



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia molecular

Área de Concentração: Genômica funcional, estrutural e proteômica

**TRIAGEM *IN SILICO* DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA
*TOXOPLASMA GONDII***

MOISÉS MORAIS INÁCIO

Goiânia, 2018

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Moisés Morais Inácio

Título do trabalho: TRIAGEM *IN SILICO* DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA *TOXOPLASMA GONDII*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)

Data: 05 / 04 / 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia molecular
Área de Concentração: Genômica funcional, estrutural e proteômica

**TRIAGEM *IN SILICO* DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA
*TOXOPLASMA GONDII***

Discente: Moisés Moraes Inácio

Orientador: Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora para defesa do título de mestre em Genética e Biologia Molecular do sob regulamentação do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia molecular ICB-UFG.

Goiânia, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Moirais Inácio, Moisés

TRIAGEM IN SILICO DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA
TOXOPLASMA GONDII [manuscrito] / Moisés Moirais Inácio. - 2018.
91 f.

Orientador: Prof. Juliano Domiraci Paccez; co-orientador Pedro
Vitor Lemos Cravo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Genética
e Biologia Molecular, Cidade de Goiás, 2018.

1. Vacinologia reversa. 2. imunômica. 3. bioinformática. I. Domiraci
Paccez, Juliano , orient. II. Título.

CDU 575



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 058

Aos seis dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito (08/03/2018), às 14hs00min, no (a) Auditório do ICB IV, reuniram-se os componentes da banca examinadora: **Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez, Profa. Dra. Ana Maria de Castro e Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha** para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"Construção de uma vacina de subunidade contra a toxoplasmose por estratégia imunômica associada a vacinologia reversa"**, em nível de mestrado, área de concentração em **Genética e Biologia Molecular**, de autoria de **MOISÉS MORAIS INÁCIO**, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em cerca de 28 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu o examinado, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº 1294/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, a dissertação foi APROVADO, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para constar, eu,



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Clayton L. Borges, Coordenador do PGBM do Instituto de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez
Presidente da Banca
UFG/GO

Profa. Dra. Ana Maria de Castro
UFG/GO

Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha
UFG/GO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 058

TÍTULO DO TRABALHO: **"Construção de uma vacina de subunidade contra a toxoplasmose por estratégia imunômica associada a vacinologia reversa".**

AUTOR (A): MOISÉS MORAIS INÁCIO

DISSERTAÇÃO Nº 058 DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR, DEFENDIDA E APROVADA EM SESSÃO PÚBLICA, NA DATA DE 06 DE MARÇO DE 2018, ÀS 14hs00min, NO (A) Auditório do ICB IV DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFG, CUJA BANCA EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTE PROFESSORES:

 Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez Universidade Federal de Goiás	
 Profa. Dra. Ana Maria de Castro Universidade Federal de Goiás	 Prof. Dr. Thiago Lopes Rocha Universidade Federal de Goiás

HOVE MUDANÇA NO TÍTULO? SIM (X) NÃO ()

CASO HAJA MUDANÇA, ESCREVER ABAIXO O NOVO TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"TRIAGEM IN SILICO DE CANDIDATOS VACINAIS CONTRA *Toxoplasma gondii*"

OBS: O título na dissertação impressa deve corresponder exatamente ao que se encontra na ata.

GOIÂNIA (GO) 06/03/2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos que me foram concedidas, por sua imensa bondade e a nossa mãe, Maria Santíssima, por sua constante intercessão.

Ao Prof. Dr. Juliano Domiraci Paccez, por todo o esforço para o meu crescimento, não só nas questões acadêmicas, mas também pessoais. Por todos os conselhos e por ser tão otimista em relação às minhas habilidades pessoais e profissionais.

Ao Prof. Dr. Pedro Vitor Lemos Cravo por ter me ensinado que o esforço e a dedicação na pesquisa não se resumem a artigos publicados, mas na resolução dos problemas da sociedade: “Resultados positivos podem salvar vidas”.

A toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás (LBM-ICB/UFG), de modo especial ao Prof. Dr. Clayton Luiz Borges pela receptividade e constante solicitude. À Prof^a. Dr^a. Célia Maria de Almeida Soares por abrir as portas do laboratório e pelo seu apoio financeiro para a realização do projeto. E, com muito afeto e carinhos, agradeço aos estudantes por todo apoio, atenção e disposição em ajudar, de modo especial à doutoranda Lana Ohara Souza Silva que me acompanhou e ensinou toda a parte experimental.

Aos meus pais, Vicente José Inácio e Oseni de Souza Moraes, por toda dedicação, estímulo, carinho, valores morais, e por me ensinarem que o tesouro da vida não é o que temos, mas as pessoas que amamos. Aos meus irmãos, Genilson Moraes Inácio, Gecione Moraes Inácio, Vinício Moraes Inácio e Alex Moraes Inácio, pela amizade, admiração e por torcerem pelas minhas conquistas até mais que eu mesmo.

À minha grande companheira, namorada-amiga, Giuliane Meira Brandão Delucca por todo carinho, compreensão, cuidado e esforço para que eu conseguisse completar bem todas as minhas atividades. Agradeço também aos seus pais, Bernardo Moreira Delucca e Maria Elizabeth Meira Brandão Delucca por todos os conselhos e apoio, à sua irmã Giovanna Meira Brandão Delucca por seu constante entusiasmo com as questões acadêmicas. E de forma singela, documentar o meu agradecimento à essa família que tanto me fez bem e sempre tem tido o desejo sincero pelo meu bem-estar pessoal e profissional.

A toda família da Paróquia São João Evangelista, irmãos de fé e fiéis companheiros. De modo especial, aos meus irmãos do acolitado pelas orações e a Celina Nasser Galante

Elias que sempre me acompanhou na minha trajetória, apoiando, torcendo e se emocionando por cada conquista alcançada.

