

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas**

**Mapeamento do epítopo do anticorpo C3C5 da molécula de grânulo denso
GRA2 de *Toxoplasma gondii* e participação de dois prováveis epítomos na
indução da resposta imune adaptativa em modelo de toxoplasmose
experimental murina**

LUCIANA MACHADO BASTOS

Uberlândia-MG

Junho-2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas**

**Mapeamento do epítopo do anticorpo C3C5 da molécula de grânulo denso
GRA2 de *Toxoplasma gondii* e participação de dois prováveis epítopos na
indução da resposta imune adaptativa em modelo de toxoplasmose
experimental murina**

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

LUCIANA MACHADO BASTOS

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

Uberlândia-MG

Junho-2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B327c

2013

Bastos, Luciana Machado, 1978 -

Caracterização do epítopo C3C5 da molécula de grânulo denso GRA2 de *Toxoplasma gondii* e participação de dois mimetopos na indução da resposta imune adaptativa em um modelo de toxoplasmose experimental murina / Luciana Machado Bastos. – 2013.

64 p. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. Anticorpos monoclonais - Teses. 4. Toxoplasmose – Teses. 5. Epítomos – Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu amado esposo Gianni, meu porto seguro em todos os momentos.

Ao meu filho, João Guilherme, a alegria de nossas vidas e a coisa mais importante e mais bela desse mundo. O meu amor por você não pode ser expresso em palavras.

Aos meus queridos pais, Paulo e Leila, que me ajudam e apóiam incansavelmente com dedicação e amor sempre. Minha eterna gratidão a vocês!

“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza de seu destino”

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora por iluminarem todos os meus passos, inclusive nos momentos difíceis e principalmente por colocarem pessoas especiais no meu caminho, que me ajudaram a concluir este trabalho.

A minha irmã Paula, pelo incentivo, amor e carinho sempre.

Ao professor José Roberto Mineo, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e relação afetuosa.

Ao professor Tiago W. P. Mineo, pela dedicação na condução deste trabalho e pela atenção e receptividade a mim dispensadas.

A professora Fernanda M. Santiago, pela vasta contribuição.

Ao professor Luiz Ricardo Goulart pela compreensão, incentivo e amizade.

Ao Arlindo Gomes de Macêdo Junior, pela imensurável contribuição, paciência, orientação e amizade em todos os momentos da execução deste trabalho.

Ao Murilo Vieira Silva, pela ajuda sempre com boa vontade, competência e bom humor.

A Fabiana de Almeida Araújo Santos pela ajuda nesta tese e por me acompanhar em todos os momentos com sua sincera amizade.

A Carolina Fernandes Reis por sua amizade, suas orações e por suas contribuições neste trabalho.

A Patrícia Tiemi Fujimura pela torcida empolgante, pelas dicas, pelos ensinamentos e principalmente por sua amizade.

Ao Robson J. Oliveira Júnior por todo carinho e amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunoparasitologia pela convivência sempre agradável.

Aos meus colegas do Laboratório de Nanobiotecnologia pela compreensão e torcida.

A Ana Cláudia Pajuaba pelas análises e ensinamentos.

Ao Marley, Edilge, Dona Zilda, Max, Lucélia e Lucileide pela atenção sempre.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao ensino público, gratuito e de qualidade.

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama do ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000	19
Figura 2: Morfologia e organelas do <i>T. gondii</i> em seu estágio taquizoíta segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000	22
Figura 3. Caracterização do mAb C3C5	48
Figura 4. Gráfico da proliferação de <i>T. gondii</i> tratado com anticorpo monoclonal C3C5 comparada à proliferação de <i>T. gondii</i> tratado com IgG irrelevante	49
Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	50
Figura 6. Eletroforese bidimensional	51
Figura 7. Ensaio de <i>Phage</i> -ELISA com o anticorpo monoclonal C3C5	53
Figura 8. Alinhamento dos fagos selecionados com a proteína GRA2	54
Figura 9. Predição de epítomos para células B	55
Figura 10. Sequência de aminoácidos da proteína GRA2	55
Figura 11. Modelo molecular da proteína GRA2 gerado pelo servidor I-Tasser	56
Figura 12. Curvas de sobrevida dos animais imunizados e posteriormente infectados com <i>T. gondii</i>	57
Figura 13. Slot blot com os peptídeos adsorvidos na membrana, proteína irrelevante (Lisozima) e BSA	58
Figura 14. IgG total e subclasses secretadas por animais imunizados	59
Figura 15. Perfil de produção de citocinas em animais imunizados e desafiados	60
Figura 16. Produção de IL-12/IL-23 p40 após imunização e desafio com <i>T. gondii</i>	60
Figura 17. Parasitismo cerebral em animais imunizados e desafiados com <i>T. gondii</i>	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Frequência dos clones de fagos sequenciados 52

Tabela 2. Tabela com as sequências dos peptídeos sintetizados 56

Lista de abreviaturas e siglas

BSA: Soroalbumina Bovina

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

°C: Grau Celsius

ELISA: Ensaio Imunoenzimático; “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

IE: Índice ELISA

IgG: Imunoglobulina G

IL-2: Interleucina 2

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

INF- γ : Interferon gama

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactósideo

FITC: Fluorescein Isothiocyanate

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

kDa: kiloDaltons

mAb: Anticorpo Monoclonal

mg: Miligrama

μ g: Micrograma

μ L: Microlitro

mL: Mililitro

OD: Densidade Óptica

PBS: Tampão Fosfato Salino

PCR: Reação em Cadeia de Polimerase

RIFI: Reação de imunofluorescência indireta

rpm: Rotações por minuto

SAG: Antígenos de Superfície

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

STAg: Antígenos Solúveis de *T. gondii*

T. gondii: *Toxoplasma gondii*

VP: Vacúolo parasitóforo

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 Toxoplasmose	16
1.2 Ciclo de vida do parasito, transmissão e manifestações clínicas	17
1.3 <i>Toxoplasma gondii</i> : morfologia e mecanismos de invasão	21
1.4 Proteínas de grânulos densos (GRAs)	23
1.5 Resposta imune	25
1.6 Anticorpos monoclonais e mapeamento de epítomos	26
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1 Manutenção e obtenção de parasitos	30
3.2 Preparo de antígenos solúveis	30
3.3 Produção de anticorpos monoclonais	31
3.4 Eletroforese unidimensional	32
3.5 <i>Imunoblotting</i>	32
3.6 Isotipagem do anticorpo monoclonal C3C5	33
3.7 Ensaio de proliferação com <i>T. gondii</i> 2F1	33
3.8 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	34
3.9 Eletroforese bidimensional	35
3.10 Sequenciamento da proteína GRA 2	36
3.11 <i>Biopanning</i> (seleção de fagos) de peptídeos	37
3.12 Sequenciamento do DNA	39
3.13 Análises de Bioinformática	40
3.14 Phage-ELISA Screening	40
3.15 Preparação do peptídeo sintético	41
3.16 Animais	42
3.17 Imunização dos camundongos	42
3.18 Infecção dos animais com <i>Toxoplasma gondii</i> em camundongo (cepa Me49)	43
3.19 <i>Slot-Blot</i> com peptídeos	43
3.20 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de IgG e subclasses IgG 1 e IgG 2a	44

3.21 Avaliação da resposta imune celular: quantificação de citocinas	45
3.22 Análise do parasitismo tecidual	46
3.23 Análise estatística	46
4. Resultados	48
4.1 Caracterização do anticorpo monoclonal C3C5	48
4.2 Ensaio de proliferação com <i>T.gondii</i> 2F1	49
4.3 Reação de imunofluorescência indireta	49
4.4 Eletroforese bidimensional	50
4.5 Seqüenciamento por espectrometria de massa	51
4.6 Seleção de peptídeos recombinantes (epítomos mapeados por <i>phage display</i>)	52
4.6.1 Extração de DNA e seqüenciamento dos clones de fagos	52
4.6.2 <i>Phage</i> -ELISA <i>Screening</i>	53
4.7 Análise de bioinformática e síntese de peptídeos	53
4.8 Modelagem molecular da proteína GRA2	56
4.9 Mortalidade após desafio com <i>T. gondii</i>	57
4.10 <i>Slot- Blot</i>	58
4.11 Avaliação da resposta humoral	59
4.12 Avaliação da resposta celular: Produção de citocinas após 7 dias de infecção	59
4.13 Parasitismo cerebral após desafio	61
5. Discussão	62
6. Conclusões	65
7. Referências bibliográficas	66

Resumo

Toxoplasma gondii é um protozoário do filo Apicomplexa intracelular obrigatório causador da toxoplasmose, que é especialmente grave em indivíduos imunocomprometidos e em indivíduos que adquiriram a infecção por transmissão congênita. Grânulos densos são organelas deste parasito envolvidas no processo de invasão e replicação do parasito no interior da célula. Dentre as proteínas secretadas pelos grânulos densos, chamadas conjuntamente de GRAs, a GRA 2 é particularmente imunogênica. No presente trabalho, no sentido de estudar a participação dessa proteína na indução da resposta imune adaptativa, foi produzido e caracterizado um anticorpo monoclonal contra GRA2. O parasito tratado com esse anticorpo apresentou menor taxa de replicação em ensaio de proliferação intracelular comparado ao tratamento com anticorpo irrelevante. Os epítomos de ligação da proteína GRA2 ao anticorpo monoclonal foram mapeados por *phage display*. Por meio de análises de bioinformática, epítomos para células B e T da GRA2 foram preditos e com base nisso e nos resultados do *phage display* foram escolhidas seqüências de aminoácidos para sintetizar dois peptídeos que foram testados quanto ao potencial vacinal. Foram feitos ensaios de imunização em camundongos C57BL/6 com estes peptídeos sintéticos e os animais foram posteriormente infectados com *T. gondii*. Foi observada redução significativa na mortalidade no grupo imunizado com a mistura de ambos os peptídeos. O grupo controle negativo, imunizado somente com BSA, apresentou a maior mortalidade e nas análises de produção de citocinas presentes nos soros destes animais observou-se uma predominância de citocinas pró-inflamatórias enquanto as citocinas anti-inflamatórias mostraram-se quase inexistentes no soro destes animais. Tendo em vista esses resultados, percebeu-se que o grupo com maior sobrevivência apresentou melhor balanço Th1/Th2. Isso demonstra que a imunização com epítomos reconhecidos tanto por células B quanto por células T parece ser mais efetiva. Assim, peptídeos miméticos de regiões da proteína GRA2 podem ser prováveis candidatos no desenvolvimento de vacinas anti Toxoplasmose.

Palavras chaves: Anticorpo monoclonal, epítomos, GRA2, *Toxoplasma gondii*.

Abstract

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular protozoan that belongs to the Apicomplexa phylum and causes toxoplasmosis which is especially severe in immunocompromised individuals and who acquired the infection by congenital transmission. Dense granules are organelles involved in this parasite invasion and replication of the parasite inside the cell. Among the proteins secreted by dense granules, jointly called GRAs, the GRA 2 is particularly immunogenic. In the present work, we aim to study the role of this protein in inducing adaptive immune response by produced and characterized a monoclonal antibody against GRA2. The parasite treated with this antibody showed the lowest rate of replication in intracellular proliferation assay compared to treatment with irrelevant antibody. The epitopes of this protein that binds to the monoclonal antibody have been mapped by *phage display*. Through bioinformatics analysis, epitopes for B cells and T GRA2 were predicted and based on that and on the results of phage display amino acid sequences were chosen to synthesize two peptides that were tested as potential vaccine. Immunization tests were carried out in C57BL/6 mice with synthetic peptides and these animals were subsequently infected with *T. gondii*. There was a significant reduction in mortality in the group immunized with the mixture of both peptides. The negative control group, immunized only with BSA, showed the highest mortality and analysis of cytokine present in the sera of these animals there was a predominance of proinflammatory cytokines while anti-inflammatory cytokines were shown to be almost nonexistent in the serum of these animals. Given these results, it was found that the group with higher survival showed better Th1/Th2 balance. This demonstrates that immunization with epitopes recognized by both B cells and T cells appear to be more effective. Thus, peptide mimetics GRA2 regions of the protein may be likely candidates for the development of vaccines against toxoplasmosis.

Keywords: Epitopes, GRA2, monoclonal antibody, *Toxoplasma gondii*.

1. Introdução

1.1 Toxoplasmose

A toxoplasmose é uma doença infecciosa causada por um protozoário do Filo Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório, denominado *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005). O parasito foi descoberto em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Splendore em coelho, no Brasil, e logo depois por Nicolle & Manceaux no gundi, um roedor do norte da África (REY, 2001). A designação do parasito é originada do nome desse roedor (*Cterodactylus gundi*) a partir do qual ele foi isolado. A palavra *toxon* significa arco em grego e faz referência à forma arqueada do organismo (BLACK ; BOOTHROYD, 2000).

A infecção com *T. gondii* ocorre no mundo inteiro, afetando mais de um terço da população mundial (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), mas sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (PETERSEN, 2007). A soroprevalência na Europa é alta, acima de 54% em países do sul europeu e de 5 a 10% no norte da Suécia e Noruega (EVENGARD *et al.*, 2001; JENUN *et al.*, 1998, PETERSEN *et al.*, 2007). Nos Estados Unidos é estimado que 1.075.242 pessoas sejam infectadas anualmente (JONES; HOLLAND, 2010; HILL; DUBEY, 2012). Variações na soroprevalência de *T. gondii* parecem ser correlacionadas a hábitos de alimentação e higiene de uma população (MONTROYA ; LIESENFELD, 2004). A infecção com *T. gondii* é comum na América do Sul e um estudo no Brasil encontrou que a soroprevalência é alta em populações com piores condições sócio-econômicas, provavelmente pela transmissão conduzida pela água (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; PETERSEN, 2007).

Clinicamente, infecções com *T. gondii* podem passar despercebidas ou podem causar sintomas e sinais que variam dependendo do estado imune do paciente (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Em humanos, a doença clínica é normalmente limitada à indivíduos imunocomprometidos ou à doença congênita resultante de infecção aguda na mulher grávida transmitida ao feto. Nas últimas duas décadas houve um significativo aumento no número de indivíduos

imunocomprometidos e então um concomitante aumento da toxoplasmose (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

A toxoplasmose é capaz de determinar nos indivíduos adultos um quadro agudo febril, com linfadenopatia, e, nas crianças, uma forma subaguda de encefalomielite e coriorretinite (REY, 2001).

As principais manifestações severas dessa doença envolvem o Sistema Nervoso Central (SNC) (CARRUTHERS, 2006). Danos no SNC por *T. gondii* são caracterizados por muitos focos de necrose ampliada e nódulos da microglia (LUFT *et al.*, 1993.; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Em casos de toxoplasmose congênita, a necrose cerebral é mais intensa no córtex e gânglios da base e às vezes em áreas periventriculares (FRENKEL, 1974; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

É desconhecido se a severidade da toxoplasmose em pessoas imunocompetentes se deve à linhagem do parasita, à variabilidade do hospedeiro ou a outros fatores (DUBEY *et al.*, 2007).

1.2 Ciclo de vida do parasito, transmissão e manifestações clínicas

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia. Parasitas pertencentes a esse filo têm uma estrutura celular polarizada característica, um citoesqueleto complexo e uma organização de organelas no ápice (DUBEY *et al.*, 1998; BLACK; BOOTHROYD, 2000). *T. gondii* é capaz de infectar e replicar dentro de praticamente todas as células nucleadas de mamíferos e aves (DUBEY, 1998; WONG *et al.*, 1993; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Seu ciclo de vida é dividido entre infecções em felinos e não felinos, que estão relacionadas com a replicação sexuada e assexuada desse parasito, respectivamente (BLACK; BOOTHROYD, 2000). O parasito pode se apresentar em diferentes formas: bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos.

A replicação do *T. gondii* acontece no intestino de felinos, hospedeiros definitivos deste parasito com mais frequência representados por gatos, caracterizando o ciclo sexual e resultando na produção de oocistos. Durante a infecção aguda alguns milhões de oocistos são eliminados nas fezes

dos gatos por 7 a 21 dias (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Após a maturação do oocisto (iniciado após ser excretado pelo gato), ele torna-se altamente infectante e sobrevive no ambiente por meses e possivelmente anos (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Qualquer animal homeotérmico que ingerir esses oocistos infecciosos se tornará um hospedeiro intermediário para o ciclo assexuado do parasito. Os esporozoítos que são liberados a partir dos oocistos irão infectar o epitélio intestinal e diferenciar-se no estágio de taquizoíto (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

O estágio de taquizoíto define a forma de crescimento rápido do parasito encontrada durante a fase aguda da infecção (BLACK ; BOOTHROYD, 2000). Os taquizoítos replicam dentro de uma célula por um tempo de procriação de 6 a 8 horas (*in vitro*) até romperem a célula e saírem para infectar células vizinhas, usualmente após 64 a 128 parasitos terem se acumulado na célula (RADKE; WHITE, 1998). Assim, depois de seguidas replicações, as células hospedeiras são rompidas e os taquizoítos são disseminados através da corrente sangüínea e infectam muitos tecidos, incluindo SNC, olhos, músculos cardíacos e esqueléticos e placenta. As formas taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e a destruição do tecido e, conseqüentemente, manifestações da doença. Os taquizoítos são transformados em bradizoítos mediante pressões da resposta imune para formar cistos (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos persistem dentro dos cistos durante a vida do hospedeiro. Eles são morfológicamente quase idênticos aos taquizoítos, mas multiplicam-se lentamente, expressam moléculas estágio-dependentes e são funcionalmente diferentes. Os cistos contêm centenas de milhares de bradizoítos e se formam dentro de células cerebrais, músculos cardíaco e esquelético dos hospedeiros (MONTROYA; LIESENFELD, 2004), o que caracteriza a fase crônica da infecção. Diante da ingestão desses cistos presentes em carne crua ou mal cozida de hospedeiros, os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do próximo hospedeiro susceptível e diferenciar-se novamente em estágio de taquizoíto para completar o ciclo assexuado. Se a ingestão desses cistos for pelo gato, os bradizoítos podem se diferenciar em estágios sexuais, completando assim totalmente seu ciclo de vida (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Na figura a seguir está esquematizada uma representação do ciclo de vida do *T. gondii*.

