não possuir nada para ser pareado naquela região,

Score	Similaridade	Identidade	Lacunas
1365	667/674(99%)	667/674 (99%)	7/674 (1%)

Tabela 1 Tabela com dados de similaridade, identidade e Lacunas referente ao alinhamento das sequências ME-49 e RH

1:	<b>1</b>	MADSPAVGIDLGTTYSCVGVWKNDAVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLVGDAAKNQVA	<b>60</b>
2:	<b>1</b>	MADSPAVGIDLGTTYSCVGVWKNDAVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLVGDAAKNQVA	<b>60</b>
		*****	
1:	<b>61</b>	RNPENTIFDAKRLIGRKFDPSVQSDMKHWPFKVIAGPGDKPLIEVTYQGEKKTFFHPEEV	<b>120</b>
2:	<b>61</b>	RNPENTIFDAKRLIGRKFDPSVQSDMKHWPFKVIAGPGDKPLIEVTYQGEKKTFFHPEEV	<b>120</b>
		*****	
1:	<b>121</b>	SAMVLGKMKEIAEAYLGKEVKEAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLSVLRIINEPTAA	<b>180</b>
2:	<b>121</b>	SAMVLGKMKEIAEAYLGKEVKEAVITVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLSVLRIINEPTAA	<b>180</b>
		*****	
1:	<b>181</b>	AIAYGLDKKCGEMNVLIFDMGGGTFDVSLLTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVD	<b>240</b>
2:	<b>181</b>	AIAYGLDKKCGEMNVLIFDMGGGTFDVSLLTIEDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVD	<b>240</b>
		*****	
1:	<b>241</b>	FCVQDFKRKNRGKDISTNSRALRRLRTQCERTKRTLSSSTQATIEIDSLFEGIDYSVSIS	<b>300</b>
2:	<b>241</b>	FCVQDFKRKNRGKDISTNSRALRRLRTQCERTKRTLSSSTQATIEIDSLFEGIDYSVSIS	<b>300</b>
		*****	
1:	<b>301</b>	RARFEELCMDYFRNSLLPVEKVLKDSGIDKRSVSEVVLVGGSTRIPKIQQLITDFFNGKE	<b>360</b>
2:	<b>301</b>	RARFEELCMDYFRNSLLPVEKVLKDSGIDKRSVSEVVLVGGSTRIPKIQQLITDFFNGKE	<b>360</b>
		*****	
1:	<b>361</b>	PCRSINPDEAVAYGAAVQAAILKGVTSQVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTKLIERNT	<b>420</b>
2:	<b>361</b>	PCRSINPDEAVAYGAAVQAAILKGVTSQVQDLLLLDVAPLSLGLTAGGVMTKLIERNT	<b>420</b>
		*****	
1:	<b>421</b>	TIPTKKSQTFTTYADNQPGLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFHLDGIPPAPRGVPOIEVTF	<b>480</b>
2:	<b>421</b>	TIPTKKSQTFTTYADNQPGLIQVYEGERAMTKDNNLLGKFHLDGIPPAPRGVPOIEVTF	<b>480</b>
		*****	
1:	<b>481</b>	DIDANGIMNVTAQDKSTGKSNQITITNDKGRLSASEIDRMVQEAKEYKAEDEQNKHRVEA	<b>540</b>
2:	<b>481</b>	DIDANGIMNVTAQDKSTGKSNQITITNDKGRLSASEIDRMVQEAKEYKAEDEQNKHRVEA	<b>540</b>
		*****	
1:	<b>541</b>	KNGLENYCYHMRQTLDDDEKLKDKISSEDRDTANKAIQEALDWLDKNQLAEKEEFEAKQKE	<b>600</b>
2:	<b>541</b>	KNGLENYCYHMRQTLDDDEKLKDKISSEDRDTANKAIQEALDWLDKNQLAEKEEFEAKQKE	<b>600</b>
		*****	

```

1: 601 VESVCTPIITKLYQAGAAAGGMPGGMGGMPGGMGGMPGGMGGMPGGMGGMPGGMGGMPGA 660
2: 601 VESVCTPIITKLYQAGAAA-----GGMPGGMGGMPGGMGGMPGGMGGMPGGMGGMPGA 653
      *****
1: 661 GMGSGGPTVEEVD 674
2: 654 GMGSGGPTVEEVD 667
      *****
1: HSP70 Tg ME-49 Ly - Lyons, R.E. and Johnson,A.M
2: HSP70 Tg RH Ly - Lyons, R.E. and Johnson,A.M