Aos meus amigos (as) e irmãos (as), Oton Luiz Rebeiro Aguiar, Arthur de Carvalho e Silva, Venâncio Arruda Coelho, e Magno Valim Marcena, pelas conversas, o companheirismo, apoio e a amizade incomparável.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Toxoplasma gondii é o agente etiológico da toxoplasmose congênita, que pode se manifestar como coriorretinite leve, aborto espontâneo, retardo mental, microcefalia, hidrocefalia e convulsões. O tratamento dessa doença é limitado e uma nova vacina representaria a melhor estratégia para a prevenção da infecção. No presente estudo, adotamos a vacinologia reversa associada a imunômica foi aplicada na construção de uma vacina contra *T. gondii*. Utilizando uma abordagem *in silico*, selecionamos as proteínas do patógeno que possuem peptídeo sinal e domínio transmembranar utilizando o banco de dados no *ToxoDB*®. Avaliamos a homologia dessas proteínas com o proteoma humano e predizemos os epítomos utilizando as ferramentas *Blastp*, *NetMHCpan 3.0* e *NetMHCIIpan 3.1*. Os alelos de HLAs de classe I e II com frequência $\geq 1\%$ na população da América do Sul, América do Norte e Europa foram obtido através do banco de dados *dbMHC*. O processamento dos epítomos de MHC de classe I foram avaliados pelo *MHC I Processing* no banco de dados *IEDB*® e os epítomos de linfócitos B foram obtidos através dos servidores *Bcpred* e *BCTOPE*. Por fim, a antigenicidade dos potenciais alvos foi analisada pelo servidor *VAXiJen*. Um total de 1228 proteínas foi obtido, das quais 349 não apresentaram homologias em humanos. Para a população sul-americana, entre as proteínas com epítomos promíscuos identificadas, observamos proteínas que fazem parte do arsenal de virulência do patógeno tais como ROP8, ROP7, ROM4, cathepsin C/B, *rhoptry neck protein* e *LMBR1 family region protein*. Em relação às populações norte-americana e europeia, a identificação de epítomos promíscuos revelou proteínas comuns às duas populações tais quais MIC15, ROP7, *HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein* e *rhoptry neck protein* e exclusivas à população norte americana, como ROP31 e subtilisina SUB2. Essas proteínas estão envolvidas no processo de invasão e/ou foram positivas em todos os parâmetros adotados neste estudo. Com relação aos epítomos de linfócitos B, obteve-se 93 proteínas, dentre elas, ROP7, ROP8, ROM4, MIC15, HECT que também apresentaram epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II das populações analisadas. Além delas, MIC2, ROM5, ROP9, MIC8 e MIC9 também apresentaram epítomos de linfócitos B, mas MIC9 destacou-se com o maior score; pela elevada expressão no estágio de bradizoíto e pela inexistência de testes vacinais. ROP7, ROP8, ROM4, MIC8 e MIC9 foram selecionadas para teste in vivo e in vitro. Dessa forma, nossos resultados demonstram que vacinologia reversa associada a imunômica mostrou-se capaz de identificar fortes candidatos vacinais contra patógenos de ciclo vida complexo.

Palavras chave: Vacinologia reversa; imunômica; bioinformática

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is the causative agent of congenital toxoplasmosis, which manifests as mild chorioretinitis, miscarriage, mental retardation, microcephaly, hydrocephalus, and seizures. Treatment of this disease is limited and a new vaccine represents the best strategy for prevention of the infection. In the present study, the reverse vaccinology combined with immunomics was applied for the development of a vaccine against *T. gondii*. Using an *in silico* approach, we identified *T. gondii*'s proteins that contain signal peptide and transmembrane domain using the ToxoDB® database. We evaluated the homology of these proteins with the human proteome and predicted their epitopes using Blastp, NetMHCpan 3.0 and NetMHCIIpan 3.1 tools. Class I and II HLA alleles with frequency greater than 1% in the population of South America, North America and Europe were obtained using the dbMHC database. Processing of the MHC class I epitopes were evaluated by *MHC I Processing* on the IEDB® database and the B lymphocyte epitopes were obtained through the Bcpred and BCTOPE servers. Finally, the antigenicity of the potential targets was analyzed by the VAXiJen server. A total of 1228 protein were obtained, from which 349 showed no homology with human proteins. For the South American population, among the proteins identified with promiscuous epitopes, we observed proteins that are part of the virulence arsenal of the pathogen such as ROP8, ROP7, ROM4, Cathepsin C / B, rhoptry neck protein and LMBR1 family region protein. In the North American and European populations, we identified common proteins to both populations, such as MIC15, ROP7, HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein and rhoptry neck protein. ROP31 and subtilisin SUB2 are exclusive to the North American population. These proteins are involved in the invasion process and were shown to be positive in all the parameters adopted in this study. Regarding B lymphocyte epitopes, proteins such as ROP7, ROP8, ROM4, MIC15, HECT were identified. These proteins also presented promiscuous epitopes to class I and II HLAs from the analyzed populations. In addition, MIC2, ROM5, ROP9, MIC8, and MIC9 also showed B lymphocyte epitopes, but MIC9 was noteworthy with the highest score, high expression in the bradyzoite stage, and lack of vaccine test. ROP7, ROP8, ROM4, MIC8 and MIC9 were selected for in vivo and in vitro testing. Thus, our results demonstrate that immunochemical reverse vaccination has been shown not only to identify potential vaccine candidates against pathogens with complex life cycles.

Key words: Reverse vaccinology; immunomics; bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i>	6
Figura 2 - Estrutura molecular do receptor de MHC de classe I e de II.	16
Figura 3 - Ferramentas de predição de epítomos do IEDB.	23
Figura 4 - Fluxograma de trabalho em Vacinologia Reversa.	28
Figura 5 - Fluxograma de trabalho executado neste projeto.	34
Figura 6 - Representação esquemática dos resultados obtidos nesse estudo.	40
Figura 7- Localização celular das proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> com peptídeo sinal e domínio transmembranar selecionadas nesse estudo através do <i>ToxoDB</i>	41
Figura 9 - Distribuição das proteínas entre as cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> depositadas no <i>ToxoDB</i>	42
Figura 10 - Proteínas com epítomos promíscuos comuns entre as diferentes populações.	52
Figura 11 - Característica funcionais e de interesse médico das proteínas comuns as diferentes populações.	Error! Bookmark not defined.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de referência de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Tabela 2 - Variação geográfica das cepas de <i>Toxoplasma gondii</i>	8
Tabela 3 - Definições de casos de infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> em gestantes segundo o Ministério da Saúde 2013.	12
Tabela 4 - Banco de dados de epítomos, alergênicos e frequência alélicas dos HLAs.	21
Tabela 5 - Ferramentas de predição de epítomos para linfócitos T.	25
Tabela 6 - Ferramentas de predição de epítomos de linfócito B.	27
Tabela 7- Cepas atípicas do <i>Toxoplasma gondii</i> depositadas no ToxoDB.	35
Tabela 8 - Controle positivo para a predição do TAP e imunoproteassoma.	43
Tabela 9 - Alvos vacinais contra <i>Toxoplasma gondii</i> selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população da América do Sul.	45
Tabela 10 - Alvos vacinais contra <i>Toxoplasma gondii</i> selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população da América do Norte.	47
Tabela 11 - Alvos vacinais contra <i>Toxoplasma gondii</i> selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população europeia.	49
Tabela 12 - Definição do score para a predição de epítomos de célula B.	50
Tabela 13 - Epítomos descontínuos preditos para os linfócitos B.	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relatos de ocorrência de surtos de toxoplasmose no Brasil.	4
Quadro 2 - Quantidade de alelos de MHC de classe I e II com frequência ≥ 1 das populações da América do Sul, América do Norte e Europa, dados obtidos a partir da base de dados <i>dbMHC</i>	42
Quadro 3 -Números de ligações preditas dos antígenos vacinais HBsAg, toxina diftérica e tetânica aos alelos selecionados das populações analisadas.....	43