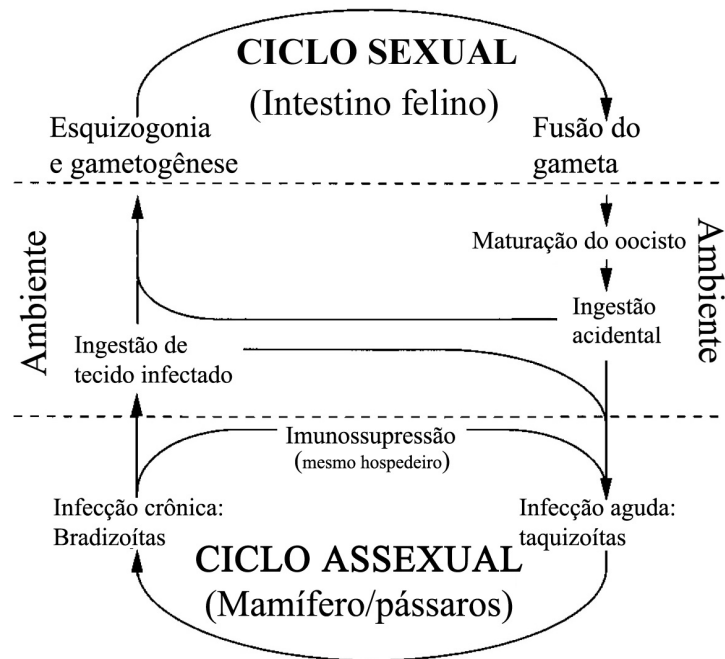


Figura 1: Diagrama do ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000.

Os três estágios infectantes no ciclo de vida do *T. gondii* são taquizoítos, bradizoítos contidos nos cistos teciduais e esporozoítos contidos em oocistos esporulados. Esses estágios podem infectar hospedeiros definitivos e intermediários por uma das três rotas: (A) horizontalmente pela ingestão oral de oocistos infectados do ambiente; (B) horizontalmente através da ingestão oral de cistos teciduais contidos em carne crua e mal cozida, vísceras de hospedeiros intermediários, produtos sanguíneos, tecidos transplantados ou leite não pasteurizado; ou (C) verticalmente por transmissão placentária de taquizoítos (TENTER *et al.*, 2000).

T. gondii pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário e vice-versa e também somente entre hospedeiros definitivos ou apenas entre hospedeiros intermediários. Deste modo, seu ciclo de vida pode continuar indefinidamente pela transmissão de cistos entre hospedeiros intermediários (na ausência de hospedeiros definitivos) ou pela transmissão de

oocistos entre hospedeiros definitivos (também na ausência de hospedeiros intermediários) (TENTER *et al.*, 2000).

A infecção primária por *T. gondii* adquirida por crianças e adultos (incluindo mulheres grávidas) imunocompetentes é assintomática na maioria dos indivíduos. Em cerca de 10%, causa uma doença autolimitada e não-específica e raramente necessita de tratamento (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Ocasionalmente, vários sintomas fracos podem ser observados, dos quais a linfadenopatia é a mais significativa manifestação clínica (DUBEY, 1988; BOWIE *et al.*, 1997; HO-YEN, 1992; TENTER *et al.*, 2000).

Infecção maternal antecedente à concepção normalmente exclui o risco da infecção fetal e da toxoplasmose congênita (REMYINGTON *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2007). A infecção maternal no primeiro e segundo trimestre de gestação gera menor risco de transmissão, mas resulta em toxoplasmose congênita grave e pode levar à morte do feto e abortos espontâneos. No entanto, a infecção maternal tardia (terceiro trimestre) usualmente resulta em neonatos de aparência normal e maior frequência de transmissão (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

O diagnóstico imediato e tratamento da infecção por *T. gondii* em gestantes pode prevenir a transmissão materno-fetal do parasito (NIELSE *et al.*, 2005; PETERSEN, 2007). Sinais da tríade clássica de toxoplasmose (retinocoroidite, calcificações intracraniana e hidrocefalia) manifestam-se em 10 % desses neonatos, enquanto os outros recém nascidos mostram uma variedade de sintomas, abrangendo o SNC e sintomas não específicos da fase aguda (retinocoroidite, convulsões, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, anemia, icterícia, linfadenopatia, etc.) (TENTER *et al.*, 2000).

Embora essas crianças possam parecer saudáveis ao nascimento, elas podem desenvolver sintomas clínicos e deficiências ao longo da vida (TENTER *et al.*, 2000). Essas deficiências afetam predominantemente os olhos (retinocoroidite, estrabismo e cegueira), o SNC (deficiências psicomotoras ou neurológicas, convulsões e retardo mental) ou os ouvidos (surdez) (REMYINGTON; DESMONTS, 1995; CHATTERTON, 1992; McLOAD e BOYER, 2000; TENTER *et al.*, 2000).

A toxoplasmose pode ser uma ameaça à vida de indivíduos imunocomprometidos (LIESENFELD *et al.*, 1999; MONTROYA; LIESENFELD,

2004). Nessas pessoas, a toxoplasmose aparece quase sempre como resultado da reativação da infecção crônica (PORTER; SANDE, 1992; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Em todo o mundo, *T. gondii* causa severa encefalite em mais de 40 % dos pacientes HIV positivos e entre 10 a 30% desses pacientes sucumbem à doença (LUFT, 1989; HO-YEN, 1992; AMAMASSARI *et al.*, 1996; TENTER *et al.*, 2000).

1.3 *Toxoplasma gondii*: morfologia e mecanismos de invasão

Dado o estilo de vida intracelular obrigatório, não é surpreendente que o *T. gondii* tenha uma soma de organelas secretórias reguladas. Essas incluem micronemas apicais (do grego “filamentos pequenos”) e roptrias (do grego “em forma de clava”) e grânulos densos (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

O citoesqueleto do *T. gondii* é um complexo arranjo de microtúbulos e outras estruturas macromoleculares que aparentemente estão envolvidos na integridade estrutural, na condução da secreção polarizada e na aptidão do parasito em deslizar e invadir sobre a superfície das células hospedeiras (FRIXIONE *et al.*, 1996; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Na região anterior da célula, dois anéis pré-conoidais circundam o cume de uma estrutura semelhante a um tubo, chamada conóide. Esta última estrutura está presente apenas nos coccídeos, subclasse do Filo Apicomplexa na qual *T. gondii* está incluso (SOUZA *et al.*, 2010). O conóide consiste de 14 elementos que se movem em forma de espiral em sentido anti-horário como percebido no pólo posterior (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Foi postulado que os microtúbulos funcionam como uma armação direcionando essas organelas a passar através do conóide e secretar seus conteúdos a partir da ponta apical (NICHOLS; CHIAPPINO, 1987; BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Localizadas tanto na porção anterior do parasito quanto no complexo da membrana interna, estão as proteínas com função mecânica actina e miosina. O complexo da membrana interna (CMI) consiste em vesículas de membrana lisa que se encontram abaixo da membrana plasmática. Essa estrutura trimembranosa (duas membranas do CMI e uma da membrana plasmática) é chamada de película e se localiza a partir dos anéis pré-conoidais na porção

anterior até a porção posterior final da célula (OGINO; YONDEDA, 1966; BLACK; BOOTHROYD, 2000). Há somente uma interrupção neste complexo, como observado na figura 2, que é o microporo posicionado no meio do corpo do parasito. Acredita-se que este poro é o local ativo de endocitose e vesículas são observadas nessa região (NICHOLS *et al.*, 1994; BLACK ; BOOTHROYD, 2000).

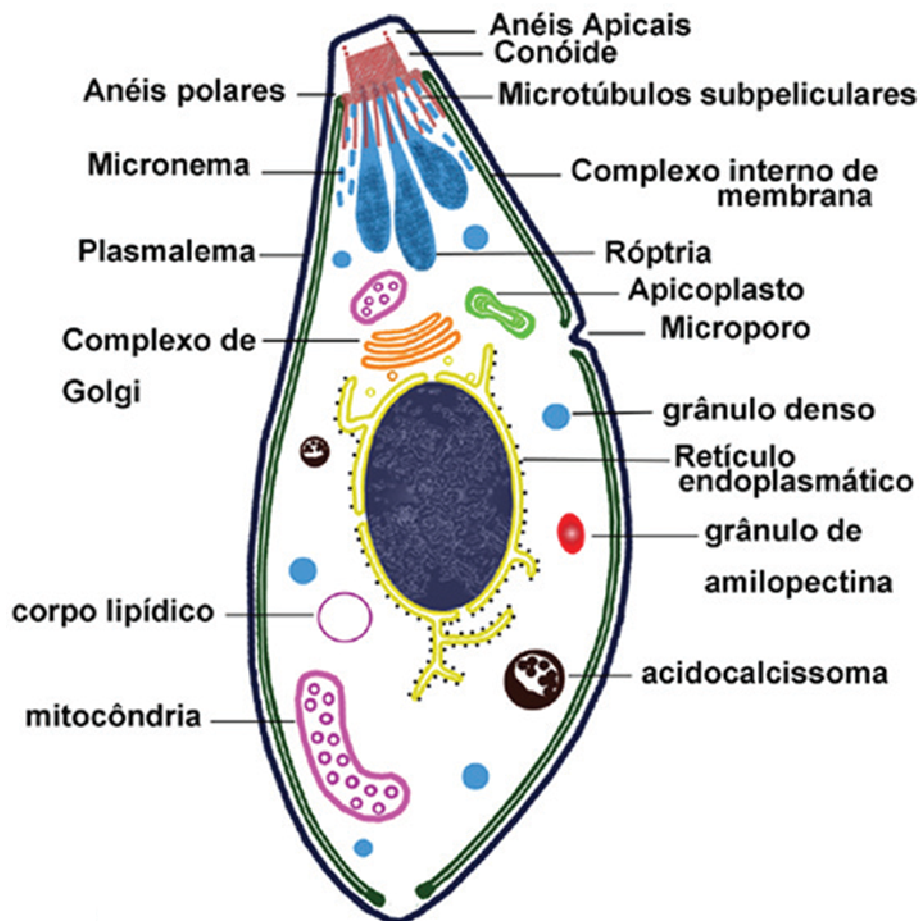


Figura 2: Morfologia e organelas de *T. gondii* em seu estágio taquizoítio segundo SOUZA *et al.*, 2010.

T. gondii usa a mobilidade de deslizamento para aproximar-se da célula do hospedeiro alvo e escorregar ao longo de sua superfície. A mobilidade de deslizamento é dirigida pelo sistema motor actina-miosina localizado dentro da

película do parasito (DOBROWOLSKI; SIBLEY, 1996; CARRUTHERS, 2006), o qual se conecta com o complexo da membrana interna (GASKINS *et al.*, 2004; CARRUTHERS, 2006) e proteínas transmembranas adesivas secretadas a partir dos micronemas (JEWETT; SIBLEY, 2003; CARRUTHERS, 2006).

A membrana plasmática desse parasito consiste predominantemente de uma variedade de proteínas que são ligadas à membrana por uma glicosilfosfatidilinositol (GPI). Uma família de proteínas relacionadas a antígenos de superfície (SAGs) constituem a maior parte dos componentes de superfície (BLACK; BOOTHROYD, 2000). A SAG1 é um importante ligante do parasito envolvido na invasão à célula hospedeira (MINEO; KASPER, 1994).

Ao encontrar um local satisfatório para a invasão, o parasito descarrega as secreções das organelas para mediar a entrada na célula do hospedeiro (CARRUTHERS; SIBLEY, 1997). Como um primeiro evento, o conteúdo dos micronemas congrega-se à superfície anterior do parasito e então liga-se aos receptores dos hospedeiros para mediar a fixação apical. Imediatamente após, os conteúdos das roptrias são expelidos através do ducto apical, possivelmente um processo em dois estágios, onde proteínas do pescoço da roptria (RON) aparecem primeiro, seguidas pelas proteínas do bulbo da roptria (ROP) (ALEXANDER *et al.*, 2005; LEBRUN *et al.*, 2005; CARRUTHERS, 2006).

Concomitante ao processo de invasão há a invaginação da membrana plasmática do hospedeiro para a criação do vacúolo parasitóforo (VP). O parasito quando entra na célula se localiza dentro do vacúolo parasitóforo e por isso fica protegido da degradação intracelular (CARRUTHERS; BOOTHROYD, 2007). O vacúolo tem características não fusogênicas, evitando a fusão com os elementos da via endo e exocítica da célula hospedeira e por isso escapa de uma fusão com os lisossomos (MORDUE *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2010). Moléculas de até 1300 Da têm livre passagem entre o citoplasma da célula hospedeira e a matriz do vacúolo parasitóforo (SCHWAB; BECKERS; JOINER, 1994). Uma das mais intrigantes propriedades do VP de *T. gondii* é a presença de uma rede de nanotubos membranosos, designada rede nanotubular membranosa ou rede intravacuolar (TRAVIER, 2008). Embora a função dessa rede não esteja totalmente esclarecida, acredita-se que ela participa do desenvolvimento

intracelular do parasito por aumentar a superfície de troca entre parasitos e células hospedeiras (COPPENS *et al.*, 2006).

Imediatamente após a invasão, o parasito secreta inúmeras proteínas de vesículas eletrodensas denominadas grânulos denso (MERCIER *et al.*, 2005).

1.4 Proteínas de grânulos densos (GRAs)

A estratégia de desenvolvimento do *Toxoplasma* dentro do VP deve ser correlacionada à expressão de uma família de proteínas específicas (as GRA). Estas coordenam a formação do vacúolo, incluindo as estruturas intravacuolares e contribuem para transformar esse novo espaço em um compartimento metabolicamente ativo e apto a adquirir nutrientes da célula hospedeira (MERCIER *et al.*, 2005).

Os grânulos densos são organelas esféricas, distribuídas por todo o corpo do parasito, têm diâmetro médio de 0,2 μm e secretam seu conteúdo majoritariamente na fase intracelular do ciclo (SOUZA *et al.*, 2010). As proteínas localizadas em grânulos densos foram denominadas GRA por Sibley e colaboradores em 1991. Uma vez secretadas, as GRAs são encontradas na membrana do vacúolo parasitóforo e na rede intravacuolar (MERCIER *et al.*, 2005). Enquanto GRA3, GRA5, GRA7 e GRA8 são incorporadas à membrana do VP, GRA2, GRA4 e GRA6 formam um complexo que interage e estabiliza as membranas da rede intravacuolar (MERCIER *et al.*, 2005; CESBRON-DELAUW *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2010).

As proteínas do grânulo denso são encontradas na superfície do vacúolo de taquizoitos e também na parede de cistos e em menor quantidade na superfície de bradizoitos (XUE *et al.*, 2008). Dentre as proteínas do grânulo denso, a GRA2 é particularmente imunogênica durante a infecção, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (XUE *et al.*, 2008).

A GRA2 apresenta resíduos de serina e treonina, o que deve indicar O-glicosilação. O domínio helical interno possui duas α -hélices anfipáticas que devem estar envolvidas na associação da GRA2 com a rede membranosa dentro do PV. Posteriormente à invasão, a GRA2 é secretada dentro de vesículas liberadas a partir da invaginação especializada do parasito. Essas vesículas

multilamelares se reúnem para formar a rede intravacuolar, a qual contém uma forma integral de membrana de GRA2 (NAM, 2009).

Pesquisas sugerem que a GRA2 de *T. gondii* pode ser digna de ser incluída em uma vacina contra toxoplasmose (ELLIS *et al.*, 2000). Além disso, linhagens de *Toxoplasma knockout* para GRA2 mostraram apresentar redução na virulência comparado ao organismo selvagem (MERCIER *et al.*, 1998).

1.5 Resposta imune

A resposta imune à infecção por *Toxoplasma gondii* é complexa e compartimentada. Esse parasito tem a capacidade de se propagar em todos os tecidos e cada compartimento tecidual tem sua própria resposta imune específica, particularmente o Sistema Nervoso Central e a placenta. Os macrófagos, linfócitos T; células NK e as citocinas são os principais elementos envolvidos na resposta imune de indivíduos imunocompetentes. Anticorpos desempenham papéis secundários, mas permanecem essenciais no diagnóstico da toxoplasmose em humanos (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

T. gondii é capaz de disparar a ativação não específica de macrófagos e células Natural Killer (NK) (HAUSER *et al.*, 1983) juntamente com outras células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas. Esta ativação pretende limitar a proliferação do parasito por ação citotóxica direta ou indireta e disparar uma resposta imune específica devido à apresentação de antígenos de *Toxoplasma* (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). O sucesso da infecção por *T. gondii* depende do equilíbrio entre a resposta do hospedeiro, que visa eliminar o parasito, e estratégias de evasão e imunomodulação do parasito. Assim, o sistema imune possui o desafio de controlar a infecção e ao mesmo tempo minimizar os danos teciduais causados por processos imunopatológicos (MILLER *et al.*, 2009). A presença de citocinas anti-inflamatórias assumem dessa forma importante papel na diminuição da resposta inflamatória à infecção por *T. gondii* (MILLER *et al.*, 2009; POLLARD; KNOLL; MORDUE, 2009).