```

*Quadro 1* – Alinhamento sequências ME-49 e RH de Lyons, R.E. and Johnson,A.M

#### 4.2 Modelagem da proteína

Utilizamos o programa Swiss Model para modelagem da proteína HSP70 de *T. gondii*. Como descrito na metodologia, o programa realizou uma leitura da sequência FASTA e criou um modelo a partir da homologia com outros PDBs. (WATERHOUSE et al. 2018).

A modelagem da proteína (Figura 4) foi escolhida devido a sua porcentagem de 74,47% de identidade com a cepa ME-49 (Figura 5), e similaridade de 70% com a cepa da proteína O alinhamento entre a sequência de ME-49 e do modelo 7sqc.391.A da *Chlamydomonas reinhardtii*, realizada pela plataforma SWISS-MODEL se mostrou bastante conservada, e podemos observar a modelagem criada pelo programa na (Figura 6) .

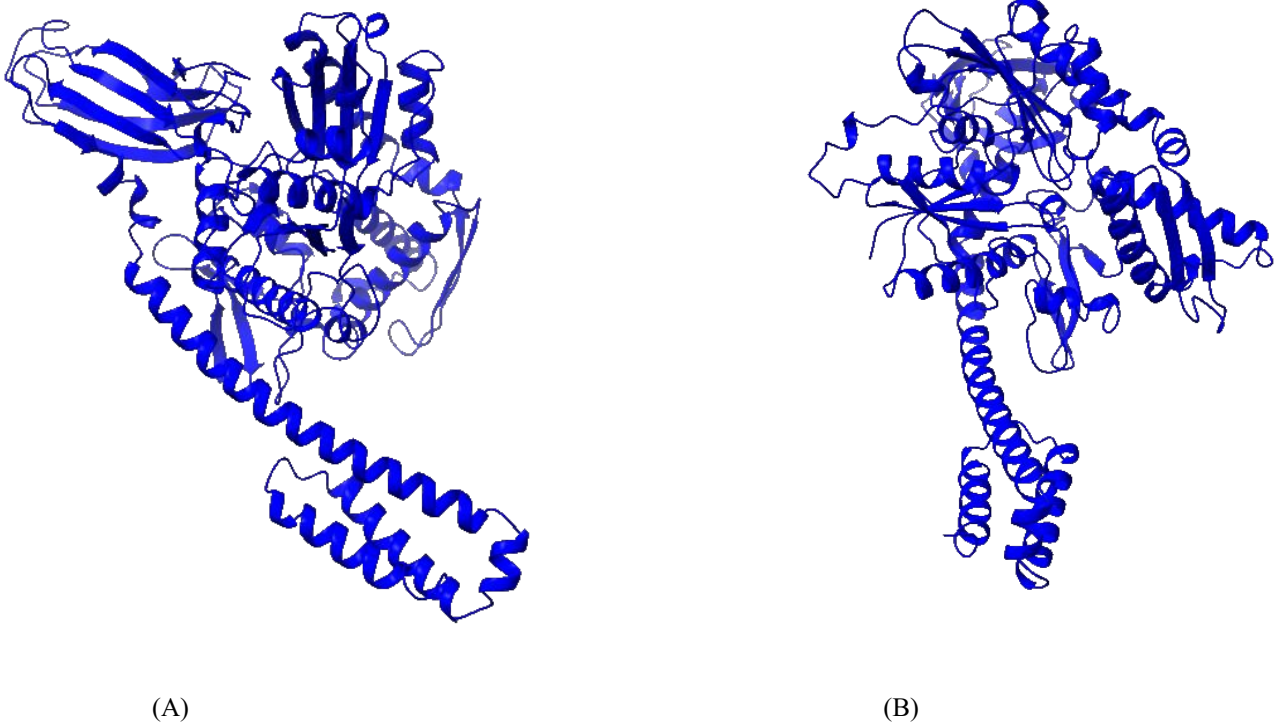


Figura 4 Modelagem *in silico* da proteína TgHsp70 PDB 7sqc.391.A da *Chlamydomonas reinhardtii*, sendo figura A e B com 90° de diferença