LISTA DE ABREVIACÕES

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ANN	<i>Artificial neural network</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
CD4+	<i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8+	<i>Cluster of Differentiation 8</i>
Clag	<i>Cytoadherence linked asexual gene</i>
CLIP	<i>Class II-associated invariant chain peptide</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN- γ	<i>Interferon Gama</i>
IgG	<i>Immunoglobulina G</i>
IgM	<i>Immunoglobulina M</i>
IL-12	<i>Interleucina-12</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein-2</i>
MPC-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MYD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NK	<i>Natural killer</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PSSM	<i>Position-specific scoring matrix</i>
SVM	<i>Support vector machine</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TH1	<i>linfócito T helper 1</i>
TLR 11	<i>Toll Like Receptor 11</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1	<i>Toxoplasma gondii</i> : Características gerais.....	2
2.1.1	Epidemiologia.....	3
2.1.2	Ciclo de vida.....	5
2.1.3	Diversidade genética e distribuição geográfica de <i>Toxoplasma gondii</i>	7
2.2	Toxoplasmose: A Doença	9
2.2.1	Toxoplasmose sintomática	9
2.2.2	Toxoplasmose Ocular	9
2.2.3	Toxoplasmose congênita	10
2.2.4	Diagnóstico.....	11
2.2.5	Tratamento	13
2.3	Sistema imune humano	13
2.4	Resposta imune ao <i>Toxoplasma gondii</i>	19
2.5	Vacinologia	20
2.5.1	Imunômica e imunoinformática	20
2.5.2	Ferramentas de predição de epítomos para linfócito T	23
2.5.3	Ferramentas de predição epítomos para linfócito B	26
2.5.4	Vacinologia reversa	27
2.6	Avanços e desafios em uma vacina contra <i>Toxoplasma gondii</i>	29
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVO GERAL.....	33
4.1	Objetivos específicos	33
5	MATERIAS E MÉTODOS	34
5.1	Construção da biblioteca de proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i>	35
5.1.1	Identificação das proteínas com domínio transmembranar e peptídeo sinal.....	35
5.1.2	Análise da similaridade entre as proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> e as de humano	35
5.2	Determinação dos alelos de HLAs de classe I e II mais frequentes	36
5.3	Predição de epítomos promíscuos para HLAs de classe I.....	36

5.4	Predição de processamento e transporte pelo transportador associado ao processamento de antígenos	37
5.5	Predição de epítomos promíscuos para HLAs classe II.....	37
5.6	Predição dos epítomos para MHC de classe I e II de camundongos	38
5.7	Predição de epítomos contínuos de células B.....	38
5.8	Predição de epítomos descontínuos de células B	38
5.9	Predição da antigenicidade dos epitomos.....	39
5.10	Busca na literatura de informações sobre as proteínas selecionadas	39
6	RESULTADOS	39
6.1	Identificação <i>in silico</i> de proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> com domínio transmembranar e peptídeo sinal	41
6.2	Identificação <i>in silico</i> dos alelos de HLAs mais frequente na população da América do Sul, América Norte e Europa.....	42
6.3	Definição <i>in silico</i> dos epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II	43
6.3.2	Epítomos preditos para a população da América do Sul	44
6.3.3	Epítomos preditos para a população da América do Norte.....	46
6.3.4	Epítomos preditos para a população Européia	48
7	Predição de epítomos de <i>Toxoplasma gondii</i> preditos para linfócitos B.....	50
7.1	Score adotado para predição de epítomos de células B	50
7.2	Epítomos preditos de células B	51
7.3	Proteínas positivas em diferentes populações	52
8	DISCUSSÃO	53
8.1	Característica das proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> selecionada para o estudo de predição de epítomos de células B e T.....	53
8.2	Alelos de HLAs da população da América do Sul, América do Norte e Europeia usados nesse estudo.....	54
8.3	Aspectos gerais na definição de epítomos promíscuos aos HLAs para o desenvolvimento de uma vacina contra <i>Toxoplasma gondii</i>	54
8.4	Correlação entre o score do processamento dos epítomos promíscuos pela via de MHC de classe I e a antigenicidade do epítomo.....	55
8.4.1	A promiscuidade das proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> entre as populações da América do Sul, América do Norte e Europa	56
8.5	Vantagens da abordagem de predição de epítomos de células B empregada nesse estudo	58

8.6	Proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> apresentam epítomos promíscuos aos HLAs e de classe I e II e epítomos de célula B	58
8.7	Proteínas de <i>Toxoplasma gondii</i> selecionadas para a expressão heteróloga	59
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
10	PERSPECTIVAS.....	61
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii foi identificado pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux em um roedor norte-africano, o gundi (Nicolle & Manceaux 1909), e concomitantemente em coelho no Brasil por Splendore no mesmo ano (Splendore 1908). O nome *Toxoplasma gondii* foi proposto por Nicolle e Manceaux com base na forma do estágio infeccioso (toxon: arco ou curvo, plasma: vida; gondii pode ter resultado de uma falta de ortografia do hospedeiro original, o gundi - *Ctenodactylus gundi*) (Dubey 2008).

Atualmente, *T. gondii* é conhecido por ser um importante agente causador de contaminação alimentar, apresenta caráter oportunista em pacientes imunocomprometidos e por sua capacidade em causar doença congênita com graves sequelas neurológicas e oculares sob uma incidência de aproximadamente 190,100 casos relatados a cada ano (Torgerson & Mastroiacovo 2013). Contudo, a gravidade das lesões fetais dependem do período gestacional em que ocorre a infecção, variando desde assintomática até o aborto (Olariu et al. 2011). No entanto, o tratamento da infecção é limitado e o diagnóstico fetal possui dificuldades em razão da imunidade passiva do feto e também por haver a possibilidade de uma reinfecção (Elbez-Rubinstein et al. 2009).

Infelizmente a vacinologia tradicional, baseada nos princípios de Pasteur que consiste em “isolar, inativar e injetar o micro-organismo”(Plotkin 2009), não foi eficaz na construção de vacinas contra *T. gondi* (Liu et al. 2012), bem como *Plasmodium* sp (Sissoko et al. 2017), *Trypanosoma* sp (Rodríguez-Morales et al. 2015), *Leishmania* sp (Kedzierski 2010), *Schistosoma* (Tebeje et al. 2016), uma vez que esses parasitos apresentam ciclo de vida complexo e reúnem características fisiopatológicas intrínsecas que são limitantes para o desenvolvimento de uma vacina pelo método tradicional.

No entanto, a preocupação que acompanha os dados dessas patologias, não só no contexto de *T. gondii* mas também dos outros protozoários patogênicos, tem impulsionado a comunidade científica a empregar grandes esforços no desenvolvimento de novas técnicas e de novas abordagens vacinais. A era pós genômica e seus avanços, tanto no conhecimento sobre os genomas dos patógenos como sobre as interações com o sistema imune do hospedeiro, impulsionaram a ciência a revolucionar a vacinologia tradicional (Zepp 2010).

Com a avalanche de dados gerados pela facilidade em sequenciar genomas, ocorreu o surgimento de novas ciências como a imunômica estuda a regulação do sistema imunológico e a resposta a agentes patogênicos usando abordagens genômicas. Por conseguinte, desenvolveu-se a imunoinformática que é a aplicação de técnicas de bioinformática à moléculas do sistema imunológico, buscando armazenar e analisar dados gerados sobre a resposta imunológica (Tomar & De 2014) , o que possibilitou a construção de um novo arsenal de ferramentas de predição de epítomos de células B e T, auxiliando no desenvolvimento de vacinas, diagnóstico e tratamento de doenças (Braga-Neto & Marques 2006, Zhang et al. 2008, Desai & Kulkarni-Kale 2014).

Esse apanhado de ferramentas de imunoinformática tornou o processo de construção de vacinas mais racional, trazendo para a vacinologia uma metodologia reversa à tradicional em que é possível descobrir por análises *in silico* qual é o antígeno mais imunogênico, ou seja, o que mais induz a resposta imune, antes mesmos de testá-lo em animais modelos.