A inibição da replicação do *Toxoplasma* ou sua destruição são resultados de vários mecanismos efetores: a) mecanismos oxidativos (MURRAY; COHN,

1979; HUGHES, 1998); b) mecanismos não-oxidativos, representados principalmente pela produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN- γ (DRAPIER *et al.*, 1988; ADAMS *et al.*, 1990), com NO envolvido também durante a fase crônica na inibição da proliferação intracerebral do parasito (SCHUTLER, 1999); c) mecanismos não-dependentes de oxigênio podem também ser toxoplasmicida, como a indução por IFN- γ da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase, a qual degrada o triptofano requerido para o crescimento do parasito (PFEFFERKORN *et al.*, 1986).

As células efectoras exercem suas funções via atividade citotóxica e/ou secreção de citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (HUNTER *et al.*, 1994). Linfócitos T CD 8⁺ e CD 4⁺ são os principais agentes envolvidos na resistência do hospedeiro à infecção por *T. gondii* (SUZUKI; REMINGTON, 1988). Em camundongos, linfócitos T maduros são divididos em duas subpopulações: Th1 e Th2. Esta distinção é baseada na relação de citocinas secretadas após a estimulação, como reportado por Mossman em 1986 (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). A resistência é relatada à resposta Tipo 1 promovida por IFN- γ e IL-12 produzidos após ativação das células NK e macrófagos (SHARMA *et al.*, 1985; SUZUKI *et al.*, 1988; GAZZINELLI *et al.*, 1993; FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

Um refinado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, entre as quais IL-12 e IL-10 respectivamente, é essencial para o controle da infecção por *Toxoplasma* (ALDEBERT *et al.*, 2007)

O controle da infecção por *T. gondii* é complexo e depende das bases genéticas do hospedeiro, seu estado imune e também fatores inerentes ao parasito, incluindo virulência (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004).

1.6 Anticorpos monoclonais e mapeamento de epítomos

A caracterização imunoquímica de anticorpos monoclonais contra proteínas de *T. gondii* pode ser valiosa para descoberta de epítomos que induzem a resposta imune durante a infecção podendo levar ao desenvolvimento de novos imunoenaios que determinem os perfis sorológicos na toxoplasmose (CUNHA-JUNIOR *et al.*, 2010). O potencial desses epítomos vai além de diagnóstico, já

que podem ser aplicados, dentre outros, em estratégias de imunização. Liu e colaboradores mostraram que a vacinação com epítomos pode exercer efeito protetor e ser uma estratégia em potencial para o controle da toxoplasmose (LIU *et al.*, 2009). A superfície de taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii* é coberta com antígenos ancorados com glicosilfosfatidilinositol (GPI), a maioria das quais são membros de famílias de antígenos de superfície (SAGs) (LEKUTIS, FERGUSON, BOOTHROYD, 2000). Os genes que codificam três dessas proteínas p30 (SAG1), p22 (SAG2A) e p43 (SAG3) foram identificados usando anticorpos monoclonais antígeno-específicos (LEKUTIS *et al.*, 2001)

A produção de um anticorpo monoclonal consiste de quatro passos: imunização do animal, geralmente camundongos, obtenção de células B do baço de animais imunizados, fusão das células esplênicas com células de mieloma para obtenção do hibridoma e seleção da célula que produz o anticorpo monoclonal desejado (NAKAZAWA *et al.*, 2010).

Atualmente, terapias baseadas na utilização de anticorpos monoclonais representam uma das mais promissoras áreas da indústria farmacêutica. Os anticorpos têm se mostrado um excelente paradigma na busca de moléculas altamente específicas a seus alvos protéicos desempenhando um papel central nas pesquisas pós-genômica (HUST;DUBEL, 2004; HOLLIGER; HUDSON, 2005).

A expressão da enzima de restrição *Eco* RI por meio da fusão com a proteína três (pIII) de um bacteriófago realizada por Smith em 1985 introduziu a metodologia denominada *phage display*, a qual tem por base a expressão de peptídeos ou proteínas no exterior da partícula viral, enquanto o material genético codificante permanece em seu genoma (SMITH; PETRENKO, 1997; AZZAZY; HICHSMITH, 2002).

Tipicamente, utilizam-se os vírus filamentosos bacteriófagos da família Inoviridae (M13, fd, f1) (SIDHU, 2001) que parasitam bactérias Gram-negativas e que, necessariamente, apresentam pilus F. Frequentemente são utilizadas bactérias *Escherichia coli* do gênero masculino usando o pilus sexual como receptor (BENHAR, 2001).

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

A partícula de fago é formada por uma fita simples de DNA envolta por uma capa proteica constituída por cinco proteínas (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX). Destas cinco proteínas, existem aproximadamente 2800 cópias da pVIII e cinco cópias da pIII. Neste sistema, o gene codificador do peptídeo ou proteína de interesse é geralmente fusionado a um dos genes destas duas proteínas do capsídeo. Assim, o peptídeo é expresso na extremidade N-terminal da pIII ou pVIII, capaz de reconhecer moléculas alvos presentes nos mais diversos substratos (SMITH;PETRENKO, 1997). A expressão do produto do gene fusionado e sua subsequente incorporação à proteína capsidial já madura resulta na exposição do ligante na superfície do fago, enquanto seu material genético permanece no interior desse. As novas partículas de fago são montadas no espaço periplasmático da bactéria (BENHAR, 2001).

Epítomos ou determinantes antigênicos (regiões de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos), também podem ser identificados através desta metodologia de apresentação de peptídeos em fagos, a qual tem sido extremamente importante para a identificação e caracterização de novos ligantes de alta afinidade e seus receptores de uma infinidade de enfermidades, incluindo câncer, doenças infecciosas, cardiovasculares e auto-imunes (STEPHEN; HELMINEN; LANE, 1995).

A técnica de *phage display* pode gerar biomarcadores específicos para auxiliar no diagnóstico, prevenção e no tratamento individualizado de diversas patologias, inclusive a toxoplasmose.

Neste trabalho , a técnica de phage display foi utilizada como auxiliar na identificação de novos epítomos de proteínas de grânulo denso GRA2 que possam servir como ferramentas de diagnóstico, prevenção e tratamento da toxoplasmose.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar, no contexto de interação entre o parasito e seu hospedeiro, a proteína de Grânulo Denso 2 (GRA2) de *Toxoplasma gondii*, quanto as características biológicas de sua constituição de aminoácidos, bem como sua relevância para indução de respostas imunológicas adaptativas.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir e selecionar clone de hibridoma secretor de anticorpos monoclonais contra a proteína GRA2 de *T. gondii*, a partir de um banco de hibridomas;
- Determinar o epítipo reconhecido pelo clone de hibridoma produtor do anticorpo monoclonal selecionado, por meio da técnica de *phage display*;
- Localizar o epítipo de GRA2 de *T. gondii* reconhecido pelo clone selecionado, a partir da estrutura tridimensional deste componente parasitário, por meio de análise de bioinformática;
- Produzir mimetopos sintéticos de GRA2, a partir das análises realizadas;
- Avaliar, *in vivo*, o potencial dos mimetopos identificados na profilaxia da infecção aguda e crônica por *T. gondii*.

3. Materiais e métodos

3.1 Manutenção e obtenção de parasitos

Taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH foram mantidos pela inoculação intraperitoneal em camundongos Balb/c, através de passagens seriadas em intervalos de 48 horas de um inoculo de aproximadamente 1.10^6 taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos anteriormente infectados (MINEO, CAMARGO, FERREIRA, 1980). Para obtenção do exsudato peritoneal foram realizadas lavagens da cavidade abdominal do animal com solução salina estéril tamponada com fostato a 0,01 M (PBS, pH 7.2). Em seguida, as suspensões parasitárias foram centrifugadas a 45g por 1 minuto a 4°C para remoção dos debris celulares. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sedimento enriquecido em parasitos foi lavado por mais duas vezes com PBS a 1000 x g por 10 minutos a 4 °C. O pellet resultante foi armazenado a -20°C para posterior preparação de antígenos solúveis de *T. gondii*.

3.2 Preparo de antígenos solúveis

Antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) foram preparados de acordo com os métodos já descritos por Silva et al. (2002). Suspensões de parasitos foram diluídas em PBS e suplementadas com inibidor de protease Complete Mini (Roche) e submetidas a dez ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C seguido por dez ciclos de sonicação (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante 5 minutos a 60 Hz em banho de gelo. Após este tratamento os parasitos lisados foram submetidos à centrifugação a 10.000 x g, por 30 minutos a 4°C onde o sobrenadante resultante foi coletado e a concentração proteica quantificada utilizando o método de dosagem por Bradford. Alíquotas de antígenos solúveis de *T. gondii* da cepa RH (STAg) foram armazenados a -20 °C, até serem utilizados nos ensaios de imunização.

3.3 Produção de anticorpos monoclonais

Taquizoitos de *T. gondii* (RH) foram coletados de exsudato peritonial e parcialmente purificados como descrito acima, fixados com acetona 30% em PBS por 4 °C durante 72 horas. Após a fixação, os parasitos foram lavados em solução PBS e utilizados para imunização de camundongos BALB/c. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal utilizando um volume de 100 µL de uma suspensão de 1×10^7 parasitos ml^{-1} em intervalos regulares de 15 dias em três inoculações sucessivas. Sete dias antes da realização do processo de fusão, os animais foram inoculados com a mesma concentração de parasitos, porém por via endovenosa. A produção dos hibridomas foi conduzida como previamente descrito por (KÖHLER; MILSTEIN, 1975) com pequenas modificações.

Após o término do esquema de imunização, os baços dos animais foram coletados em meio DMEM sem soro fetal bovino e em ambiente estéril e misturados à suspensão de células de mieloma murino SP2O/Ag14 na proporção de 1:1. A seguir, as populações mistas de células foram centrifugadas a $1.000 \times g$ por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao sedimento adicionou-se lentamente polietilenoglicol 1500 na concentração de 50%, sob agitação constante a 37 °C durante um minuto, quando então completou-se o volume para 50 ml em DMEM sem soro fetal bovino. As células foram lavadas por duas vezes e semeadas em meio HAT/HT (Sigma Chemical Co.) contendo 20% de soro fetal bovino para a seleção das células fusionadas (hibridomas) por período de 21 dias.

Hibridomas secretando anticorpos foram selecionados por ELISA indireto e clonados por diluição limitante em placas de 96 orifícios. Os hibridomas clonados foram amplificados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, glutamina 2 mM, 2-β-mercaptoetanol 50 µM e getamicina 40 µg/ml e estocados em N₂ líquido. A purificação de anticorpo monoclonal (mAb) C3C5 foi realizada por meio de cromatografia em coluna por afinidade utilizando proteína G-sepharose. Para a preparação do aplicado, sobrenadante de cultura de hibridoma foi diluído em tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0. Em seguida, componentes que não se ligaram na coluna (*void*) foram coletados e a coluna lavada com tampão Fosfato 0,1 M pH 8,0. A coluna sepharose foi eluída com tampão Glicina 0,1 M pH 2,0 e o pH das frações foi neutralizado com Tris-base. Amostras

representativas da purificação foram aplicadas em gel SDSPAGE objetivando analisar o perfil eletroforético da purificação.

3.4 Eletroforese unidimensional

Os antígenos de *T. gondii*, bem como o anticorpo monoclonal C3C5 purificado foram avaliados em sistema unidimensional utilizando tampão descontínuo como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970) e sistema de placas de vidro descrito por Studier (STUDIER, 1973). Os géis de poliacrilamida nas concentrações de 12% e 8% para avaliação de antígenos de *T. gondii* e C3C5, respectivamente, foram montados em placas do sistema de eletroforese SE250 (Amersham-Pharmacia Biothec, UK) de dimensões 8 x 10 x 0,075 cm. Antígenos de *T. gondii* foram submetidos a 95°C por 5 minutos e aplicadas ao gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram separadas por eletroforese utilizando uma corrente de 20 mA. Após a corrida, os géis foram corados com solução de coomassie (Coomassie brilliant blue R-250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%) e mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens.

Adicionalmente, para melhor visualização do perfil eletroforético de algumas amostras, realizou-se a coloração por prata. Assim, após corrida eletroforética, géis foram adicionados em solução fixadora (60 mL ácido acético, 250 mL metanol, 250 µL de formaldeído, q.s.p. 500 mL H₂O) por 18 horas à temperatura ambiente. Após processo de fixação, os géis foram desidratados em solução etanol 50% seguido de pré-tratamento em tiosulfato de sódio sob agitação. Posteriormente os géis foram incubados com solução de nitrato de prata (Nitrato de Prata 0,1 g, 50 µL de formaldeído, q.s.p. 50 mL) por 20 minutos em câmara escura seguido de revelação com solução reveladora (Carbonato de Sódio 3 g; 25 µl de formaldeído; tiosulfato de sodio, H₂O 50 ml).

3.5 Immunoblotting

Os antígenos separados em SDS-PAGE foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito por TOWBIN e colaboradores (1979).

Para o immunoblotting, membranas de nitrocelulose cortadas em tiras de 3-4 mm foram bloqueadas com solução PBS-Tween 0,05 % suplementada com leite desnatado 5% durante 1 hora e a 37 °C. Terminado este tempo, as membranas foram incubadas com os sobrenadantes de cultura do hibridoma e soro policlonal de camundongo de interesse por período de 1 hora a 37 °C. Para detecção da ligação dos anticorpos aos antígenos mobilizados em nitrocelulose realizou-se subsequente incubação das membranas com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongos conjugado à peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.) por 2 horas. Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas em PBS-Tween 0,05% e reveladas por meio da adição de substrato enzimático (H₂O₂) e cromógeno em tabletes de 3, 3'-diaminobenzidina (Sigma Fast™; Sigma Chemical Co.), como descrito pelo fabricante.

3.6 Isotipagem do anticorpo monoclonal C3C5

Foi realizada a isotipagem do anticorpo monoclonal C3C5 com o uso de Kit de isotipagem de anticorpos monoclonais comercial (IsoQuick™, Sigma-Aldrich). O procedimento foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

3.7 Ensaio de proliferação com *T. gondii* 2F1

Taquizoítas da cepa 2F1 de *T. gondii* são derivados da cepa RH e expressam o gene da enzima β galactosidase. Esses parasitos foram gentilmente cedidos pelo Professor Dr. Vern B. Carruthers da Escola de Medicina da Universidade de Michigan, EUA. Foram plaqueadas 1×10^4 células de HeLa por poço de 200 μ L com meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino em placa de 96 poços de fundo em U. Essa placa foi incubada em estufa umedecida, 37° C, 5% de CO₂ por 3 horas para que as células aderissem ao fundo da placa. O sobrenadante de cultura contendo *T. gondii* 2F1 foi coletado e centrifugado a

500 g por 10 min. O sobrenadante da centrifugação foi coletado e novamente centrifugado a 500 g por 10 min. O pellet contendo os parasitos foi ressuspendido em 5 mL de meio de cultura. Foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer. Os parasitos foram incubados por 1 h com diferentes concentrações de anticorpo monoclonal C3C5. Partiu-se da concentração de 100 µg/mL e foi realizada uma diluição seriada até a concentração de 1,5 µg/mL. Plaqueou-se 1×10^4 parasito por poço, ou seja, um parasito por célula. A placa foi incubada em estufa umedecida, 37° C, 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período foi realizada a centrifugação da placa a 250 g por 5 min a 4° C. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL do tampão de lise gelado em cada poço da placa. Essa placa foi incubada por 15 min à temperatura ambiente. Após esse período o tampão de ensaio foi adicionado na quantidade de 160 µL por poço. Por fim, foram adicionados 40 µL de CPRG (Clorofenol Vermelho de β-D-galactopiranosídeo, Roche) na concentração de 3 mM. A placa foi mantida por 30 min à temperatura ambiente em câmara escura e após esse período foi efetuada a leitura da atividade enzimática da β-galactosidase em 590 nm, segundo TEO et al, 2007.

3.8 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A reação de imunofluorescência indireta foi realizada para imunolocalização da proteína marcada por anticorpo monoclonal C3C5 frente a formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii*. Lâminas contendo taquizoítas formalizados de *T. gondii* foram submetidas a uma etapa de permeabilização da membrana externa, incubando-as com uma solução de PBS acrescido de Triton X-100 a 0,1% durante 10 min a temperatura ambiente. Ao término da incubação, as lâminas foram lavadas com PBS, adicionadas do anticorpo monoclonal C3C5, e soro de camundongo positivo para *T. gondii* e soro negativo para *T. gondii*, os quais serviram de controle para as reações. As mesmas amostras foram aplicadas em lâmina contendo taquizoítas formalizados de *T. gondii* sem passar pela etapa de permeabilização da membrana externa com Triton X-100. Após aplicação das amostras, as lâminas foram incubadas em câmara úmida durante 30 min a 37°C. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e

secas a temperatura ambiente para adição de anticorpos IgG de coelho anti-IgG de camundongos marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), como conjugado enzimático, na diluição 1:50. Após incubação de 30 min a 37° C em câmara úmida, as lâminas foram lavadas, montadas em glicerina tamponada pH 8,5 e observadas em microscópio confocal (LM 510 Meta, Zeiss, Germany).