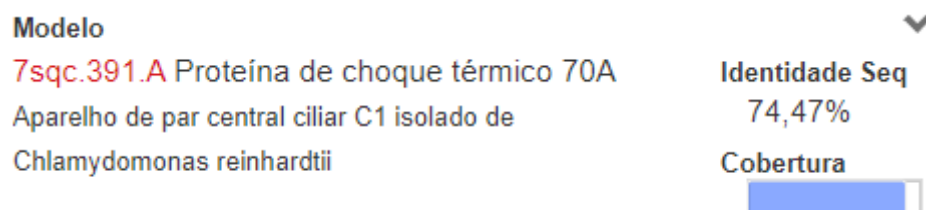


Figura 5 Porcentagem de identidade e similaridade da proteína HSP70 da cepa ME-49 com a sequência de aminoácidos do PDB 7sqc. 391.A. da *Chlamydomonas reinhardtii*.

### 4.3 Validação da modelagem

Para validação da modelagem foi utilizado o programa VERIFY 3D. Essa ferramenta avaliou a concordância entre o modelo tridimensional (3D) e sua sequência de aminoácidos unidimensionais (1D). O sistema utilizou de coordenadas atômicas da própria estrutura. Como base, o sistema utiliza de pontuação baseado na combinação de um conjunto de vinte aminoácidos, e definidos por três parâmetros, sendo: a área do resíduo que não está acessível ao solvente, a fração da área da cadeia lateral que é coberta por átomos polares, como oxigênio (O) e nitrogênio (N), e a estrutura secundária local. Finalmente, esses parâmetros são comparados com modelos de alta qualidade, resultando na atribuição gráfica de uma pontuação média 3D-1D (BOWIE; et al, 1991; LUTHY; et al, 1992; EISENBERG, et al 1997).

O programa VERIFY 3D projetou o resultado avaliativo da compatibilidade 3D-1D dos modelos atômicos de PDB (7sqc. 391.A da *Chlamydomonas reinhardtii*) referentes à proteína HSP70 da cepa ME-49 de *T. gondii* como um modelo aprovado, obtendo pontuação média 3D-1D  $\geq 0,1$  em 82,51% dos resíduos do modelo (figura 6). Segundo os dados do site, acima de 80% é indicado como um modelo com compatibilidade, sendo uma estrutura bem refinada e um modelo correto sempre apresenta valor acima de 0,1 (EISENBERG, et al, 1997), sendo assim, o modelo proposto é bem refinado.