Dessa forma, associando a vacinologia reversa à imunômica, o presente trabalho buscou a identificação de novos alvos vacinais contra diferentes genótipos de *Toxoplasma gondii*, através de um novo método de seleção de antígenos baseado na ligação aos receptores de HLAs (do inglês, *Human Leukocyte Antigen*) mais frequentes nas populações da América do Sul, América do Norte e Europa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Toxoplasma gondii*: Características gerais

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório que apresenta distribuição mundial e ampla gama de hospedeiros, podendo infectar todos os animais de sangue quente, incluindo seres humanos (Dubey 2009). A infecção humana pode ocorrer por diferentes vias; seja pelo contato com as fezes de felídeos contaminados, que são os hospedeiros definitivos (Yilmaz & Hopkins 1972, Robert-Gangneux & Dardé 2012) ou pelo consumo de carnes cruas ou mal cozidas, verduras e legumes crus, bem como água contaminada com os oocistos e transfusão de sangue (Guo et al. 2015). Além disso, a toxoplasmose pode ocorrer durante a gestação e atingir o feto, caracterizando a toxoplasmose congênita, considerada uma via de transmissão importante para *T. gondii* e pode ocorrer na maioria das espécies de animais incluindo os seres humanos (Rodríguez-Morales et al. 2015).

2.1.1 Epidemiologia

Estima-se que um terço da população mundial seja soropositiva para a infecção por *T. gondii*. No entanto, essa prevalência é variável e depende de fatores climáticos, socioeconômicos, culturais (Pappas et al. 2009) e até mesmo antropológicos como a idade e sistema imunológico (Wilking et al. 2016, Bahia-Oliveira, L., Gomez-Marin, J., and Shapiro 2017).

De modo geral, a distribuição da toxoplasmose é global, mas são poucos os estudos de levantamento epidemiológico dessa patologia e na maioria das vezes são trabalhos isolados ou revisão sistemática da literatura associada a predição reversa de prevalência.

Sabe-se que nos Estados Unidos da América e no Reino Unido a prevalência de soropositividade descrita na literatura fica em torno de 11 a 40 %. Já na Europa ocidental essa prevalência fica em torno de 11 a 67 %, mas é dependente dos países em que a pesquisa foi realizada. Na Rússia, onde o clima não é favorável, a prevalência descrita foi de 13.4 % em crianças de 6 a 12 anos (Janse et al. 2014) e recentemente descrita em 25.39 % na população de Moscou (Stepanova et al. 2017). No continente africano, a prevalência ultrapassa 50 % da população em alguns países. Uma variação de 40-60 % foi relatada no norte da África e Oriente Médio, incluindo países como Marrocos, Tunísia, Egito, Líbano, Jordânia, Iraque e Irã, enquanto que prevalências mais baixas de 20-40 % foram relatadas na Arábia Saudita, Bahrein e Qatar (Aoun 2014). Na Ásia, as taxas de infecção variam de menos de 10 % em algumas regiões da China para mais de 60 % em Mainao nas Filipinas (Pappas et al. 2009). No Brasil, pode-se encontrar uma prevalência de até 70% e frequentemente são identificados surtos de infecção por *T. gondii* (Quadro 1). O mais famoso talvez seja o de Santa Isabel do Ivaí, Paraná ocorrido entre 2001 e 2002 com mais de 426 pacientes de sorologia indicativa de toxoplasmose aguda. O surto ocorreu em virtude da contaminação de um reservatório de água da cidade que apresentava contaminação por oocistos de fezes de gatos jovens que habitavam o local (Almeida et al. 2011).

Quadro 1 - Relatos de ocorrência de surtos de toxoplasmose no Brasil.

Nº de casos	Local	Ano	Referência
426	Santa Isabel do Ivaí, Paraná	2002	(Almeida et al. 2011)
40	Almeirim, Pará	2004	(Carmo et al. 2010)
30	Cuiabá, Mato Grosso	2011	(Prefeitura de Cuiabá 2011)
73	Ponta de Pedras, Pará	2013	(Morais et al. 2016)
41	Londrina, Paraná	2015	(Secretaria de Saúde do Estado do Paraná - RS 2015)
154	São Marcos, Rio Grande do Sul	2015	(Prefeitura de São Marcos/RS 2015)

Em relação à prevalência de sororeatividade em gestantes, a porcentagem se mantém acima de 50 % em diferentes regiões do Brasil. Um estudo realizado em Caxias, Maranhão, encontrou uma prevalência de 77,9 % das gestantes atendidas em dois centro de referência em gestação de alto risco soropositivas contra *T. gondii* (Câmara et al. 2015). Com relação a região Centro-Oeste do país, foi encontrado uma prevalência de 67,7 % em Goiânia - Goiás em 2008 (Sartori et al. 2011). Quanto a incidência, um estudo de Coorte retrospectivo realizado no Sul do Brasil em um hospital universitário de Porto Alegre – Rio Grande do Sul, no período de abril de 2004 a dezembro de 2014, encontrou uma incidência de toxoplasmose congênita variando de 0-14,06 para 10.000 nascidos vivos com 85,7% de casos sintomáticos (Bischoff et al. 2014).

No Brasil, foi estimado que as infecções por *T. gondii* são responsáveis por até 30% das uveítes infecciosas no país, 2% de coriorretinite na região norte e 25% na região sul. No estado de Minas Gerais, um estudo de coorte realizado entre 2006 a 2007 demonstrou uma prevalência 80% de toxoplasmose ocular nos recém-nascidos (Vasconcelos-Santos et al. 2009). Outro levantamento produzido pelo Conselho Brasileiro de Oftalmologia publicado no livro “Prevenção da Cegueira e Deficiência Visual na Infância” destaca que 14-40% das causas de cegueira em crianças no país são consequência da infecção por *T. gondii* (Zin & Carvalho 2016).

Felizmente, em 2016 a toxoplasmose gestacional e congênita voltou a compor a lista de notificação compulsória pela Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016 que define a Lista

Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional. No entanto, os dados epidemiológicos ainda não estão passíveis ao acesso.

2.1.2 Ciclo de vida

T. gondii possui um ciclo de vida extremamente complexo que envolve dois ciclos distintos, um sexuado e outro assexuado. O ciclo de vida sexuado tem início quando os felídeos, que são os hospedeiros definitivos, se contaminam com a ingestão de bradizoítos ou oocistos. No intestino desses animais, o parasito invade o epitélio intestinal e sofre esquizogonia (divisão nuclear, seguida da divisão do citoplasma) (Dubey & Frenkel 1972, Blader et al. 2015). Passados dois dias nas células do intestino (enterócito), ele se diferencia em merozoíta, o primeiro estágio sexual. O merozoíta por sua vez se diferencia em macrogametas e microgametas que se fundem para formar o oocisto diploide que desenvolve uma membrana impermeável e é eliminado nas fezes. Os oocistos amadurecem no meio externo, depois de dois a cinco dias em presença de oxigênio, apresentam no seu interior dois esporocistos, cada qual com quatro esporozoítos (Yilmaz & Hopkins 1972, Blader et al. 2015). A figura 01 apresenta de maneira esquemática o ciclo de vida desse organismo.