3.9 Eletroforese bidimensional

Para as análises em gel bidimensional, 160µg do Antígeno total de *T. gondii* (STAg) foram ressuspensos em 20µL tampão de rehidratação contendo 8M de uréia; 2% (w/v) de CHAPS e 0,002% (w/v) de Azul de Bromofenol 1%, acrescidos de 0,5% (v/v) de anfólitos - IPG Buffer 3-10 (GE Healthcare). A rehidratação de duas tiras (um gel para corar e outro para transferir para a membrana) foi realizada durante 14 horas em temperatura ambiente e em aparato apropriado (Strip Holder – GE Healthcare). Foram utilizadas tiras de poliacrilamida (Immobiline DryStrip) de 7 cm de comprimento com gradiente de pH imobilizado com faixa de variação de 3-10 (GE Healthcare). Após a rehidratação, as tiras foram submetidas a IEF no sistema IPGphor III (GE Healthcare), em um programa com acúmulo total de 20933 V/h. As tiras focalizadas foram equilibradas em apenas uma fase por 15 minutos em 5 mL de solução de equilíbrio (1,5M Tris-HCl pH 8,8; 6M Uréia; 30% Glicerol; 2% w/v SDS; 0,002% Azul de Bromofenol 1% w/v) acrescida de 25 mg/mL de iodocetomida (Sigma). A primeira fase de equilíbrio das tiras, comumente realizada, foi excluída devido à utilização de 10 mg/mL de DTT. As tiras foram submetidas, posteriormente, a eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% (14x16 cm). Cada gel foi submetido à uma corrente elétrica de 15 mA durante 30 min e em seguida de 45 mA por aproximadamente 4 horas. O padrão de peso molecular utilizado foi o SDS 7B2 (Sigma-Aldrich). Um dos géis foi, primeiramente, fixado em 10% de ácido acético e 40% de etanol por 30 min e posteriormente corado com Coomassie Blue coloidal *overnight*. No dia seguinte, foi descorado em água destilada e digitalizado.

O outro gel foi utilizado para transferência para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (*Hybond*, GE Healthcare) em sistema *semidry* (TE 77 PWR - GE Healthcare), sob uma corrente de 180 mA por 2 horas, de acordo com as

recomendações do fabricante. O sucesso da transferência foi confirmado por coloração da membrana com *Ponceau* e em seguida procedeu-se o ensaio de *Western blotting*. Para identificar as proteínas correspondentes aos anticorpos produzidos, após a transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em PBS-T 0,05% por 2 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 6 vezes de 5 min em PBS-T 0,05% e incubada na solução contendo o anticorpo C3C5 (concentrado) *overnight* em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada 6 vezes de 5 min em PBS-T 0,05%. Após lavagem, a membrana foi incubada por 4 h com anticorpos secundários (anti mouse IgG) conjugados com HRP (*Horseradish peroxidase*) em PBS-T 0,05% acrescido de 1% de leite em pó desnatado, em diluição de 1:1000. Após lavagem (6X de 5 min em PBS-T 0,05%), as proteínas foram detectadas por quimioluminescência (ECL, GE Biosciences Amersham, Piscataway, USA) e a leitura realizada em fotodocumentador ChemiDoc™ MP System 170-8280 (Bio-Rad Laboratories, New York, USA). Os *spots* reconhecidos foram excisados do gel e enviados para análise por espectrometria de massa.

3.10 Sequenciamento da proteína GRA 2 por espectrometria de massa

A identificação da proteína alvo por espectrometria de massa foi realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz em Ilhéus, Bahia. O sequenciamento foi realizado como descrito anteriormente por Schevchenko e colaboradores (1996). Os *spots* de interesse foram excisados manualmente a partir do gel 2D previamente coradas com Coomassie. Eles foram lavados com bicarbonato de amônio 25 mM e 50% de Acetonitrila (ACN), secou-se por centrifugação a vácuo e, subsequentemente, tratou-se com 5-7 µg / mL de tripsina (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O resultante da digestão por tripsina foi concentrado sob vácuo, dessalinizado utilizando uma coluna C18 (180 µm de diâmetro interno x 20 mm de comprimento, 5 µm de partículas), e, em seguida, fracionado por uma coluna de cromatografia de fase reversa C18 (100 mm x 100 µm, 1,7 µm) no nano ACQUITY UPLC (Waters, Mildford, MA, EUA). O fluxo usado foi de 0,6 utilizado

μL / minuto com 50min/corrida, onde foram recolhidas 4 ml de cada amostra. Os peptídeos foram separados por diferença de gradiente água / ACN (1% durante 1 min, 1-50% ao longo de 40 min, e 50-85% durante 5 min). Os peptídeos separados foram ionizados em capilar sob tensão de 3000 V (Micromass Q-ToF MicroTM), fragmentados no modo íon positivo, com a seleção da intensidade relativa de pelo menos 10 contagens, e analisadas os três íons mais intensos (scan / s) com a energia de colisão variando entre 20 e 95 eV de acordo com massa / carga (m / z) de peptídeos. Os espectros foram analisados pelo servidor Protein Lynx Global Server (PLGS) 4.2 (Waters, Mildford, MA, USA) e os resultados interpretados no NCBI (National Center for Biotechnology Information).

3.11 *Biopanning* (seleção de fagos) de peptídeos

Foram utilizadas 10μL (1×10^{11} partículas virais) de uma biblioteca randômica de peptídeos fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da NEW ENGLAND BioLabsRInc.), diluída em 190uL de TBS-Tween 0,1% para a seleção de ligantes de anticorpo monoclonal C3C5. A biblioteca é composta por 7 aminoácidos randômicos expressos na região da pIII do bacteriófagos, os quais são flanqueados por um par de resíduos de cisteína, que quando oxidados durante a montagem do fago formam uma ligação dissulfeto (BARBAS et al., 2001), Para esta seleção, a biblioteca de comercial de fagos foi colocada em um poço de uma microplaca sensibilizado com 1 μg do anticorpo monoclonal C3C5 purificado, após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o poço lavado 10 vezes com TBS-Tween 0,1%. Os fagos selecionados foram eluídos com 100uL de glicina pH 2,0 e neutralizada com 15uL de Tris pH 9. Esses passos foram repetidos 3 vezes, conforme protocolo de Barbas e colaboradores, 2001.

Após a seleção, a amplificação dos fagos foi feita pela inoculação de um meio Luria Bertani (LB- Triptona 10g/L, extrato de levedura 5g/L, NaCl 10g/L), contendo tetraciclina, com uma colônia isolada de *Escherichia coli* da linhagem ER2738. O meio foi incubado sob agitação a 37 °C até a fase *early-log* (OD 600 ~ 0,3). Ao atingir esta fase, a cultura bacteriana foi inoculada com 500uL do eluato

dos fagos e incubados a 37°C por 4-5 horas sob forte agitação. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 4°C a 10000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo esterilizado contendo uma solução de PEG/NaCl (20% de Polietilenoglicol 8000 e 2,5 M de NaCl – solução estéril) na quantidade de 1/6 do volume do sobrenadante. A solução foi incubada por 12-16 horas a 4°C para a precipitação do fago e posteriormente, centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos a 4°C para descartar o sobrenadante. O precipitado foi, então, suspenso em 1mL de TBS e reprecipitado com 1/6 do volume de PEG/NaCl, por 1 hora no gelo. Centrifugou-se a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de TBS a 0.02% de NaN₃, obtendo-se então o eluato amplificado, posteriormente titulado e armazenado a 4°C. A estrigência das lavagens durante o *biopanning* variou de 0,1 a 1% em cada ciclo.

3.11.1 Titulações

A titulação é um procedimento utilizado para determinar a quantidade de partículas virais durante entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*. A solução de fagos foi submetida a diluições seriadas crescentes exponenciais sob log₁₀ em meio LB. Para eluato não amplificado foram utilizadas as diluições de 10⁻¹ até 10⁻⁴ e no caso das soluções com eluato amplificado a faixa de diluição utilizada foi entre 10⁻⁸ e 10⁻¹¹. Para cada diluição acrescentou-se 200µL da cultura de ER2738 na fase mid-log (densidade óptica 600nm ~0,5) e a solução foi agitada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. As células bacterianas, agora infectadas, foram transferidas para tubos de cultura contendo 3mL de Agar-Top a 45°C e espalhadas sobre uma placa de Petri contendo meio LB sólido, com IPTG/Xgal e tetraciclina. As placas foram incubadas a 37°C, durante 16 horas e após este período, as colônias formadas nas placas de lise foram contadas e quantificadas, multiplicando-se cada valor obtido nas placas LB sólido pelo fator de diluição com intuito de obter o título dos fagos.

3.11.2 Extração de DNA de Fagos

As colônias oriundas das placas tituladas do *biopanning* foram isoladas e transferidas para poços de placas de cultura (tipo deepwell) com 96 orifícios, contendo 1,2mL de cultura de ER2738 em fase *early-log* (OD 600 ~ 0,3) para a extração do DNA dos fagos. A placa foi vedada com um adesivo perfurado e incubada a 37°C, por 24 horas, sob agitação (250rpm). Para isolar os fagos das bactérias, as placas foram centrifugadas a 3700rpm, a 20°C, durante 30 minutos. Então, 800µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa e incubados, por 10 minutos, com 350µL de PEG/NaCl. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada a 3700 rpm, a 20°C, durante 40 minutos para precipitação dos fagos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100µL de tampão iodeto (10mM de Tris-HCl pH 8,0, 1mM de EDTA e 4M de NaI) foram adicionados aos fagos precipitados. As placas foram agitadas vigorosamente por 40 segundos e 250µL de etanol absoluto foi acrescentado. Após uma incubação de 10 minutos, a temperatura ambiente, as placas foram centrifugadas (3700rpm, 20°C, 10 minutos) e o sobrenadante descartado. O DNA dos fagos foi lavado com 500µL de etanol 70% e recentrifugado nas mesmas condições. Finalmente, o DNA precipitado remanescente foi diluído em 20µl de água Milli-Q. A qualidade do DNA fita simples foi verificada pela corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com solução de brometo de etídeo.

3.12 Sequenciamento do DNA

Na reação de sequenciamento foram utilizados 200ng de DNA molde, 5pmol do primer -96 gIII (5'-OH CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' - Biolabs) e Premix (DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A reação de 35 ciclos foi realizada em um termociclador de placas (MasterCycler-Eppendorf) nas seguintes condições: desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do primer (a 50°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto). A precipitação do DNA seqüenciado foi

feito com 1µL de acetato de amônio e 27,5µL etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700rpm e o sobrenadante descartado.

Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700rpm. A solução de etanol foi descartada, a placa permaneceu invertida sobre um papel toalha e nesta posição foi pulsada a 800rpm, durante um segundo. A placa foi coberta por papel alumínio e permaneceu em repouso durante 5 minutos para evaporar o etanol remanescente. Os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (DYEnamic ETDye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences). A leitura do seqüenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences). A análise das seqüências de DNA provenientes do seqüenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15). Logo após esta pré-análise, as seqüências dos vetores foram retiradas e somente aqueles insertos com resíduos perfeitos foram traduzidos.

3.13 Análises de Bioinformática

Após o sequenciamento, as seqüências de DNA foram traduzidas pelo programa Expasy. Este programa é designado para tradução de seqüências de insertos tanto de bibliotecas da New England Biolabs (Ph.D.-12TM ou Ph.D.-C7CTM) quanto de outras bibliotecas de interesse que contiverem as seqüências inicial e final do vetor, no caso o bacteriófago M13. O programa automaticamente localiza a posição do inserto, traduz o mesmo e indica qualquer erro possível na seqüência, tais como códons inesperados ou erros na seqüência próxima (<http://relic.bio.anl.gov/dna2pro12.aspx>).

O alinhamento dos peptídeos selecionados foi testado utilizando os programas CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html/>). A seqüência da proteína GRA2 de *T. gondii* foi também inserida no CLUSTAL W2. Epítomos preditos para célula B e epítomos preditos para células T da proteína GRA2 foram obtidos no banco de dados denominado Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://iedb.org/>).

A estrutura tridimensional predita da proteína GRA2, com o número de acesso P13404, foi idealizada com auxílio do servidor I-Tasser segundo ROY, KUCUKURAL e ZHANG, 2010.

3.14 Phage-ELISA Screening

Para analisar a reatividade dos clones selecionados frente ao anticorpo monoclonal C3C5 previamente purificado em proteína G Sepharose, foi realizado o ensaio de ELISA. As placas de microtitulação (NUNC Maxisorp) foram sensibilizadas com 1µg/poço do anticorpo monoclonal C3C5, proveniente da purificação por cromatografia em coluna de proteína G Sepharose, diluído em tampão carbonato- bicarbonato 50mM (pH 9,6) durante 16 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), uma das placas foi bloqueada com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (PBS-TM) por 1 hora a 37°C e a outra placa foi bloqueada com PBS-T contendo 5% de soroalbumina bovina (BSA) por 1 hora a 37°C, a avaliar qual bloqueio seria mais eficiente. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com 10¹¹/poço dos fagos selecionados purificados e com 10¹¹/poço do fago selvagem (fago que não expressa nenhuma proteína exógena) para controle das reações por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T 0,05% e, em seguida, fez-se a incubação com anti-M13 conjugado com peroxidase (Sigma) diluído 1:5000 em PBS-T 0,05% suplementado com 5% de leite desnatado, durante 1 hora a 37°C.

Após 5 lavagens com PBS-T, a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (Sigma Chemical Co.). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) pela leitura a 492nm.

Após a realização deste ensaio foram escolhidos os fagos com maior reatividade para que as sequências de aminoácidos expressas por eles servissem de base, juntamente com o resultado da predição de epítomos para células B e T descrita acima, para a síntese de peptídeos.

3.15 Preparação do peptídeo sintético

Os peptídeos foram produzidos pela empresa Peptide 2.0 (Chantilly, VA, USA) sendo que a síntese foi feita com acoplamento de BSA, totalizando 2 peptídeos sintéticos que foram denominados Tx1 e Tx2. A empresa garante que após purificação por cromatografia de afinidade em HPLC, os peptídeos apresentaram 95% de pureza.

Ao peptídeo Tx1 foi acrescentada uma sequência de 3 glicinas (G), amidação C- Terminal e ponte dissulfeto entre os aminoácidos 2 e 11. O peptídeo Tx2 possuía a sequência de glicina e amidação C-Terminal somente. Os peptídeos sintéticos foram entregues pela empresa liofilizados, a diluição foi feita segundo as recomendações do fabricante, dessa forma os peptídeos foram ressuspensos em Dimetilsulfóxido (DMSO-Sigma). Os peptídeos foram armazenados para uso posterior a -20 °C.

3.16 Animais

Fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 com seis a dez semanas de idade foram obtidos junto ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Escola de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, Brasil. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em condições padronizadas de criação, com ciclos de doze horas de luz e doze horas de escuro em salas com temperatura controlada ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991).

3.17 Imunização dos camundongos

Foram utilizados no total 50 camundongos da linhagem C57BL/6. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética para utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob número de protocolo CEUA/UFU 029/12. Os camundongos foram divididos em 5 grupos de 10 animais.

O Grupo 1 foi imunizado com antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg); o Grupo 2 foi imunizado com BSA; o Grupo 3 foi imunizado com o peptídeo Tx1; o Grupo 4 com o peptídeo Tx2 e o Grupo 5 com ambos peptídeos sintéticos misturados. Cada animal foi imunizado por via subcutânea utilizando um volume de 200 µL contendo 25 µg do agente imunizador acrescido de adjuvante de Freund (SIGMA). Foi utilizado 25 µg de Stag para o grupo 1, 25 µg de BSA para o grupo 2, 25 µg de peptídeo Tx1 para o grupo 3, 25 µg de peptídeo Tx2 para o grupo 4 e 25 µg de peptídeo Tx1 mais 25 µg de peptídeo Tx2 para o grupo 5. As imunizações ocorreram em intervalos regulares de 15 dias em três inoculações sucessivas, sendo a primeira com adjuvante completo de Freund e as duas seguintes com adjuvante incompleto de Freund. Nesse período, foi realizada coleta de sangue dos animais antes de começar as imunizações e 15 dias após cada imunização. Esse sangue foi centrifugado (800 X g, 10 min) e o soro foi separado e armazenado a -80 C°.

3.18 Infecção dos animais com *Toxoplasma gondii* em camundongo (cepa Me49)

Foram preparadas seringas de 5mL descartáveis e agulhas de diferentes calibres, sendo eles 40x12mm, 0,80x25mm e 0,15x13mm, para macerar os cérebros coletados e contá-los em microscópio. Os animais infectados com a cepa Me49 foram sacrificados após 30 dias de infecção por deslocamento cervical e tiveram seus cérebros coletados e colocados em tubo plástico de centrifuga de volume 50 mL; Foi acrescentado PBS estéril e realizou-se a homogeneização/ maceração dos cérebros, primeiro com a agulha de maior calibre, 40x12mm; após passar todo o homogeneizado na seringa, trocou-se para as agulhas de menor calibre; Esse homogeneizado foi centrifugado por 10 min./ 500 x g/ 4°C. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se PBS estéril. Foi realizada outra centrifugação. O sedimento foi ressuspensionado em 3 mL de PBS estéril. Foram adicionados 20µl da solução do macerado de cérebro contendo os cistos em uma lâmina de vidro e contou-se o número de cistos em microscópio de luz, observando a lâmina por inteiro. A infecção foi realizada 15 dias após a terceira imunização. Foi inoculado por via oral por meio de aparato de gavagem 30 cistos

por animais. Foram infectados 7 animais por grupo. Os animais infectados foram observados quanto à variação de peso e mortalidade durante 30 dias.