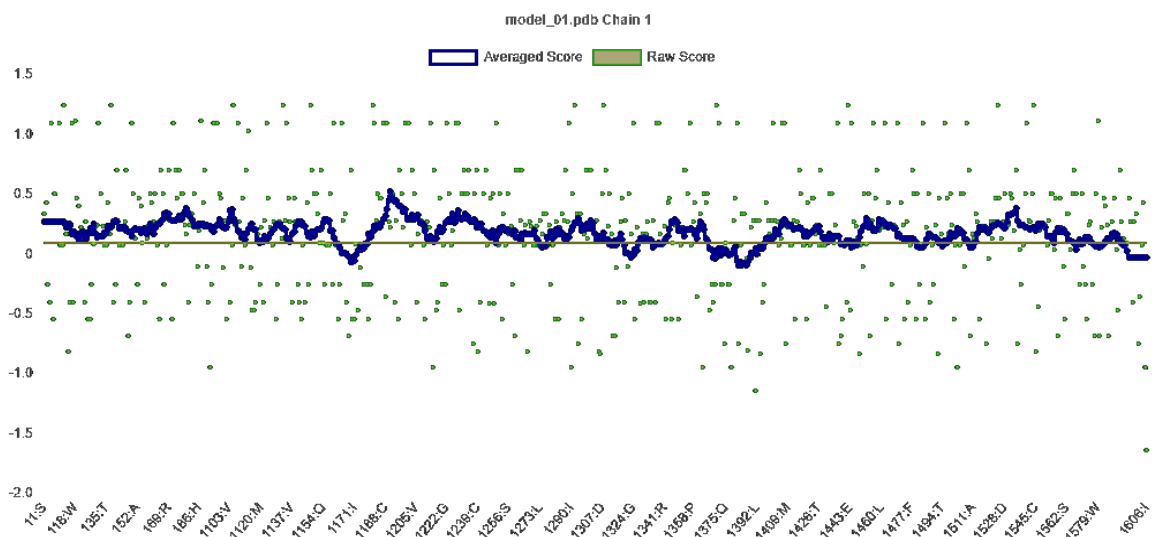


Figura 6 Gráfico de análise de compatibilidade 3D-1D obtido utilizando o programa VERIFY 3D. O segmento azul representa o resultado médio e os pontos verdes representam o resultado bruto da pontuação 3D-1D.

#### 4.1.1 PROCHECK

O programa PROCHECK realizou cálculos com parâmetros estereoquímicos e fez uma comparação a modelos compatíveis de alta qualidade com valores classificados como “ideais” obtidos a partir do banco de dados *Protein Data Bank*. Os gráficos nos mostram quais regiões podem estar mal alinhadas ou com torções errôneas, sendo esses dados liberados em formato *PostScript*. (BERNSTEIN et al., 1977)

As avaliações do sistema utilizam alguns parâmetros nos resíduos como: ângulos de torção phi ( $\phi$ ), psi ( $\psi$ ), entre outros, e com esses dados é criado um gráfico de ramanchadran, no qual, ilustrativamente é possível visualizar e analisar as combinações dos ângulos de torção phi ( $\phi$ ) e psi ( $\psi$ ) (LASKOWSKI, et al, 1993; ADOBE SYSTEMS INC.,1985; LASKOWSKI, et al, 1996).

Ao analisar o gráfico é possível compreender se os ângulos de torção obedecem aos limites prescritos na estereoquímica, com isto na figura 7, o modelo apresenta alta qualidade de acordo as estatísticas plotadas e disponibilizadas pelo sistema, pois, em 606 resíduos analisados, 499 posicionados nas regiões A, B, L do gráfico, são resíduos em regiões mais favorecidas, totalizando 92,6% de resíduos em torção correta, sendo que o parâmetro para esse gráfico, é que o resultado, de regiões favorecidas, acima de 90% atestam a qualidade dos resíduos.

Outros dados dispostos pelo gráfico são importantes para compreensão da qualidade do modelo, como as regiões adicionais permitidas com 37 resíduos em 6,9%, as regiões generosamente permitidas com 1 resíduo em 0,2 e as regiões não permitidas das estruturas moleculares com 2 resíduos em 0,4%, é possível esses aminoácidos fora dos padrões esperados pelo gráfico de ramanchadran, tais como: **SER 387 (A)**; **ALA 589(A)**, alocados próximos as regiões: ~b, ~p, respectivamente.