No hospedeiro intermediário, onde ocorre o ciclo assexuado, 12 horas após a inoculação, os esporozoítas se diferenciam em taquizoítas e iniciam a replicação por endogenia. Após a replicação, a célula parasitada se rompe e *T. gondii* é disseminado por todo o organismo. Eventualmente, a pressão do sistema imune, associado a outros fatores desconhecidos, influenciam a diferenciação em bradizoítas e consequente formação dos cistos, que podem persistir por décadas nos músculos e nos tecidos do sistema nervoso central, caracterizando a fase crônica da infecção (Figura 01) (Speer & Dubey 1998, NEVES 2011).

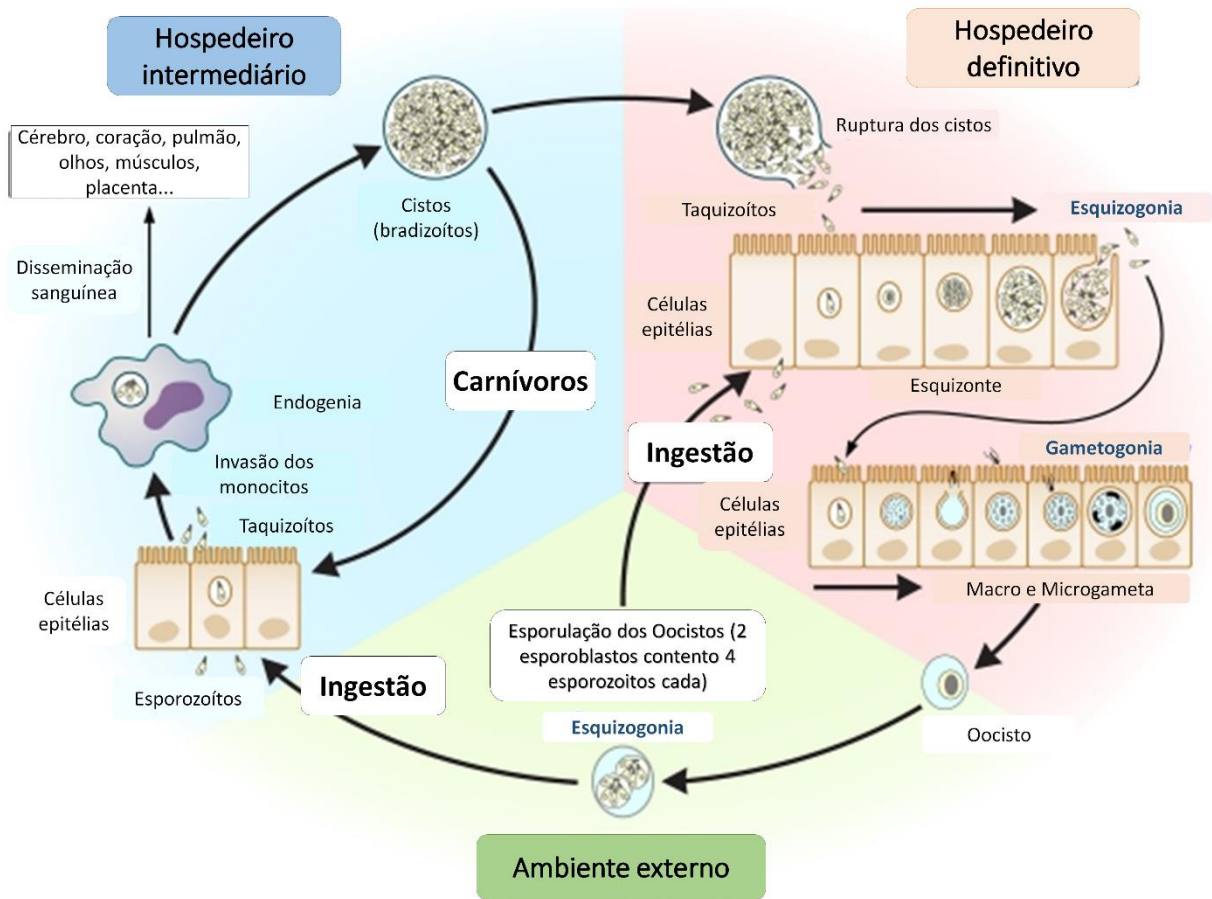


Figura 1- Representação esquemática do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*. No hospedeiro definitivo, após a ingestão dos oocistos ou cisto de bradizoítos, os esporozoítos invadem as células do epitélio intestinal e realizam esquizogonia. Os esquizontes invadem novamente o epitélio intestinal e sofrem gametogonia com a produção de macro e microgameta que se fundem para formar o oocisto diploide. O oocisto desenvolve uma membrana impermeável e é eliminado no meio ambiente através das fezes. De dois a três dias no meio ambiente, os oocistos tornam-se infectantes e podem ser ingeridos pelo hospedeiro intermediário. No intestino dos hospedeiros intermediários, os esporozoítos invadem as células do epitélio intestinal e realizam endogenia, rompem as células, liberando novos taquizoítos que invadirão novas células em diferentes tecidos. Em consequência a resposta imune do hospedeiro contra a infecção, os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos caracterizando a fase crônica da infecção (Adaptado de Robert-Gangneux & Darde 2012).

2.1.3 Diversidade genética e distribuição geográfica de *Toxoplasma gondii*

T. gondii possui um genoma com 63 Mb constituído por 14 cromossomos e apresenta uma baixa diversidade genética entre os seus isolados. Análises genotípicas realizadas em 35 isolados da América do Norte e da Europa sugeriram a presença de uma população clonal, onde a maioria dos isolados (>94 %) pertencem a três tipos clonais, referidos como tipos I, II e III (Tabela 1) (Howe & Sibley 1995).

Tabela 1 - Cepas de referência de *Toxoplasma gondii*.

Cepa	Tipo	Data de isolamento	Local	Hospedeiro	Referência
GT1	I	1980	EUA	Cabra	(Dubey 1980)
RH	I	1939	EUA	Humano	(Sabin 1941)
ME49	II	1958	EUA	Ovelha	(Kaufman et al. 1959)
VEG	III	1988	EUA	Humano	(Parmley et al. 1992)

Fonte: Adaptado de Alruhaili, 2015. (Alruhaili 2015)

No entanto, ao analisar isolados da América do Sul, Ásia e África, foram identificadas cepas que apresentam alelos diferentes daqueles encontrados nas cepas clássicas de *T. gondii*. Essas cepas foram denominadas cepas recombinantes por apresentarem alelos que surgiram da recombinação entre alelos clássicos e cepas atípicas por apresentarem uma nova variedade alélica (Dardé 2008) (Tabela 2).

O crescente surgimento de cepas atípicas ou recombinantes é um fator preocupante nas medidas de controle da toxoplasmose. De fato, novas variantes foram identificadas nos últimos quatro surtos recentes de toxoplasmose aguda em seres humanos ocorrido no Canadá, Brasil, Suriname e Guiana Francesa (Carme et al. 2009, Grigg & Sundar 2009, Vaudaux et al. 2010, Demar et al. 2012). Além do mais, estão associadas como causa de doenças debilitantes, especialmente sob a forma de doença ocular recorrente que pode levar à cegueira em adultos saudáveis (Khan et al. 2006, Bottos et al. 2009).

Tabela 2 - Variação geográfica das cepas de *Toxoplasma gondii*.