3.19 Slot -Blot com peptídeos

Para realização do *Slot-Blot* membranas de nitrocelulose foram preparadas com STAg (2 mg/mL), peptídeos Tx1 (10 mg/mL), peptídeos Tx2 (10 mg/mL), peptídeos Tx1 e Tx2 misturados em volumes iguais, BSA (2 mg/mL) e Lisozima (10 mg/mL) como proteína irrelevante para controle negativo. Membranas foram bloqueadas por 2 hs com 5% de leite desnatado em PBS-Tween (PBS-TM) e incubadas overnight a 4 °C com soros dos animais imunizados após 15 dias da última imunização e com o mAb C3C5. Para detecção da ligação dos anticorpos aos antígenos mobilizados em nitrocelulose realizou-se subsequente incubação das membranas com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongos conjugado à peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.). Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas em PBS Tween e reveladas por meio da adição de substrato enzimático (H₂O₂) e cromógeno em tabletes de 3, 3'-diaminobenzidina (Sigma FastTM; Sigma Chemical Co.) como descrito pelo fabricante.

3.20 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG e subclasses IgG 1 e IgG 2a

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2a em amostras de soros individuais de camundongos imunizados, segundo o protocolo anteriormente descrito, com modificações (RIBEIRO et al., 2009). Placas de microtitulação de poliestireno (NUNC *Maxisorp*) foram sensibilizadas (50µL/poço) com antígeno total de *Toxoplasma gondii* (Stag) (1µg/poço) e com mistura de quantidades iguais dos peptídeos Tx1 e Tx2 (total de 1µg/poço) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram bloqueadas com PBS contendo 5% de leite desnatado por 1 hora

à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as placas foram incubadas com amostras de soros (50µL/poço) diluídas 1:50 em PBS-T com 5% de leite desnatado por 1 hora (IgG) ou 2 horas (IgG1 e IgG2a) a 37°C. Foram utilizados soros apenas de 45 dias, ou seja, 15 dias após a terceira dose de imunização. Em seguida, as placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e incubadas (50µL/poço) com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (*Sigma Chemical Co.*) na diluição 1:5000 em PBS-T leite desnatado a 5% ou com os anticorpos secundários biotinilados (*Caltag Lab. Inc., South San Francisco, EUA*) anti-IgG1 de camundongo na diluição 1:4000 em PBS-T a 1% de BSA ou anti-IgG2a de camundongo na diluição 1:2000. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas e incubadas (50µL/poço) com streptavidina-peroxidase (*Sigma Chemical Co.*) diluída 1:1000 em PBS-T BSA a 1%, quando apropriado (para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a).

A reação para detecção de IgG1 e IgG2a foi revelada com a adição de tampão orto-fenilenodiamina (OPD) a 1mg/mL acrescida de 3% de H₂O₂ (*Sigma Chemical Co.*). A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 4N. A reatividade foi obtida em leitor de placas (*Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA*) pela leitura a 492nm. Para a detecção de IgG total, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático (H₂O₂ a 0,03%) em tampão cromógeno consistindo de 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid 0.01 M (ABTS; *Sigma Chemical Co.*) em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2). Após incubação por 20-30 minutos à temperatura ambiente, a densidade óptica (DO) foi determinada em leitor de placas a 405 nm. O *cut off* de cada reação foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescido de três desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índice ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula: IE = DO amostra / DO *cut off* como anteriormente descrito (SILVA et al., 2002). Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

3.21 Avaliação da resposta imune celular: quantificação de citocinas

Foi realizada análise de citocinas no soro de animais imunizados e infectados com *T. gondii*. O soro utilizado foi coletado após 7 dias de infecção. A

dosagem das citocinas nestes soros foi feita com a utilização do kit CBA (*Cytometric Bead Array* - BD Biosciences) para IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-2, IL-10, IL-4 e IL-17 (Kit Th1/Th2 e Th17 murino). As reações foram feitas de acordo com recomendações do fabricante e a análise foi realizada no citômetro de fluxo da BD FACSCanto II. Para análise de IL-12p40 o soro dos animais foi submetido ao ensaio de ELISA utilizando kits comerciais para dosagem das citocinas IL-12 p40 murina (BD, EUA), seguindo as recomendações dos fabricantes. A concentração de cada citocina foi estimada por meio da Logística de Quatro Parâmetros (4-PL), baseado em uma curva de diluição seriada da respectiva proteína recombinante, e expressas em pg/ml.

3.22 Análise do parasitismo tecidual

Os animais sobreviventes foram eutanasiados após 30 dias de infecção por deslocamento cervical e tiveram seus cérebros coletados e colocados em tubo plástico de centrífuga de volume 50 mL. Os cérebros foram divididos em dois e cada hemisfério foi utilizado para contagem de cistos por técnicas diferentes. Para contagem em microscópio de luz foi acrescentado PBS estéril e realizou-se a homogeneização/ maceração dos cérebros conforme descrito na descrição do método de Infecção dos animais no tópico 3.18. Observou-se a lâmina por inteiro em movimentos de ziguezague.

Para a quantificação por PCR em Tempo Real, o DNA foi extraído a partir de 20mg de cérebro macerado. A extração foi realizada utilizando kit de extração WizardGenomic DNA Purification Kit® (Promega Corporation, Madison, WI, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi quantificado através do Nanodrop (NanoDrop® Spectrophotometer 1800 ND-1000, NanoDrop Technologies, Inc, USA)e a massa foi normalizada para a quantificação relativa do DNA do parasito. A quantificação do parasito foi realizada através da mensuração relativa do genoma utilizando o sistema SYBR® (Life Technologies) e o alvo utilizado para amplificação constou da região *529-bprepeatelement*. Os *primers*, as condições de amplificação e a concentração dos reagentes, foram os mesmos descritos por Wahab et al. (2010), sendo utilizado o Kit GoTaqPCR

Master Mix (Promega). As amostras foram amplificadas utilizando o aparelho StepOnePlus™ PCR Systems (Applied Biosystems).

As amostras analisadas foram normalizadas utilizando-se 200 ng de DNA total extraído para as reações. Para curva padrão, foram utilizadas 100 ng de DNA do parasita puro realizando sete diluições seriadas (1:10). As reações das amostras, bem como do controle da curva padrão foram realizadas em triplicata.

3.23 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). A análise estatística foi realizada por meio do programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Foi utilizada ANOVA e o teste de comparação múltipla de Tukey ou Bonferroni como pós-teste, após a verificação da distribuição normal dos resultados obtidos. Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Caracterização do anticorpo monoclonal C3C5

Anticorpos secretados em sobrenadantes de cultura do hibridoma C3C5 oriundos do cultivo de 1 a 5 células por poço foram testados quanto à capacidade de se ligar a uma única proteína do antígeno total de *Toxoplasma gondii* (STAg) e assim ser caracterizado como anticorpo monoclonal. O *Western blotting* foi realizado em condições reduzidas, com prévia incubação do antígeno (STAg) com β - mercaptoetanol e em condições não reduzidas, na ausência da incubação com β - mercaptoetanol. Os mesmos ensaios foram realizados com o anticorpo monoclonal E9, o qual marca uma proteína de superfície de *T. gondii* de peso 30 KDa. Os resultados dessa caracterização podem ser observados na Figura 3.

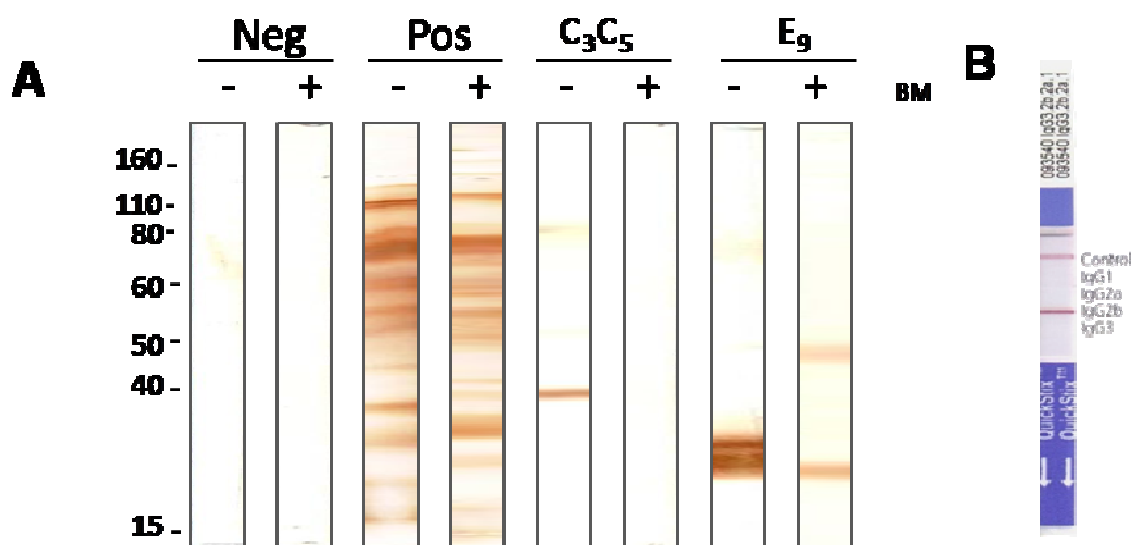


Figura 3. Caracterização do mAb C3C5. (A) *Western blotting* realizado para verificar a eficiência da subclonagem. Foram utilizados como controle positivo soro de camundongo infectado com *T. gondii* e o anticorpo monoclonal E₉, o qual marca proteína de superfície de *T. gondii* p30. Os sinais de (-) e (+) referem-se à ausência ou presença de β -mercaptoetanol. (B) Por meio do ensaio de isotipagem de anticorpos monoclonais foi possível detectar que o anticorpo C3C5 é uma Imunoglobulina G subclasse 2b (IgG2b).

4.2 Ensaio de proliferação com *T.gondii* 2F1

A detecção do número de parasitos é feita por reação da β galactosidase com seu substrato CPRG. A Figura 4 mostra a relação entre inibição da proliferação e concentração do mAb C3C5. Os resultados estão expressos como porcentagem de inibição da proliferação em relação ao tratamento com IgG irrelevante purificada de camundongo soronegativo para com *T. gondii*.

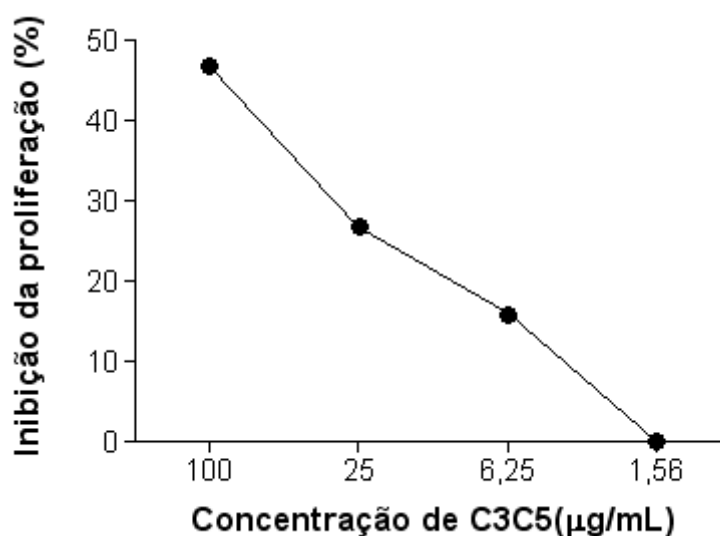


Figura 4. Gráfico da proliferação de *T. gondii* tratado com anticorpo monoclonal C3C5 comparada à proliferação de *T. gondii* tratado com IgG irrelevante. Pode ser observado que a concentração de mAb C3C5 de 100 µg/mL inibe a proliferação de *T. gondii* em cerca de 50 % comparado ao tratamento com IgG irrelevante na mesma concentração.

4.3 Reação de imunofluorescência indireta

A marcação observada ao microscópio confocal após a reação de imunofluorescência indireta comprovou que a proteína reconhecida pelo anticorpo monoclonal C3C5, GRA2, localiza-se no interior do taquizoito, já que não há marcação quando as membranas dos taquizoitos não são permeabilizadas. A imagem resultante dessa marcação pode ser observada na Figura 5.

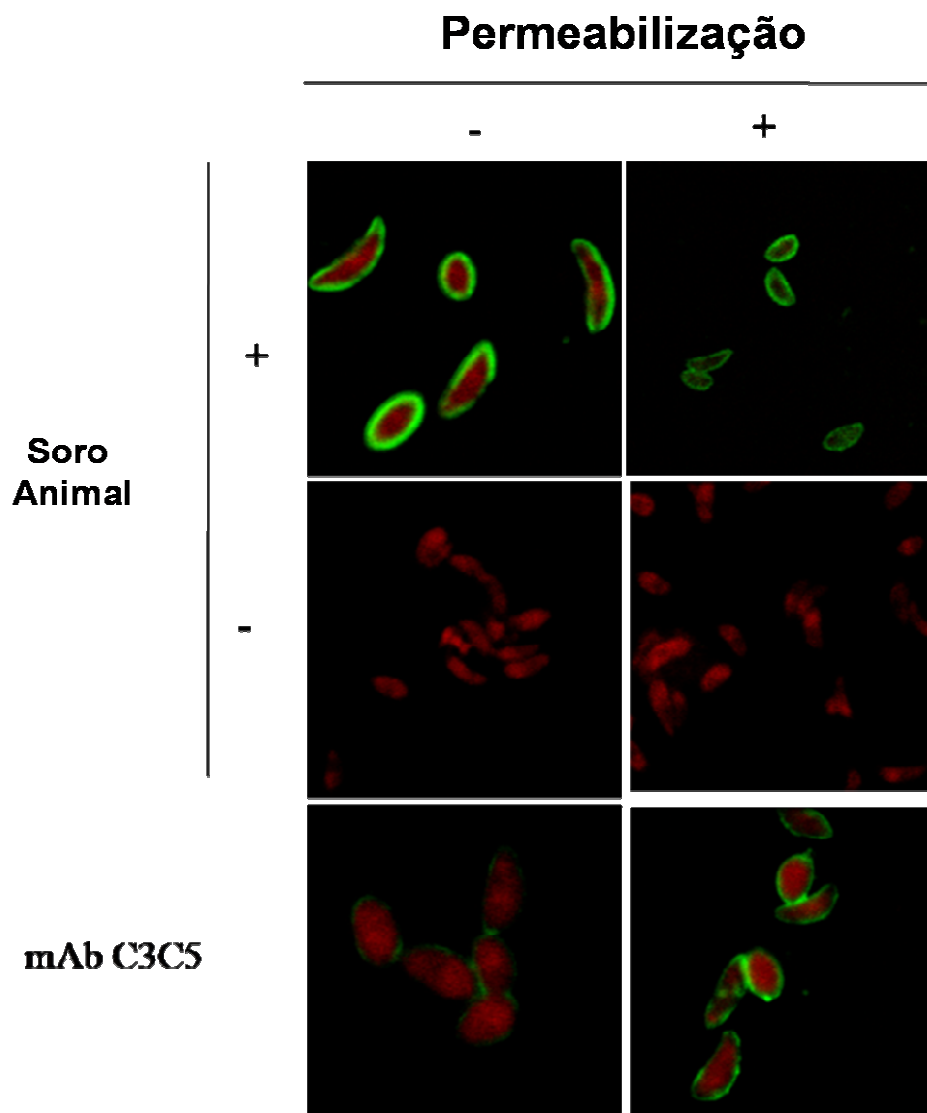


Figura 5. Reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com taquizoitos de *T. gondii* formalizados em lâminas incubadas com soro de camundongo infectado com *T. gondii* (+) e não infectado com *T. gondii* (-) e com o monoclonal C3C5. As lâminas contendo parasitas foram permeabilizadas com Triton X-100 0,01% (+) ou não (-) por 10 minutos.

4.4 Eletroforese bidimensional

O ensaio de *Western blotting* realizado com a membrana de nitrocelulose resultante da transferência do gel após a corrida eletroforética em duas dimensões mostrou a marcação de duas isoformas da proteína, conforme

observado na Figura 6. Ambas proteínas marcadas foram excisadas do gel corado não transferido e submetidas à análise por espectrometria de massas.