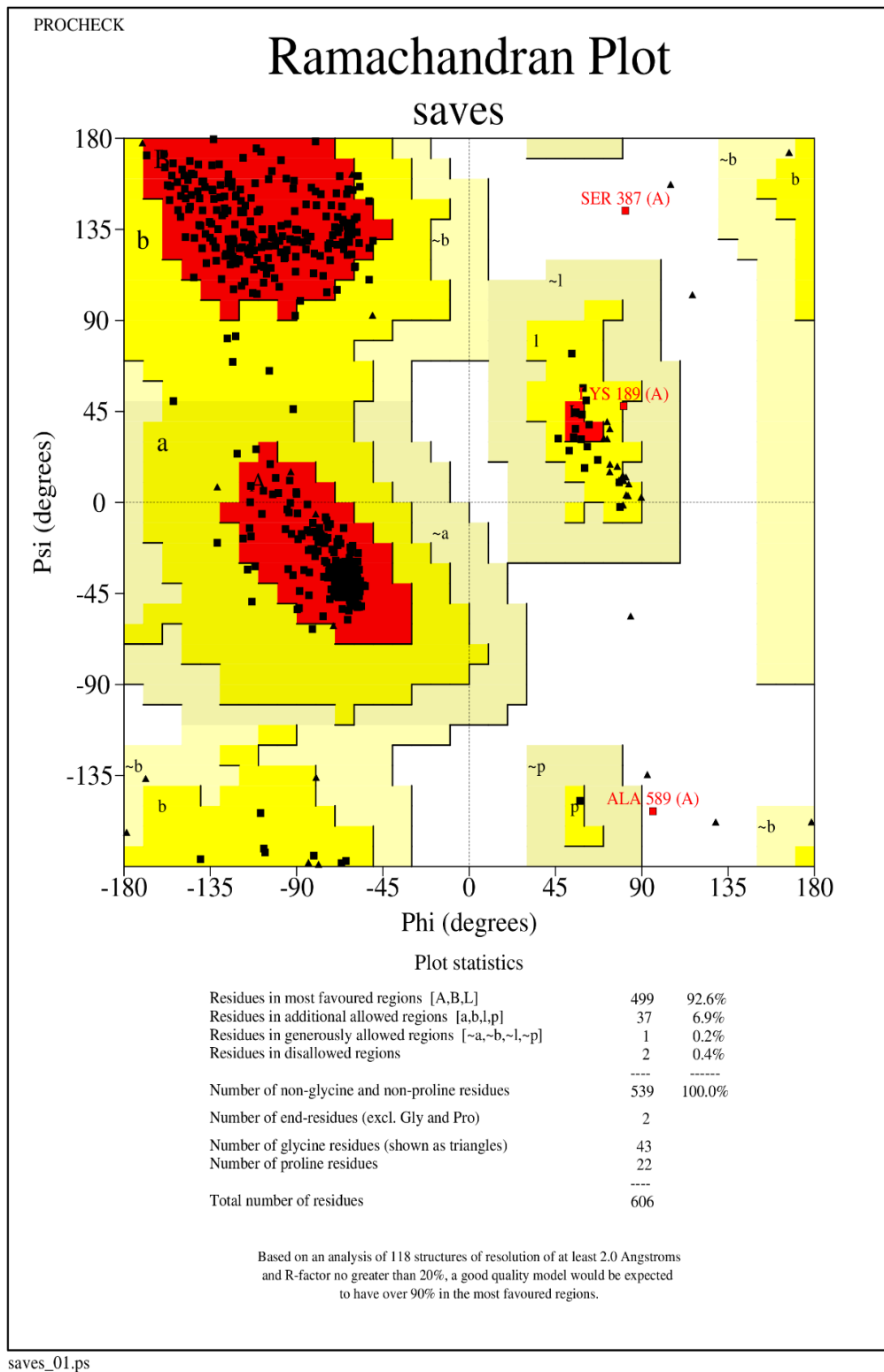


Figura 7 Gráfico Ramachandran realizado no PROCHECK para análises da posição de torsão do PDB 7sqc. 391.A. da *Chlamydomonas reinhardtii*.



## 5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, concluímos que a modelagem da proteína TgHSP70 da cepa ME-49 de *T. gondii*, utilizando como template o PDB 7sqc.391.A da *Chlamydomonas reinhardtii*, foi bastante favorável e promissora, mostrando uma alta qualidade estereoquímica e uma estrutura bem modelada.

## REFERÊNCIAS

Adobe Systems Inc. (1985). PostScript Language Reference Manual. Reading, MA: Addison-Wesley.