Origem	Hospedeiro	Nº de isolados	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Atípica	Referência
África	Humano	3		1			(Ajzenberg et al. 2004)
Egito	Galinha e Patos	9		3	17	2 (recombinante)	(Dubey et al. 2003)
Espanha	Humano	25	10	10	5		(Fuentes et al. 2001)
EUA	Suíno	25		20	5		(Lehmann et al. 2003)
EUA	Animais selvagens	43	3	35	5		(Dubey 2004)
França	Humano	86	7	73	2	4	(Ajzenberg et al. 2002)
Guiana Francesa	Humano	13	1		1	11	(Ajzenberg et al. 2004)
Guiana Francesa	Humanos	16				16	(Carme et al. 2002)
Índia	Galinhas	7		2	5		(Sreekumar et al. 2003)
Portugal	Suíno	15		10	4	1	(De Sousa et al. 2006)
São Paulo, Brasil	Galinhas	8				8	(Trevisani et al. 2017)
Sri Lanka	Galinha	12		6	6		(Dubey et al. 2005)

Fonte: Adaptado de Alruhaili, 2015.

2.2 Toxoplasmose: A Doença

A toxoplasmose em pacientes imunocompetentes apresenta-se com sintomas brandos, mas pode se manifestar gravemente em pacientes imunocomprometidos. Na verdade, os principais danos associados a toxoplasmose estão relacionados às sequelas da toxoplasmose congênita, do recrudescimento da infecção em paciente imunocomprometidos e pelas lesões oculares que se manifestam na maioria dos casos (Bhopale 2003).

2.2.1 Toxoplasmose sintomática

Em pacientes imunocompetentes, as infecções por *T. gondii* são limitadas e se manifestam através de febre, fraqueza muscular e linfadenopatia cervical ou occipital (Ho-Yen 2009). No entanto, na fase crônica, essa infecção apresenta caráter oportunista em pacientes imunocomprometidos, como pacientes com AIDS (Do Inglês, *Acquired Immune Deficiency Syndrome*) ou pacientes transplantados, pela reativação dos cistos de bradizoíto e reestabelecimento da infecção. Nesse contexto, a toxoplasmose torna-se um doença fatal, seja pelo processo severo de destruição dos tecidos ou associada à infecção pelo HIV (Do Inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) através da toxoplasmose encefálica, constituindo assim uma das principais causas de morte nesse grupo de pacientes (Martin-Iguacel et al. 2017).

Nos últimos anos, a fase crônica da toxoplasmose também tem sido relacionada com distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia, devido ao forte tropismo desse parasito pelos tecidos do sistema nervoso central, onde se formam cistos intracelulares nos neurônios e células da glia (Elsheikha et al. 2016, Torrey & Yolken 2016, Eshili et al. 2016, Grande et al. 2017).

2.2.2 Toxoplasmose Ocular

A toxoplasmose ocular é uma das sequelas mais comuns da toxoplasmose e pode ocorrer pela transmissão congênita ou adquirida. As lesões oculares ocorrem durante a infecção em resposta a liberação de taquizoítos na região ocular, que se dá como consequência da ruptura dos cistos, causando a invasão e inflamação da retina, resultando em cicatrizes retinianas ou até mesmo a perda da visão (Roberts & McLeod 1999).

Essas lesões clínicas são mais prevalentes na América do Sul, América Central e Caribe, em comparação com a América do Norte e Europa. Com relação ao Brasil, essa alta prevalência das lesões oculares tem correlação com a cepa tipo I que aparece predominantemente nos estudos de lesões oculares. Além do mais, o Brasil apresenta uma alta

diversidade genotípica quando comparado aos estudos anteriores com as linhagens clonais, apresentando prevalência aumentada de cepas atípicas que também estão relacionadas com a toxoplasmose ocular (Khan et al. 2006).

2.2.3 Toxoplasmose congênita

Quando uma gestante é acometida pela infecção por *T. gondii* durante o período gestacional e a forma taquizoítica ultrapassa a barreira placentária na etapa de disseminação, tem-se um quadro de toxoplasmose congênita. Esse é o quadro clínico da infecção por *T. gondii* mais conhecido e pode gerar sequelas ao feto durante a gestação ou até décadas após o nascimento (Pfaff et al. 2007).

A gravidade das alterações causadas pela infecção é inversa à idade gestacional em que ela ocorre, mas a probabilidade da transmissão é diretamente proporcional ao mesmo tempo. Alguns trabalhos consideram que o período gestacional mais crítico ocorre entre a 10^a e 26^a semana, momento em que a placenta já está desenvolvida o suficiente para ser infectada e, ao mesmo tempo, o feto é imaturo ou pouco desenvolvido o que o torna mais susceptível aos danos causados pela infecção (Del Castillo Martín 2004, Casella et al. 2010)

A literatura reforça que a patogenicidade pode ser dividida de acordo com o trimestre gestacional da primoinfecção materna. Se a infecção materna ocorrer no primeiro trimestre de gestação, normalmente ocorre morte fetal. Se a infecção materna ocorrer no segundo e terceiro trimestres de gestação, pode ocorrer prematuridade e ocasionar a chamada tétrade de Sabin (microcefalia, retinocoroidite, calcificações cerebrais e deficiência mental) (Casella et al. 2010)

De modo geral, os danos causados por esse parasito ocorrem durante a realização do ciclo biológico, que consiste na invasão das células fetais pela forma taquizoítica, realização da esquizogonia e consequente rompimento da célula gerando a destruição ou a profunda remodelagem do tecido. Se as células do sistema nervoso central forem invadidas por *T. gondii* pode ocorrer o desenvolvimento de retardo mental, convulsões, microcefalia, hidrocefalia, surdez e deficiência psicomotora como sequelas da infecção (Pfaff et al. 2007).

2.2.4 Diagnóstico

O diagnóstico precoce com a instituição do tratamento adequado da toxoplasmose aguda na gestação e de toxoplasmose congênita, diminuí os riscos de morbidade e sequelas para o concepto (Pessanha et al. 2011). No entanto, o diagnóstico dessa parasitose é complexo e é frequente a necessidade de realização de testes adicionais tais como técnicas moleculares para pesquisa do DNA de *T. gondii* em líquido amniótico (Tabela 3).

Por esse motivo, a avaliação sorológica das gestantes no primeiro trimestre gestacional compõe o programa de acompanhamento pré-natal. O objetivo dessa avaliação é investigar se a gestante teve a infecção em evento anterior a concepção. Para isso realiza-se a sorologia contra *T. gondii* buscando identificar se a mãe apresenta imunidade contra o patógeno ou não, e se sim, avaliar qual seria o provável período em que a infecção ocorreu para se realizar os devidos procedimentos em relação ao tratamento (Montoya & Rosso 2005, Correia et al. 2013). Realiza-se a pesquisa de imunoglobulinas IgG e IgM em amostra de sangue periférico das gestantes por imunofluorescência indireta, ELISA (Do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e teste imunoenzimático de micropartículas (Meia) (Montoya & Rosso 2005, Correia et al. 2013). Na gestante, a IgG passa a ser detectada de 1 a 2 semanas após a infecção aguda, havendo aumento progressivo dos títulos sorológicos até atingir o pico máximo em 3 a 6 meses. A seguir, inicia-se diminuição lenta, durante meses ou anos, com persistência de títulos positivos baixos durante o restante da vida. A IgM pode ser detectada também na primeira ou segunda semana após a infecção aguda e usualmente permanece elevada por 2 a 3 meses, havendo, entretanto, relatos de positividade por período de até 12 anos. Dessa forma, um teste sorológico positivo para IgM durante a gestação não significa necessariamente infecção recente; em muitos casos, a infecção ocorreu previamente à gestação e não há risco de transmissão vertical. Portanto, faz-se necessária a avaliação da avididade da IgG. Pois o índice de avididade (em geral superiores a 60 %) indica que a infecção aguda ocorreu há mais de três (Montoya & Rosso 2005, Contini 2008, Correia et al. 2013).