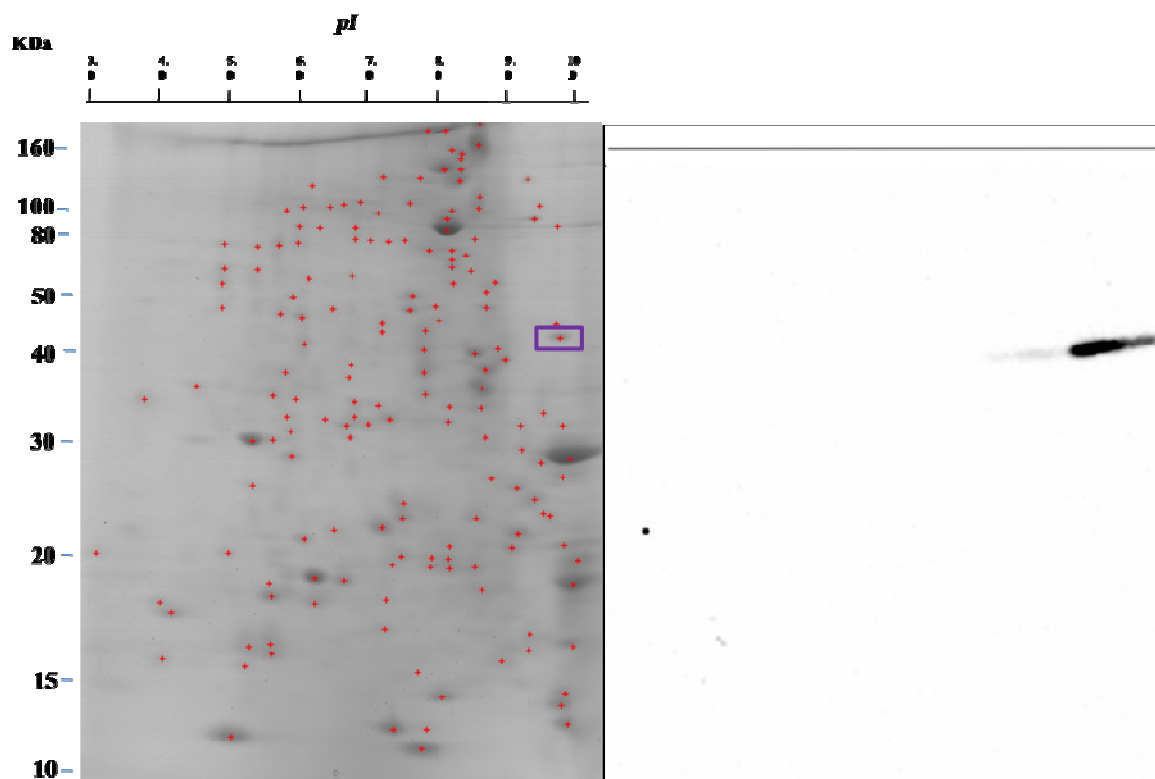


Figura 6. Eletroforese bidimensional. O gel resultante da eletroforese bidimensional à esquerda e membrana de nitrocelulose resultante do *Western blotting* revelado à direita. Os *spots* marcados foram excisados e enviados para sequenciamento por espectrometria de massa.

4.5 Sequenciamento por espectrometria de massa

O resultado do sequenciamento por espectrometria de massa mostrou que se tratava de uma proteína de *Toxoplasma gondii* de 28 kDa e ponto isoelétrico 9,8. Após análise da sequência de aminoácidos no banco de dados de *Toxoplasma gondii* ToxoDB (www.toxodb.org/toxo) obteve-se a confirmação de que era a proteína de grânulo denso 2 (GRA2).

4.6 Seleção de peptídeos recombinantes (epítomos mapeados por *phage display*)

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificado e não amplificado de cada ciclo. Os títulos de entrada dos fagos no *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade ao anticorpo monoclonal C3C5 ficaram ligados por interação peptídeo/anticorpo e o restante dos fagos com baixa ou sem afinidade foram removidos durante as lavagens. Nas amplificações ocorre o inverso, indicando a eficiência do processo.

4.6.1 Extração de DNA e sequenciamento dos clones de fagos

Dentre os 96 clones sequenciados, 25 apresentaram sequências válidas (sem erros de sequenciamento), sendo 19 sequências distintas. A Tabela 1 mostra a sequência e frequência dos clones obtidos.

Tabela 1. Frequência dos clones de fagos sequenciados.

Clone	Sequência	Frequência do clone
1	LPALTRS	1/25
2	NLSSSWI	6/25
3	LNSLSRH	1/25
4	VQSNPLS	1/25
5	TQLARSA	1/25
6	SLNSDLF	1/25
7	RPLSFGH	1/25
8	SPNAPNS	1/25
9	SQWSPHR	1/25
10	SNNLLHN	1/25
11	QATLHLG	1/25
12	SSHSWRL	1/25
13	PSVPHAH	1/25
14	SSNLPLS	1/25
15	TSATSNS	1/25
16	SMLSVAA	1/25
17	PSSQRFF	2/25
18	LAPQSHR	1/25
19	HGPVSR	1/25

4.6.2 Phage -ELISA Screening

Os fagos eluídos do terceiro ciclo do *biopanning* foram submetidos ao ensaio de *Phage*-ELISA com o anticorpo monoclonal C3C5 do mesmo *pool* utilizado no *panning* para verificar a reatividade ao alvo. Foram utilizados os dezenove clones de fagos selecionados purificados e o fago selvagem como controle negativo de reação. A Figura 7 demonstra a reatividade dos clones com o anticorpo C3C5. Nota-se que quase todos os clones obtiveram uma absorbância média superior ao clone selvagem, comprovando a eficiência da seleção.

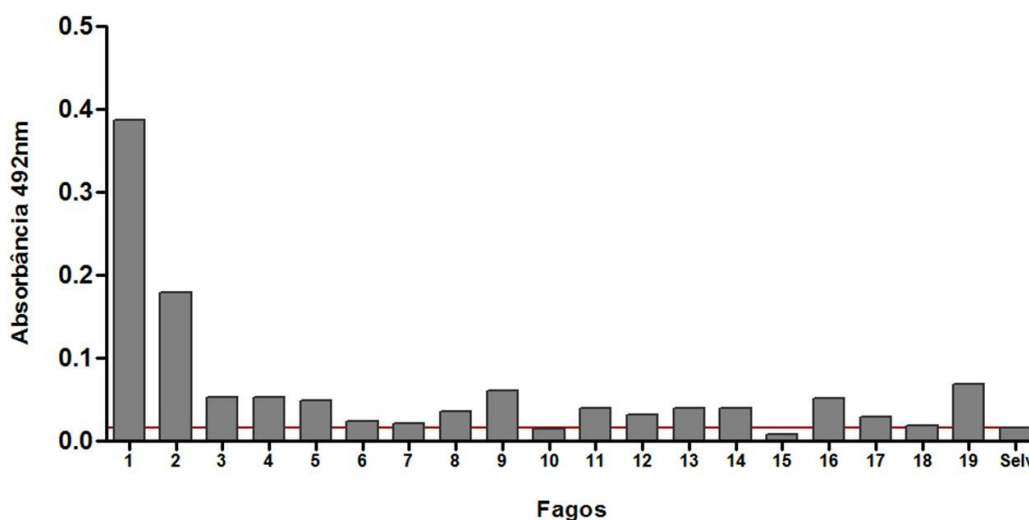


Figura 7. Ensaio de *Phage*-ELISA com o anticorpo monoclonal C3C5. Foi realizada pré-validação dos clones reconhecidos pelo anticorpo monoclonal C3C5. Para comparação, o fago selvagem foi submetido às mesmas condições.

4.7 Análise de bioinformática e síntese de peptídeos

Foi observado que todos os peptídeos selecionados se alinhavam de alguma forma à proteína GRA2 (Figura 8). Paralelo a este resultado, foi feita a predição de epítomos para células B com a sequência da proteína GRA2 no banco de dados denominado Immune Epitope Database and Analysis Resource (<http://iedb.org/>), o qual mostrou todas as regiões antigênicas da proteína GRA2. Foi observado que a região que os peptídeos selecionados por *phage display* se alinharam à GRA2 é uma região imunodominante (Figura 9). A sequência de

aminoácidos dessa região foi usada para síntese do peptídeo Tx1. Foi realizada também a predição para epítomos de células T com a sequência da proteína GRA2, tanto de MHC de classe I quanto de MHC de classe II (dados não mostrados), onde também foram mostradas diversas regiões antigênicas. A escolha da região para a síntese do peptídeo TX2 foi feita com base nesses resultados e optou-se por uma região imediatamente consecutiva à região de epítomos de células B, que se mostrou imunodominante para células T, inclusive com aminoácidos em comum (Figura 10). A Tabela 2 mostra a sequência exata dos peptídeos sintetizados, bem como os detalhes dessa síntese. Ambos os peptídeos foram sintetizados acoplados ao BSA, a fim de aumentar a imunogenicidade.

GRA2	61	DERQQEPEEPVSQRASRVAEQLFKFLKFAENVGQHSEKAFKKAKVVAEKGF	120
17		-----PSSQR-----F--F-----	7
8		-----SPNAPNS-----	7
18		-----LAPQSHR-----	7
3		-----LNSLSRH-----	7
6		-----SLNS-DLF-----	7
15		-----TSATSNS-----	7
2		-----NLSSSW-I-----	7
12		-----SSHSWRL-----	7
4		-----VQSNP-LS-----	7
10		-----SNNL-LHN-----	7
14		-----SSNLPLS-----	7
7		-----RPLSFGH-----	7
1		-----LPALTRS-----	7
5		-----TQLARSA-----	7
11		-----QATLHLG-----	7
19		-----HGPVSRG-----	7
16		-----SMLSVAA-----	7
9		-----SQWSPHR-----	7
13		-----PSVPHAH-----	7

Figura 8. Alinhamento dos fagos selecionados com a proteína GRA2. Com o uso do programa CLUSTAL W2, observou-se regiões semelhantes (alinhamento) entre as sequências de fagos selecionados e a proteína de *T. gondii*, GRA2.

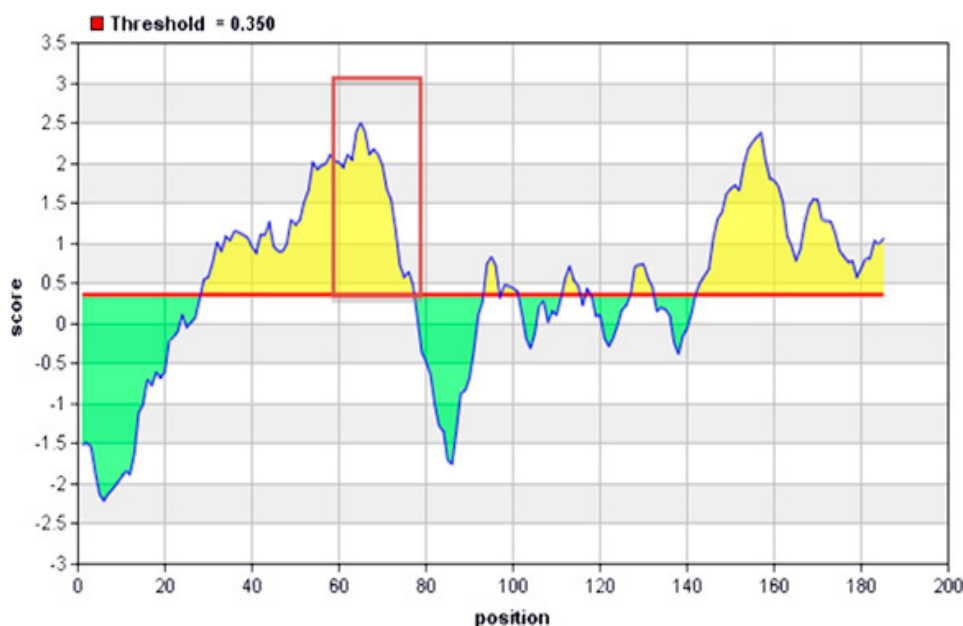


Figura 9. Predição de epítomos para células B. Em destaque, região de epítomos preditos para células B da proteína GRA2 obtidos no Immune Epitope Database and Analysis Resource em comum com a região de alinhamento dos fagos selecionados.

>GRA2 - Dense granule antigen (*Toxoplasma gondii*)

```

1 MFAVKHCLLV VAVGALVNVS VRAAEFSGVV NQGPVDVPFS GKPLDERAVG GKGEHTPPLP
61 DERQQEPEEP VSQRASRVAE QLFRKFLKFA ENVGQHSEKA FKKAKVVAEK GFTAAKHTTV
121 RGFKVAKEAA GRGMVTVGKK LANVESDRST TTTQAPDSPN GLAETQAPVE PQQRAAHVPV
181 PDFSQ Tx1

```

>GRA2 - Dense granule antigen (*Toxoplasma gondii*)

```

1 MFAVKHCLLV VAVGALVNVS VRAAEFSGVV NQGPVDVPFS GKPLDERAVG GKGEHTPPLP
61 DERQQEPEEP VSQRASRVAE QLFRKFLKFA ENVGQHSEKA FKKAKVVAEK GFTAAKHTTV
121 RGFKVAKEAA GRGMVTVGKK LANVESDRST TTTQAPDSPN GLAETQAPVE PQQRAAHVPV
181 PDFSQ Tx2

```

Figura 10. Sequência de aminoácidos da proteína GRA2. Em amarelo, sequência de aminoácidos da proteína GRA2 utilizada para sintetizar o peptídeo Tx1, região predita como epítomo de célula B; em verde, sequência de aminoácidos da proteína GRA2 utilizada para sintetizar o peptídeo Tx2, região predita como epítomo de célula T.

Tabela 2. Tabela com as seqüências dos peptídeos sintetizados. O peptídeo Tx1 possui uma ponte dissulfeto em sua conformação a fim de reproduzir os peptídeos selecionados a partir de uma biblioteca randômica de peptídeos conformacionais fusionados em fagos (Ph.D.-C7C da NEW ENGLAND BioLabsRInc).

Nome do peptídeo	Seqüência	N-terminal	C-terminal
Tx1	ACEPVSQRASCGGGS (ponte dissulfeto entre C ₂ e C ₁₁)	BSA	NH ₂
Tx2	RASRVAEQLFRKFLKFAGGGS	BSA	NH ₂

4.8 Modelagem molecular da proteína GRA2

O modelo molecular da proteína GRA2 gerada pelo servidor I-Tasser. está representado na Figura 11 abaixo.

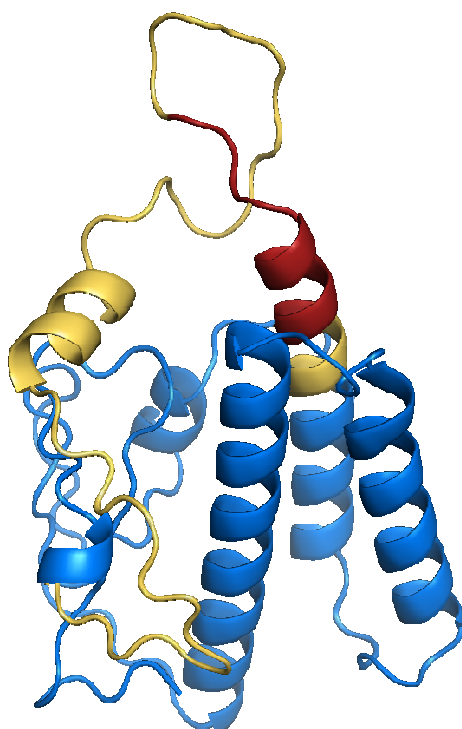


Figura 11. Modelo molecular da proteína GRA2 gerado pelo servidor I-Tasser. A região marcada em amarelo corresponde à região de epítomos preditos pelo banco de dados de predição de epítomos (iedb). Em vermelho região de reconhecimento do anticorpo monoclonal C3C5 mapeada por *phage display*.

4.9 Mortalidade após desafio com *T. gondii*

Após infecção com 30 cistos de *T. gondii* por via oral, os camundongos foram observados diariamente quanto à mortalidade e foram determinadas as curvas de sobrevida (Figura 12). Foi observada maior sobrevivência dos animais imunizados com a mistura de peptídeos Tx1 e Tx2, com 85,7% de sobrevida, com diferença significativa em relação ao grupo imunizado com BSA (28,6%). Os demais grupos apresentaram sobrevida intermediária, entre 40% e 70%, porém sem apresentar diferenças significativas entre si e em relação ao grupo controle BSA.

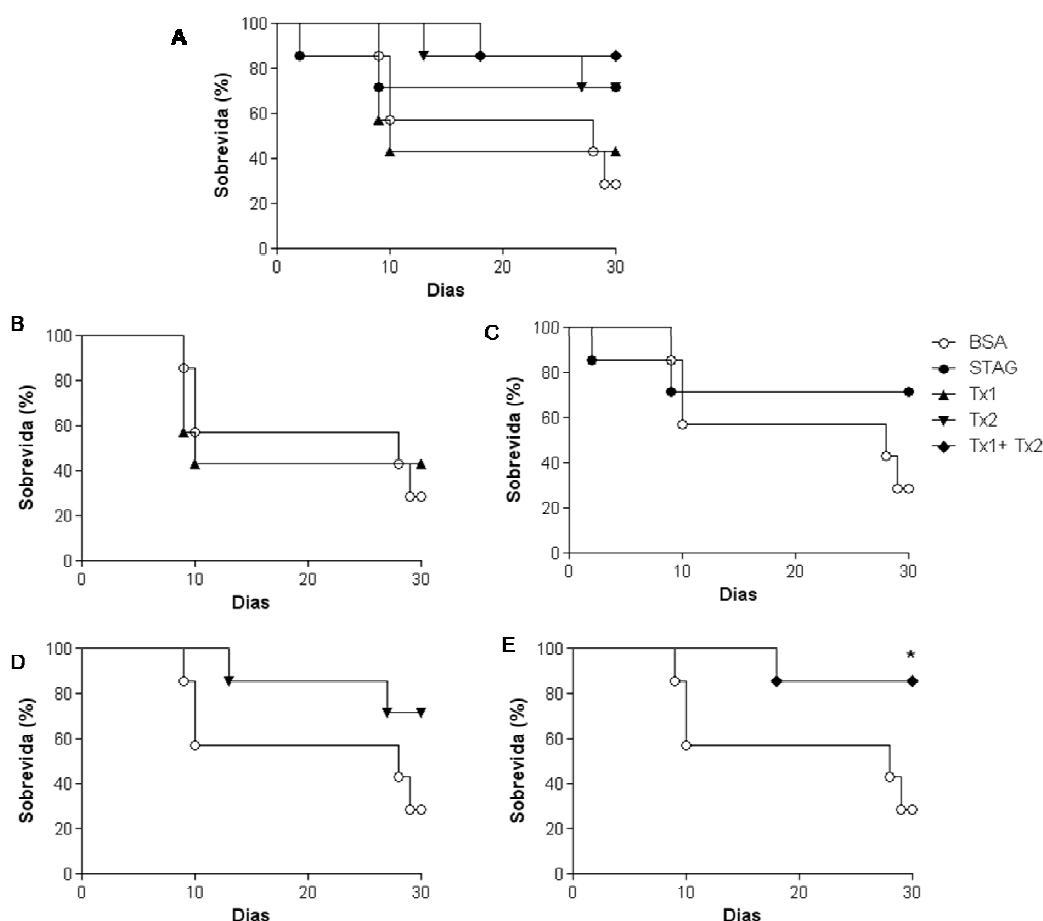


Figura 12. Curvas de sobrevida dos animais imunizados e posteriormente infectados com *T. gondii*. (A) Gráfico de sobrevida com todos os grupos. (B) Comparação entre a sobrevida do grupo controle (BSA) e a sobrevida do grupo Tx1. (C) Comparação entre a sobrevida do grupo controle (BSA) e a sobrevida do grupo STAg. (D) Comparação entre a sobrevida do grupo controle (BSA) e a sobrevida do grupo Tx2. (E) Comparação entre a sobrevida do grupo controle (BSA) e a sobrevida do grupo Tx1 + Tx2. Nota-se diferença significativa entre esses dois grupos.