Ashwinder, K., Kho, M. T., Chee, P. M., Lim, W. Z., Yap, I. K. S., Choi, S. B., & Yam, W. K. (2016). Targeting Heat Shock Proteins 60 and 70 of *Toxoplasma gondii* as a Potential Drug Target: *In Silico* Approach. **Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences**, 8(4), 374–387. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0107-x>

BARENCO, Paulo Victor Czarnewski. Mecanismos de proteção induzidos pela imunização com TgHSP70 e de controle da inflamação pelo tratamento com STAg na infecção por *Toxoplasma gondii*. 2015. 89 f. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)** - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015. DOI <https://doi.org/10.14393/ufu.te.2015.50>

**Basic Local Alignment Search Tool**. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em: 15 julho. 2023.

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., & Tasumi, M. (1977). The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, 112(3), 535–542. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(77\)80200-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(77)80200-3)

Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**, 42(1), 252–258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku340>

Biradar, S., Saravanan, B., Tewari, A., Sreekumar, C., Sankar, M., & Sudhakar, N. (2014). Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens in India by GRA6 gene sequence analysis. **Acta Parasitologica**, 59(4). <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0288-1>

Błaszowska, J., & Górska, K. (2014). Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. **Annals of Parasitology**, 60(4), 225–234. PMID: 25706418

Bourdin, C., Busse, A., Kouamou, E., Touafek, F., Bodaghi, B., Le Hoang, P., Mazier, D., Paris, L., & Fekkar, A. (2014). PCR-Based Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in Blood and Ocular Samples for Diagnosis of Ocular Toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 52(11), 3987–3991. <https://doi.org/10.1128/JCM.01793-14>

Bowie, J. U., Lüthy, R., & Eisenberg, D. (1991). A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure. **Science**, 253(5016), 164–170. <https://doi.org/10.1126/science.1853201>

Brocchieri, L., Conway de Macario, E., & Macario, A. J. (2008). hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions. **BMC Evolutionary Biology**, 8(1), 19. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19>

Dubey, J. P., Lindsay, D. S., & Speer, C. A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(2), 267–299. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.2.267>

- Dubey, J., & Jones, J. (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, 38(11), 1257–1278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>
- Dunn, D., Wallon, M., Peyron, F., Petersen, E., Peckham, C., & Gilbert, R. (1999). Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. **The Lancet**, 353(9167), 1829–1833. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)08220-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)08220-8)
- Eisenberg, D., Lüthy, R., & Bowie, J. U. (1997). [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, 277, 396–404. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(97)77022-8)
- Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). *In silico* pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. **British Journal of Pharmacology**, 152(1), 9–20. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707305>
- Elbez-Rubinstein, A., Ajzenberg, D., Dardé, M., Cohen, R., Dumètre, A., Yera, H., Gondon, E., Janaud, J., & Thulliez, P. (2009). Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. **The Journal of Infectious Diseases**, 199(2), 280–285. <https://doi.org/10.1086/595793>
- Jeffers, V.; Tampaki, Z.; Kim, K.; Sullivan, W.J. Jr. A latent ability to persist: differentiation in *Toxoplasma gondii*. **Cell Mol. Life Sci.** v. 75, n. 13, p. 2355-2373, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2808-x>
- Jung, C., Lee, C. Y.-F., & Grigg, M. E. (2004). The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, 34(3), 285–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.004>
- Kampinga, H. H., & Craig, E. A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 11(8), 579–592. <https://doi.org/10.1038/nrm2941>
- Khan, I. A., Hwang, S., & Moretto, M. (2019). *Toxoplasma gondii*: CD8 T Cells Cry for CD4 Help. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00136>
- Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, 26(2), 283–291. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. Antoon, C., MacArthur, M. W., Kaptein, R., & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, 8(4). <https://doi.org/10.1007/BF00228148>
- Luo, J., Wan, J., Tang, Z., & Shen, S. (2019). Identification of novel antigens for serum IgG diagnosis of human toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, 204, 107722. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107722>
- Lüthy, R., Bowie, J. U., & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, 356(6364), 83–85. <https://doi.org/10.1038/356083a0>