Tabela 3 - Definições de casos de infecção por *Toxoplasma gondii* em gestantes segundo o Ministério da Saúde 2013.

Toxoplasmose aguda comprovada
• Soroconversão gestacional • Detecção do DNA do <i>Toxoplasma gondii</i> em Líquido amniótico
Provável
• IgG+, IgM+, baixo índice de avidéz (colhido em qualquer idade gestacional) • Aumento progressivo nos títulos de IgG e IgM • IgM+ e história clínica sugestiva de toxoplasmose aguda gestacional
Possível
• IgG+, IgM+, índice de avidéz alto (colhido após 12 semanas de gestação) ou indeterminado • IgG+, IgM+, em amostra única colhida em qualquer idade gestacional, sem realização de índice de avidéz
Improvável
• IgG+, IgM+ ou -, índice de avidéz alto (colhido antes de 12 semanas de gestação)
Ausente
• IgG- e IgM- durante toda a gestação • IgG+ antes da concepção • IgM+, sem aparecimento de IgG

Em casos de evidências de acometimento fetal demonstrada por exame de ultrassonografia, testes sorológicos comprovados ou altamente sugestivos de toxoplasmose aguda adquirida durante a gravidez deve-se realizar a investigação molecular pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em líquido amniótico. Essa técnica apresenta 70% sensibilidade e 100 % de especificidade. No entanto, os protocolos adotados não são padronizados e recomenda-se que o exame seja realizado em laboratórios especializados. Além do mais, não se deve descartar os riscos inerentes à realização da amniocentese (Montoya & Rosso 2005, Contini 2008, Correia et al. 2013).

Em recém-nascidos, o diagnóstico sorológico é dificultado pela presença de anticorpos de classe IgG maternos transferidos via transplacentária durante a gestação. No entanto, uma criança é considerada com toxoplasmose congênita comprovada se apresentar IgM positiva entre 2 e 6 meses de idade e/ou apresentar persistência de IgG após 12 meses de vida independente da presença de sinais ou sintomas da doença. A infecção também é confirmando quando se obtém PCR positiva para o toxoplasmose no líquido amniótico, com a identificação do *T. gondii* (Correia et al. 2013).

2.2.5 Tratamento

Infelizmente, o tratamento dessa infecção é limitado e ocorre pela administração de três drogas: a espiramicina, pirimetamina e sulfatiazina. A espiramicina, é um antibiótico macrolídeo incapaz de atravessar a barreira placentária, mas que mantém sua concentração na corrente sanguínea, com meia vida de 8 horas, e por isso é utilizada para prevenir a transmissão vertical (Rorman et al. 2006). As outras duas, a pirimetamina (antimalárico) e a sulfadiazina (antibiótico do tipo sulfamida), são administradas com adição do ácido fólico em casos de infecção fetal confirmada, mas não em casos de suspeita de infecção, especialmente no primeiro trimestre da gestação uma vez que pode atuar como inibidor da medula óssea do feto e da mãe (Wallon et al. 1999, Montoya & Remington 2008a).

Mesmo depois de o tratamento ser concluído, o acompanhamento clínico e oftalmológico precisa ser realizado regularmente por vários anos para o rastreamento de eventuais sequelas que possam surgir, pois os cistos são resistentes à ação dos fármacos (Kravetz 2013).

Com relação à vacinação, até o momento, uma única vacina que utiliza a forma taquizoíto atenuado da cepa S48 (Toxovax[®]) foi licenciada, mas seu uso se restringe apenas à medicina veterinária pelo risco de reversão da virulência, bem como, pelos relatos de caso de infecção pelo *T. gondii* ocorridos em consequência de acidentes no manuseio dessa vacina (Buxton & Innes 1995, Innes et al. 2009).

2.3 Sistema imune humano

O sistema imune humano pode ser dividido em dois subsistemas: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo. O sistema imune inato inclui uma variedade de componentes celulares, moleculares e proteínas que são continuamente ativos e constituem a primeira linha

de defesa contra agentes patogênicos. É composto principalmente por fagócitos, células *Natural killer*, proteínas séricas conhecidas como sistema do complemento e citocinas. Embora não apresente uma especificidade apurada, como na imunidade adquirida, vários receptores estão presentes na imunidade inata e são capazes de reconhecer moléculas conservadas nos patógenos, chamados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS)(Abbas Abul K. et al. 2011).

O reconhecimento dos PAMPS é feito por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), dentre os quais se destacam os receptores do tipo Toll. A ativação desses receptores culmina na ativação celular e na liberação de mediadores da resposta imune, que contribuem para a eliminação de patógenos como fungos e protozoários (Abbas Abul K. et al. 2011).

Ao contrário do sistema imune inato, as ações do sistema imune adaptativo são específicas e ocorrem de maneira mais lenta que a resposta inata. O sistema imune adaptativo é capaz de gerar memória, o que significa que responderá mais rapidamente a um determinado patógeno em cada exposição sucessiva. Esse sistema é composto por células B, que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos e células T, que são os dois braços do sistema imune adaptativo, onde as células B e os anticorpos compõem a imunidade humoral e as células T a imunidade mediada por células (Abbas Abul K. et al. 2011).

Os linfócitos B são as únicas células capazes de produzir anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares (incluindo os que se encontram na superfície celular) e se diferenciam em células secretoras de anticorpos denominadas plasmócitos, funcionando como mediadores da imunidade humoral. Essas células são capazes de captar os antígenos proteicos, degradá-los e exibi-los na superfície da célula para o reconhecimento através das células T auxiliares, as quais a seguir ativam as células B. Após esse estímulo, inicia-se um processo denominado de expansão clonal em que são expandidos os clones de células B com especificidade para o antígeno reconhecido juntamente com as células T portadoras das moléculas de MHC antígeno-específico. Parte dos clones se diferencia em plasmócitos, culminando na produção de anticorpos, e outra em células de memória que permanecerão nos gânglios linfáticos para estimularem uma nova resposta imune, caso surja uma nova infecção (Abbas Abul K. et al. 2011, Clem 2011).

Os anticorpos da classe IgM são os primeiros a serem produzido durante uma resposta imune primária. À medida que a resposta imune progride, as células plasmáticas ativadas

começarão a produzir IgG específica para o antígeno particular. Embora a IgM seja o primeiro anticorpo produzido e seja um anticorpo muito maior, a IgG é um anticorpo com propriedades neutralizantes. Eles revestem o micróbio e os transformam em alvos para fagocitose, uma vez que os fagócitos (neutrófilos e macrófagos) expressam receptores para a porção Fc de IgG. Dessa forma, esses anticorpos que são secretados pelas células plasmáticas de vida longa fornecem proteção imediata se o micróbio voltar a infectar o indivíduo (Abbas Abul K. et al. 2011).