4.10 Slot Blot

Membranas de nitrocelulose foram preparadas com antígeno total de *T. gondii* (STAg), peptídeos Tx1, peptídeo Tx2, BSA e Lisozima. Amostras de soros dos animais imunizados de todos os grupos foram testadas. Soro de animal infectado com *T. gondii* foi utilizado como controle positivo e soro de animal não infectado com *T. gondii* foi utilizado como controle negativo. Testou-se também o mAbC3C5. Observou-se que os soros de animais imunizados com BSA reconheceram o BSA, o peptídeo Tx1; em menor intensidade o peptídeo Tx2 e a mistura de ambos peptídeos (Tx1 + Tx2). Os soros de animais imunizados com STAg reconheceram STAg. Soros dos animais imunizados com Tx1 reconheceram BSA (o peptídeo foi sintetizado acoplado ao BSA); o Tx1; em menor intensidade, o Tx2 e a mistura de peptídeos Tx1 + Tx2. Soros de animais imunizados com Tx2 reconheceram Tx1, Tx2 em menor intensidade e Tx1 + Tx2; soros de animais imunizados com a mistura de peptídeos Tx1 + Tx2 reconheceram BSA, Tx1, Tx2 e Tx1 + Tx2, como pode ser observado na Figura 13. E por fim, o anticorpo C3C5 reconheceu STAg, Tx1 e Tx2 em menor intensidade e a mistura de peptídeos Tx1 + Tx2. Esse ensaio pôde demonstrar que os peptídeos induziram a produção de anticorpos contra eles.

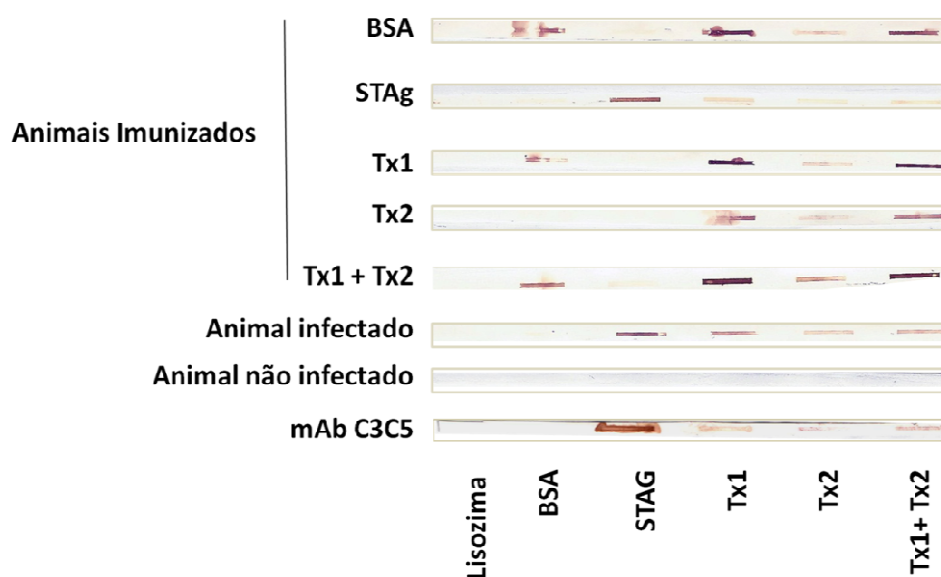


Figura 13. Slot blot com os peptídeos adsorvidos na membrana, proteína irrelevante (Lisozima) e BSA. As membranas foram incubadas com o soro de todos os grupos de animais imunizados e

coletados no dia 45. Como controles positivos e negativos, foram utilizados soro de animais infectados com *T. gondii* e soro de animais não infectados, respectivamente.

4.11 Avaliação da resposta humoral

A produção de IgG específica para STAg ou para os peptídeos Tx1+Tx2 e suas subclasses IgG1 e IgG2a foi avaliada por ensaio de ELISA indireto. Os resultados estão expressos na Figura 14. Foi observado que animais imunizados com STAg reconheceram somente STAg e que animais imunizados com Tx1+Tx2 reconheceram somente Tx1+Tx2. O grupo imunizado com BSA não reconheceu nenhum dos antígenos.

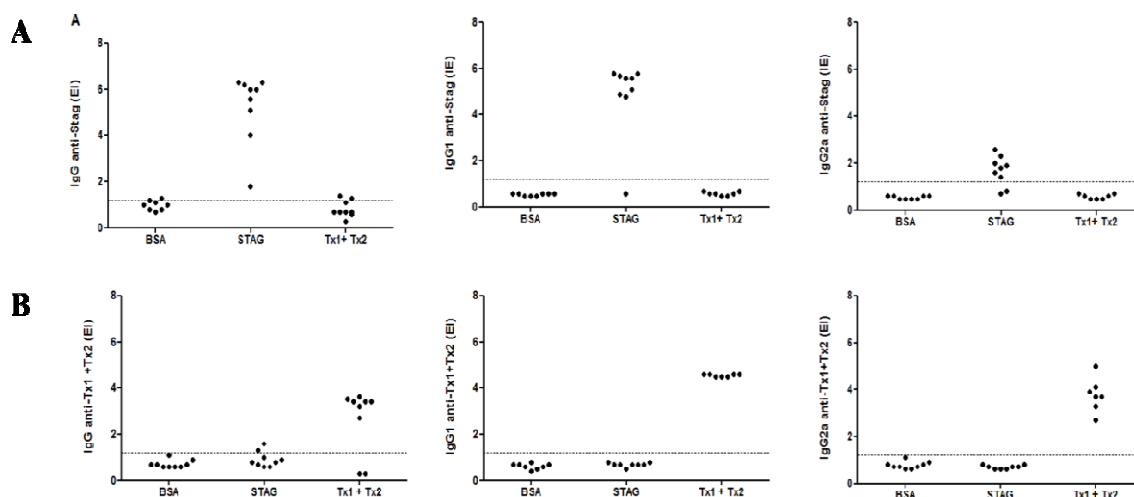


Figura 14. IgG total e subclasses secretadas por animais imunizados. Níveis de IgG, IgG1e IgG2a, respectivamente, anti-STAg (A) ou anti-Tx1+Tx2 (B) determinados por ELISA em amostras de soro de camundongos C57BL/6 imunizados com STAg, BSA ou Tx1+Tx2.

4.12 Avaliação da resposta celular: Produção de citocinas após 7 dias de infecção

A produção de citocinas foi analisada no soro de animais imunizados e desafiados com coletado após 7 dias de infecção. Os resultados estão expressos nas Figuras 15 e 16. Altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10 foram detectados no grupo imunizado com BSA. Este grupo mostrou predominância de secreção de citocinas pró-inflamatórias e baixa produção de citocinas anti-

inflamatória. Nos grupos imunizados com STAg e Tx1+ Tx2 houve um melhor balanço entre citocinas do perfil Th1 e Th2. A produção de citocinas de perfil Th17 foi semelhante entre os grupos analisados.

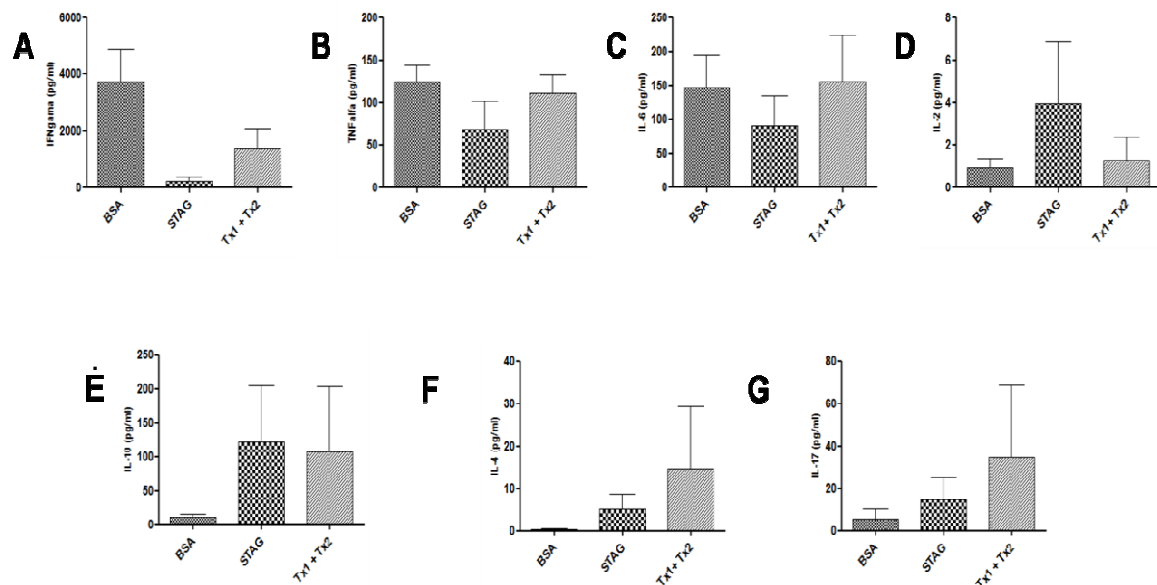


Figura 15. Perfil de produção de citocinas em animais imunizados e desafiados. Após 7 dias de infecção foram coletadas amostras de sangue dos animais para avaliação do perfil de citocinas. (A) Produção de IFN-γ; (B) Produção de TGF-α; (C) Produção de IL-6; (D) Produção de IL-2; (E) Produção de IL-10; (F) Produção de IL-4; (G) Produção de IL-17.

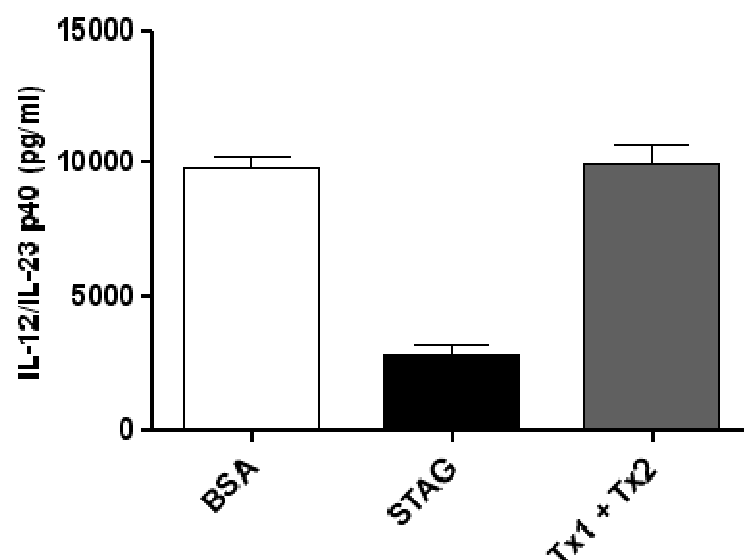


Figura 16. Produção de IL-12/IL-23 p40 após imunização e desafio com *T. gondii*. A análise foi feita em amostras de soro dos animais após 7 dias de infecção.

4.13 Parasitismo cerebral após desafio

A carga parasitária em tecido cerebral foi determinada após contagem de cistos em microscópio óptico e por meio da técnica de PCR em tempo real. Em ambos os métodos não houve diferenças estatísticas significantes da carga parasitária entre os grupos analisados.

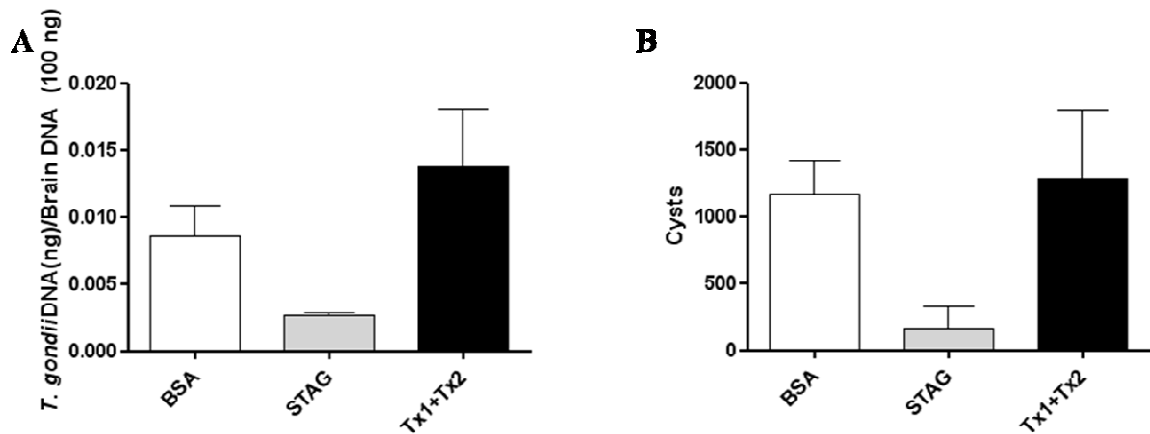


Figura 17. Parasitismo cerebral em animais imunizados e desafiados com *T. gondii*. (A) Carga parasitária determinada por PCR em tempo real. (B) Carga parasitária determinada pela contagem de cistos cerebrais.

5. Discussão

A infecção por *Toxoplasma gondii* ocorre no mundo inteiro e pode afetar potencialmente todos os animais homeotérmicos. Estima-se que mais de um terço da população mundial esteja infectada (PETERSEN, 2007). Quanto à infecção em humanos, mulheres gestantes e indivíduos imunocomprometidos constituem o principal grupo de risco.

Para a maioria dos indivíduos imunocompetentes a infecção por *T. gondii* resulta no desenvolvimento de uma imunidade protetora contra a doença. Por essa razão, o controle da infecção por vacinação tem uma alta probabilidade de sucesso (INNES; VERMEULEN, 2006). Há uma vacina comercial disponível para prevenir aborto provocado por *Toxoplasma* em cabras e ovelhas, Ovilis® Toxovax (Intervet). Essa vacina compreende taquizoítos vivos atenuados da linhagem S48, a qual não produz oocistos, no entanto ela não previne a transmissão vertical (O'CONNEL; WILKINS;TEPUGA,1988). Ela é liberada somente para uso veterinário e, por causa dos poucos dados disponíveis, ela não é considerada segura para uso humano. Portanto, estudos no sentido de desenvolver uma vacina humana, que previna toxoplasmose congênita têm focado em vacinas inativadas utilizando antígenos imunodominantes definidos e diferentes estratégias de liberação (INNES; VERMEULEN, 2006).