Lyons, R. E., & Johnson, A. M. (1998). Gene sequence and transcription differences in 70 kDa heat shock protein correlate with murine virulence of *Toxoplasma gondii* fn1fn1. Note: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the EMBL, GenBank™ and DDJB databases under the accession numbers u85648 and u85649 for RH and ME49 strains, respectively. **International Journal for Parasitology**, 28(7), 1041–1051.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00074-5)

Marcolino, P. T., Silva, D. A. O., Leser, P. G., Camargo, M. E., & Mineo, J. R. (2000). Molecular Markers in Acute and Chronic Phases of Human Toxoplasmosis: Determination of Immunoglobulin G Avidity by Western Blotting. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, 7(3), 384–389. <https://doi.org/10.1128/CDLI.7.3.384-389.2000>

Mayer, M. P., & Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 62(6), 670–684.

<https://doi.org/10.1007/s00018-004-4464-6>

Mitra, P., Deshmukh, A. S., & Choudhury, C. (2021). Molecular chaperone function of stress inducible Hsp70 is critical for intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, 1868(2), 118898.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118898>

**National center for biotechnology information.** Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 jul. 2023.

Pereira, K. S., Franco, R. M. B., & Leal, D. A. G. (2010). Transmission of Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*) by Foods. In: **Advances in Food and Nutrition Research**, 60, 1–19.

[https://doi.org/10.1016/S1043-4526\(10\)60001-0](https://doi.org/10.1016/S1043-4526(10)60001-0)

Protasio, S. V. (2020). **Pesquisa de homólogos usando a ferramenta “Blast”.** In: **Introdução à bioinformática.** São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas.

Robert-Gangneux, F., & Dardé, M.-L. (2012). Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 25(2), 264–296.

<https://doi.org/10.1128/CMR.05013-11>

Salomão, Reinaldo. **Infectologia - Bases Clínicas e Tratamento.** 1ed - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

Sasai, M., & Yamamoto, M. (2019). Innate, adaptive, and cell-autonomous immunity against *Toxoplasma gondii* infection. **Experimental & Molecular Medicine**, 51(12), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0353-9>

Sibley, L. D., & Boothroyd, J. C. (1992). Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, 359(6390), 82–85. <https://doi.org/10.1038/359082a0>

Silva, N. M., Gazzinelli, R. T., Silva, D. A. O., Ferro, E. A. V., Kasper, L. H., & Mineo, J. R. (1998). Expression of *Toxoplasma gondii*-Specific Heat Shock Protein 70 during *In Vivo* Conversion of Bradyzoites to Tachyzoites. **Infection and Immunity**, 66(8), 3959–3963.

<https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3959-3963.1998>

Smith, N. C., Goulart, C., Hayward, J. A., Kupz, A., Miller, C. M., & van Dooren, G. G. (2021). Control of human toxoplasmosis. **International Journal for Parasitology**, 51(2–3), 95–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2020.11.001>

Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., & Zaborowski, P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, 11(3), 170–176. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01073.x>

**Swiss-model**. Disponível em: <<https://swissmodel.expasy.org/>>. Acesso em: 15 julho. 2023.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

Villena, I., Chemla, C., Quereux, C., Dupouy, D., Leroux, B., Foudrinier, F., & Pinon, J. M. (1998). Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group. **Prenatal Diagnosis**, 18(10), 1079–1081. PMID: 9826901

Wallon, M., Peyron, F. (2018) Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. **Pathogens**. 237(1). doi:25.10.3390/pathogens7010025.

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., de Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, 46(1), 296–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Webster, J. P. (2010). Dubey, J.P. Toxoplasmosis of Animals and Humans. **Parasites & Vectors**, 3(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-112>

Xiang, Z. (2006). Advances in Homology Protein Structure Modeling. **Current Protein & Peptide Science**, 7(3), 217–227. <https://doi.org/10.2174/138920306777452312>

Yarovinsky, F. (2014). Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. **Nature Reviews Immunology**, 14(2), 109–121. <https://doi.org/10.1038/nri359>