Os resultados de Prigione e colaboradores (2000) sugerem que a GRA2, assim como a SAG1, desempenham um papel relevante na manutenção da memória mediada por células T em resposta a *T. gondii* em humanos saudáveis infectados cronicamente, suportando a hipótese de que a combinação desses antígenos ou de peptídeos apropriados derivados deles representam bons candidatos para o desenvolvimento de vacina em humanos. A resposta imunológica a GRA 2 parece ser importante no controle da infecção, visto que a imunização com a proteína nativa protege camundongos contra a toxoplasmose aguda (SHARMA; ARAUJO, REMINGTON, 1984; MERCIER, 1998). No presente trabalho, foi produzido um anticorpo monoclonal a partir de um banco de hibridomas pertencente ao Laboratório de Imunoparasitologia, com células fusionadas na década de 90. O hibridoma C3C5 foi selecionado porque mostrava por *Western blotting* marcação em apenas uma proteína, após a realização da

etapa de subclonagem das células fusionadas. Os dados indicam que o anticorpo monoclonal C3C5 reconhece um epítopo conformacional dentro da proteína GRA2, já que a proteína é reconhecida sob condições desnaturantes mas não sob condições mais drásticas como com a adição de um agente redutor na eletroforese SDS-PAGE. O peso molecular teórico da proteína GRA2 é 28 KDa, entretanto, Mercier e colaboradores (1998) relatam que uma propriedade comum às proteínas de grânulo denso é a diferença observada entre o peso molecular teórico e o peso estimado da proteína nativa por análises de SDE-PAGE de lisados de taquizoítos. Os autores comentam que essa diferença pode ser explicada pelas modificações pós-traducionais, como no caso da GRA2. Em adição, o peso molecular da proteína reconhecida pelo C3C5 neste trabalho foi determinado por eletroforese em condições desnaturantes e não reduzidas, o que pressupõe que a estrutura tridimensional da proteína esteja intacta e por isso migra menos. Os resultados do ensaio de imunofluorescência, realizado com taquizoitos incubados com o monoclonal C3C5, mostraram a presença de reatividade somente quando a membrana do parasito é permeabilizada, confirmando a localização da GRA2 também no complexo interno de membrana do taquizoito, como previamente demonstrado por Mercier e colaboradores (SIBLEY *et al*, 1995; MERCIER *et al*, 1998a). A inibição da proliferação de *T. gondii* em células HeLa após prévia incubação do parasito com o monoclonal C3C5 demonstra a importância da GRA2 no processo de replicação do parasito, já que essa proteína é comumente envolvida na maturação do vacúolo parasitóforo, local onde se dá a multiplicação do parasito (MERCIER *et al.*, 2005). Neste trabalho também foram mapeados epítomos imunodominantes da proteína GRA2 e mimetopos dessa proteína foram sintetizados com o intuito de se avaliar o potencial vacinal dos mesmos. Os resultados mostraram que peptídeos sintetizados como epítomos de células B não aumentaram significativamente a sobrevivência de animais imunizados com eles, assim como observado com peptídeos sintetizados como epítomos de células T. No entanto, quando os animais foram imunizados com ambos os peptídeos observou-se um aumento na sobrevivência acima de 85% em relação ao grupo controle negativo, constituído de animais imunizados apenas com BSA. Isso demonstra que a imunização com epítomos reconhecidos tanto por células B quanto por células T parece ser mais

efetiva. Não houve diferenças significantes na produção de IgG que justificasse este aumento na sobrevivência, mas a análise do perfil de citocinas produzidas por animais imunizados e posteriormente infectados mostrou uma baixa produção de citocinas do perfil Th2 no grupo com menos sobreviventes. De fato, a imunidade celular é um componente fundamental na resposta imune do hospedeiro contra o ataque por *Toxoplasma* (FILISSETTI; CANDOLFI, 2004). A estimulação do sistema imune inato ocorre rapidamente na infecção por *T. gondii*, já que este parasito é apto a estimular macrófagos diretamente, resultando na produção de IL-12, a qual vai estimular células NK a produzir IFN- γ (GAZZINELLI *et al.*, 1993; INNES *et al.*, 2009). Esta indução precoce da síntese de IFN- γ constitui-se num mecanismo importante para a inibição da proliferação do taquizoito durante os estágios recentes de infecção e irá propiciar um ambiente de citocinas apropriado para o início da resposta imune adaptativa resultando em uma forte resposta imune pró-inflamatória tipo Th1 (GAZZINELLI *et al.*, 1996; INNES *et al.*, 2009). A citocina regulatória IL-10 é importante para ajudar a proteger contra o processo de imunopatogênese causado por uma vigorosa resposta imune tipo Th1 ((GAZZINELLI *et al.*, 1996; INNES *et al.*, 2009). Os diversos estudos publicados na literatura têm focado no potencial vacinal de antígenos de superfície de *T. gondii* assim como em antígenos secretados, como as GRAs (BHOPALE, 2003). Assim, os resultados aqui apresentados corroboram com os achados a respeito da imunogenicidade da GRA2, demonstrando que peptídeos miméticos de regiões desta proteína devem se constituir em candidatos potenciais no desenvolvimento de vacinas.

6. Conclusões

- O clone C3C5, selecionado a partir de um banco de hibridomas secretores de anticorpos monoclonais dirigidos contra formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, é reativo contra a proteína de grânulo denso GRA2 deste parasito;
- A neutralização do epítipo reconhecido pelo mAb C3C5, por meio da incubação com a linhagem *T. gondii* 2F1 foi capaz de diminuir a proliferação desse parasita em células HeLa, demonstrando que a proteína GRA 2 desempenha papel importante na replicação do parasito;
- Foi identificado o epítipo C3C5 na molécula GRA2 de *T. gondii*, a partir da estrutura tridimensional deste componente parasitário, caracterizado como um epítipo conformacional;
- A partir de dois peptídeos sintéticos produzidos como mimetopos de epítipos da GRA2 preditos para células B e para célula T, foi possível observar que a imunização com a mistura destes dois peptídeos sintetizados demonstrou ser efetiva na redução da mortalidade de camundongos infectados com *T. gondii*.

7. Referências Bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003, 562 p.

ADAMS, L.; HIBBS, J.; TAINTOR, R.; KRAHENBUHL, J. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2407-2412, 1990.

AZZAZY, H. M. E.; HIGHSMITH JR, W. E. Phage display technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 425-445, 2002.

ALDEBERT, D.; DURAND, F.; MERCIER, C.; BRENIER-PINCHART, M. P.; CESBRON-DELAUW, A. F.; PELLOUX, H. *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. **Cytokine**, v. 37, p. 206-221, 2007.

ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v. 1, p. 17, 2005.

AMMASSARI, A.; MURRI, R.; CINGOLANI, A.; de LUCA, A.; ANTINORI, A. AIDS-associated cerebral toxoplasmosis: an update on diagnosis and treatment. In: Gross, U. ***Toxoplasma gondii***. Berlin: Springer-Vrlag, p. 209-222, 1996.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C., OREFICE, F.; ADDISS, D.G.; Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.

BARBAS, C. F. III, BURTON, D. R., SCOTT, J.K., SILVERMAN, G.J. **Phage Display: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624-630, 2007.

BENHAR, I. Biotechnological applications of phage and cell display. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 1-33, 2001.

BHOPALE, G. M. Development of vaccine toxoplasmosis: current status. **Microbes and Infection** , v. 5, p. 457-462, 2003.

BLACK, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000.

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 595-600, 2006.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, p. 114-123, 1997.

CESBRON-DELAUW, M. F.; GENDRIN, C.; TRAVIER, L.; RUFFIOT, P.;MERCIER, C. Apicomplexa in mammalian cells: trafficking to the parasitophorous vacuole. **Traffic**, v. 9, p. 657-664, 2008.

CHATTERTON, J. M. W. Pregnancy. In: Ho-Yen, D. O.; Joss, A. W. L. Human **Toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 144-183, 1992.

COPPENS, I.; DUNN, J. D.; ROMANO, J. D.; PYPAERT, M.; ZHANG, H.; BOOTHROYD, J.C.; KOINER, K.A. *Toxoplasma gondii* sequesters lysosomes from mammalian hosts in the vacuolar space. **Cell**, v. 125, p. 261-274, 2006.

CUNHA-JUNIOR, J. P.; SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; SOUZA, M. A.; SOUZA, G. R. L.; PRUDENCIO, C. R.; PIROVANI, C. P.; CARCARDO, J. C. M.; BARBOSA, B. F.; GOULART, L. R.; MINEO, J. R. A4D12 monoclonal antibody recognize a new linear epitope from SAG 2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. **Immunobiology**, v. 215, p. 26-37, 2010.

DRAPIER, J.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. Interferon- gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.

DUBEY, J. P. Advances in the lyfe cycle of *Toxoplasma*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P.; CORTÉS-VECINO, J. A.; VARGAS-DUARTE, J. J.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. M.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; KWOK, O. C. H.; SMITH, T.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 45-50, 2007.

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, p. 933-939, 1996.

ELLIS, J. T.; RYCE, C.; ATKINSON, R.; BALU, S.; JONES, P.; HARPER, P. A. W. Isolation, characterization and expression of a GRA2 homologue from *Neospora caninum*. **Parasitology**, v. 120, p. 383-390, 2000.

EVENGARD, B., PETERSSON K., ENGMAN, M. L., et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v. 127, p. 121-127, 2001.

FILISETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 40, p. 71-80, 2004.

FRENKEL, J. K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 50, p. 182-191, 1974.

FRIXIONE, E.; MONDRAGON, R.; MEZA, I. Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 34, p. 152-163, 1996.

GASKINS, E.; GILK, S.; DEVORE, N.; MANN, T.; WARD, G.; BECKERS, C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Cell Biology**, v. 165, p. 383-393, 2004.

GAZZINELLI, R.; HIENY, S.; WYNN, T.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T. HIENY, S. SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN- γ production and

protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 286-292, 1991.

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

GOUWY, M.; STRUYF, S.; PROOST, P.; VAN DAMME J. Sinergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 561-580, 2005.

HAUSER, W.; SHARMA, S.; REMINGTON, J. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 458-463, 1983.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Healthy Research Reviews**, v. 6, 41-61, 2005.

HILL, D. E.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. **International Journal of Parasitology**. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.012>

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1126-1136, 2005.

HO-YEN, D. O. Clinical features. In: Ho-Yen, d. O., Joss, A. W. L. **Human Toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 56-78, 1992.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, v. 4, p. 340-347, 1988.

HUNTER, C.; SUBAUSTE, C.; REMINGTON, J. The role of cytokines in toxoplasmosis. **Biotherapy**, v. 7, p. 237-247, 1994.

HUST, M.; DÜBEL, S. Mating antibody phage display with proteomics. **TRENDS in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 8-14, 2004.

INNES, E. A.; BARTLEY, P. M.; BUXTON, D.; KATZER, F. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, p.1887–1894, 2009.

INNES, E. A.; VERMEULEN, A. N. Vaccination as a control strategy against the coccidial parasites *Eimeria*, *Toxoplasma* and *Neospora*. **Parasitology**, v. 133, p. S145-S168, 2006.

JENUN, P. A., STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K. K.; KAPPERUD, G.; WHITELAW, A.; ESKIL, A., et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2900-2906, 1998.

JEWETT, T. J.; SIBLEY, L. D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesions and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. **Molecular Cell**, v. 11, p. 885-894, 2003.

JONES, J. L.; HOLLAND, G. N. Annual burden of ocular toxoplasmosis in the United States. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 464-465, 2010.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495–497, 1975.

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

LEBRUN, M.; MICHELIN, A.; EL HAJJ, H.; PONCET, J.; BRADLEY, P. J.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J. F. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1823-1833, 2005.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, v. 96, p. 89-96, 2000.

LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1285-1292, 2001.

LIU, S.; SHI, L.; CHENG, Y. B.; FAN, G. X.; REN, H. X.; YUAN, Y. K. Evaluation of the protective effect of multi-epitope DNA vaccine encoding six antigen segments of *Toxoplasma gondii* in mice. **Parasitology Research**, v. 105, p. 267-274, 2009.

LIESENFELD, O.; WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett, J. G., Merigan, T. C., Bolognesi, D. **Textbook of AIDS medicine**, 2^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

LUFT, B. J. *Toxoplasma gondii*. In: Walzer, P. D., Genta, R. M. **Parasitic infections in the compromised host**. New York: Marcel Dekker, p. 179-279, 1989.

LUFT, B. J.; HAFNER, R. KORZUN, A. H. ET AL. Toxoplasmosis encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p. 995-1000, 1993.

McLEOD, R.; BOYER, K. Management of and outcome for the newborn infant with congenital toxoplasmosis. In: Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E. et al.. **Congenital toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control**. Paris: Springer-Verlag, p. 189-213, 2000.

MERCIER, C.; ADJOGBLE, K. D. Z.; DAUBENER, W.; CESBRON-DELAUW, M. F. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 829-849, 2005.

MERCIER, C.; CESBRON-DELAUW, M. F.; SIBLEY, L. D. The amphipatic alpha helices of the Toxoplasma protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. **Journal of Cell Science**, v. 11 p. 2171-2180, 1998.

MERCIER, C.; HOWE, D. K.; MORDUE, D.; LINGNAU, M.; SIBLEY, L. D. Targeted disruption of the GRA2 locus in Toxoplasma gondii decreases acute virulence in mice. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 4176-4182, 1998.

MILLER, C.M.; BOULTER, N.R.; IKIN, R.J.; SMITH, N.C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Parasitology**, v. 39, p. 23–39, 2009.

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

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves Major Surface Protein, SAG1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MORDUE, D. G.; DESAI, N.; DUSTIN, M., SIBLEY, L. D. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, p. 1783-1792, 1999.

MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygens intermediates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 150, p. 938-949, 1979.

NAGASAWA, H.; MANABE, T.; MAEKAWA, Y.; OKA, M.; HIMENO, K. Role of L3T4+ and Lyt-2+ T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Immunology**, v. 35, p. 215-222, 1991.

NAM, H. W. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of Host-Parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. **Korean Journal Parasitology**, v. 47, supplement S29-S37, 2009.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L. Cytoeskeleton of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Protozoology**, v. 34, p. 217-226, 1987.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L. PRAVESIO, C. E. N. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. . **The Journal of Protozoology**, v. 80, p. 81-98, 1994.

NIELSEN, H. V.; SCHIMIDT, D. R.; PETERSEN, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by two-dimensional immunoblot differentiation of mother and child IgG profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 711-715, 2005.

O'CONNEL, E; WILKINS, M. F; TEPUNGA, W. A. Toxoplasmosis in sheep. II. The ability of a live vaccine to prevent lamb losses after an intravenous challenge with *Toxoplasma gondii*. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 36, p. 1-4, 1988.

OGINO, N.; YONDEDA, C. The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. **Archives of Ophthalmology**, v. 75, p. 218-227.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 214-223, 2007.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S. ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dyoxigenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon Research**, v. 6, p. 267-279, 1986.

POLLARD, A.M.; KNOLL, L.J.; MORDUE, D.J. The role of specific *Toxoplasma gondii* molecules in manipulation of innate immunity. **Trends in Parasitology**, v. 25, p. 491-494, 2009.

PORTER, S. B.; SANDE, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.327, p. 1643-1648, 1992.

PRIGIONE, I.; FACCHETTI, P.; LECORDIER, L.; DESLÉE, D.; CHIESA, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PISTOIA, V. T Cell Raises from Chronically Infected Healthy Humans by Stimulation with *Toxoplasma gondii* Excretory-Secretory Antigens Cross-React with Live Tachyzoites: Characterization of the Fine Antigenic Specificity of the Clones and Implications for Vaccine Development. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 3741-3748, 200.

RADKE, J. R.; WHITE, M. W. A cell cycle model for the tachyzoite of *Toxoplasma gondii* using the Herpes simplex virus thymidine kinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 94, p. 237-247, 1998.

REMYINGTON, J. S.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S., Klein, J. O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**, 3^a ed. Philadelphia: W B Saunders, p. 140-267, 1995.

REMYINGTON, J. S.; McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTES, G.; Toxoplasmosis. In :Remington JS, Klein OJ, editors. **Infectious disease of the fetus and newborn infant**, 5^a ED.. Philadelphia: WB Saunders, p. 205-346, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. 856p.

RIBEIRO, D.P; FREITAS, M.M. P.; CARDOSO, M. R. D.; PAJUABA, A. C. A. M.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.. CpG-ODN combined with Neospora caninum lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 2570-2579, 2009.

ROY, A.; KUCUKURAL, A.; ZHANG, Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. **Nature protocols**, v. 5, p. 725-738, 2010.

SCHKUTER, D.; DECKERT-SCHLUTER, M.; LORENZ, E.; MEYER, T.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*- susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3512-3518, 1999.

SCHWAB, J. C.; BECKERS, C. J. M.; JOINER, KA. The parasitophorous vacuole membrane surrounding intracellular *Toxoplasma gondii* functions as a molecular sieve. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 509-513, 1994.

SHARMA, S. D.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against

lethal infection with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 2818-2820, 1984.

SHARMA, S. D.; HOFFLIN, J. M.; REMINGTON, J. S. In vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 4160-4163, 1985.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O. N.; PODTELEJNIKOV, A. V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 1440-14445, 1996.

SIBLEY, L. D.; PFEFFERKORN, E. R.; BOOTHROYD, J. C. Proposal for a uniform genetic nomenclature in *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 7, p. 327-328, 1991.

SIBLEY, L. D.; NIESMAN, I. R.; PARMLEY, S. F.; CESBRON-DELAUW, M. F. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to formation of a tubulo-vesicular network in host cells vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 1669-1677, 1995.

SIDHU, S. S. Engineering M13 for phage display. **Biomolecular Engineering**, v.18, p.57-63, 2001.

SILVA, D. A. O.; LOBATO, J.; MINEO, T. W. P.; MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 234-244, 2007.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Chemical Reviews**, v. 97, n. 2, p.391-410, 1997.

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E. S.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R. C. Organização estrutural do taquizoíto de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, p. 131-143, 2010.

STEPHEN, C. W.; HELMINEM, P.; LANE, D.P. Characterization of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: insights into antibody-peptide interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 248, p. 58-78, 1995.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 79. p. 237-248, 1973.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D. REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516-518, 1988.

SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+, L3T4+ T cells in mice. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 3943-3946, 1988.

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

TEO, F. C.; ZHOW, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine Protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, p. 679-688, 2007.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some

applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76. p. 4350-4356, 1979.

TRAVIER, L.; MONDRAGON, R.; DUBREMETZ, J. F.; MUSSET, K.; MONDRAGON, M.; GONZALEZ, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; MERCIER, C. Functional domains of the *Toxoplasma gondii* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 757-773, 2008.

WAHAB, T.; EDVINSSON, B.; PALM, D.; LINDH, J. Comparison of the AF146527 and B1 Repeated Elements, Two Real-Time PCR Targets Used for Detection of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 591-592, 2010.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299-316, 1993.

XUE, M.; HE, S.; CUI, Y.; YAO, Y.; WANG, H. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. **Parasitology International**, v. 57, p. 424-429, 2008.