Ao contrário dos linfócitos B, os linfócitos T só reconhecem antígenos expostos na superfície das células apresentadoras de antígenos. Nesse processo estão envolvidas as moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), que em humanos é conhecida como Antígeno Leucocitário Humano (HLA). Na verdade, esse complexo genético composto por aproximadamente 224 genes, se situa no *locus* 21 do braço curto do cromossoma 6 e consiste na região mais polimórfica do genoma humano sendo responsável por grande parte da especificidade do sistema imune adaptativo (Horton et al. 2008).

Existem dois tipos diferentes de produtos dos genes do MHC chamados moléculas de MHC de classe I e moléculas de MHC de classe II. As moléculas de MHC de classe I estão relacionadas a apresentação de antígenos aos linfócitos T citóxico ($CD8^+$) e as moléculas de classe II apresentam antígenos aos linfócitos T helper ($CD4^+$) (Abbas Abul K. et al. 2011). As moléculas de MHC também diferem quanto à estrutura, sendo as moléculas de classe I formadas por duas cadeias polipeptídicas ligadas não covalentemente: uma cadeia α codificada por genes localizado no MHC (ou cadeia pesada) de 44 a 47 kDa e uma subunidade de 12 kDa que não é codificada pelo MHC, denominada de β_2 -microglobulina (β_2m) codificada pelo cromossomo 18. Os segmentos amino terminais (N-terminal) α_1 e α_2 da cadeia- α , cada um com aproximadamente 90 resíduos de comprimento, interagem para formar a fenda de ligação do peptídeo. Essa fenda é suficientemente para ligar peptídeos de 8 a 11 aminoácidos em uma conformação flexível e estendida. Porém, essa estrutura é fechada de modo que os peptídeos maiores não podem ser acomodados e, por esse motivo, têm de ser “processadas” para gerar fragmentos que sejam suficientemente pequenos para se ligarem às moléculas do MHC e serem reconhecidos pelas células T (Figura 2) (Abbas Abul K. et al. 2011, Gutiérrez et al. 2017).

Diferentemente das moléculas de classe I, ambas as cadeias das moléculas de classe II são codificadas por genes polimórficos do MHC. A molécula de classe II é composta de duas cadeias polipeptídicas associadas não-covalentemente, uma cadeia α de 32 a 34 kDa e uma cadeia β de 29 a 32 kDa. Os resíduos polimórficos que interagem com antígeno estão localizados em $\alpha 1$ e $\beta 1$, sobre e em volta da fenda de ligação do peptídeo, como acontece nas moléculas de classe I. Esses segmentos, $\alpha 1$ e $\beta 1$ interagem para formar a fenda de ligação peptídica, que é estruturalmente semelhante à fenda das moléculas de classe I. No entanto, as extremidades da fenda de ligação do peptídeo estão abertas, de modo que peptídeos de 13 resíduos ou mais podem se ajustar (Figura 2) (Abbas Abul K. et al. 2011, Gutiérrez et al. 2017).

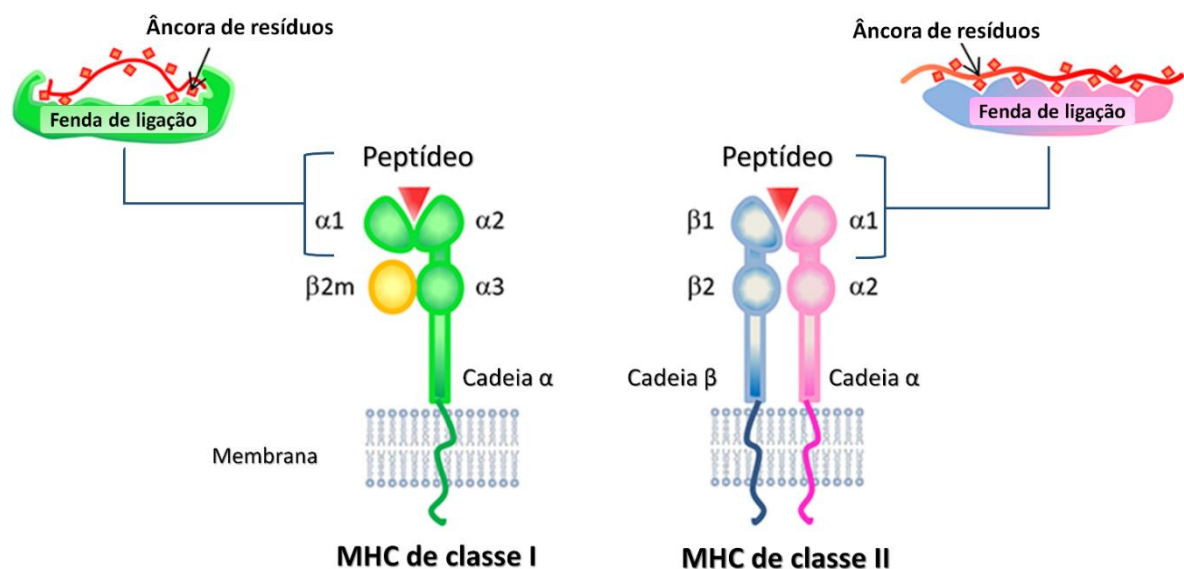


Figura 2 - Estrutura molecular do receptor de MHC de classe I e de II. A molécula de MHC de classe I é formada por um domínio transmembranar e por uma cadeia α contendo três domínios e uma cadeia de β -globulina codificada pelo cromossomo 18. A fenda de ligação de epítipo é formada entre os domínios $\alpha 1$ e $\beta 2m$. Na região da fenda de ligação encontra-se os resíduos de aminoácidos variante e é capaz de acomodar peptídeos de 8 a 10 aminoácidos. A molécula de MHC de classe II é formada por dois domínios transmembranar que fazem parte das duas cadeias pesadas, α e β , que compõem a estrutura do receptor. A fenda de ligação de epítipo é formada por dois domínios, o $\beta 1$ e $\alpha 1$, que são capazes de acomodar peptídeos de 13 a 20 aminoácidos e constitui a região dos resíduos de aminoácidos variante do receptor de MHC de classe II. Adaptado de Gutiérrez et al, 2017.

Em vias gerais, o mecanismo de apresentação de antígenos com as moléculas de MHC de classe I e II ocorre pela clivagem proteolítica das proteínas do patógeno em peptídeos pequenos de 8-10 e 13-20 aminoácidos e a ligação desses a fenda de ligação de peptídeos das moléculas MHC de classe I e classe II, respectivamente. Seguida do posicionamento desse

complexo peptídeo/MHC na superfície da célula e consequente interação com os receptores das células T (Blum et al. 2013).

Classicamente, os peptídeos ligados as moléculas de MHC de classe I são gerados no citosol de várias fontes intracelulares, como auto proteínas citosólicas ou nucleares, proteínas de patógenos intracelulares ou antígenos tumorais endógenos (Crotzer & Blum 2010). Em vias gerais, as proteínas que sofreram ação do proteassoma são importadas para o lúmen do retículo endoplasmático (RE) pelo transportador associado ao processamento de antígenos (TAP). Dentro do RE, ocorre a ligação peptídica na fenda da molécula de MHC de classe I que é necessária para a dobração correta de moléculas e sua liberação. Assim, os complexos de peptídeo/MHC estáveis são exportados para a superfície celular através do aparelho Golgi e são apresentados para as células T CD8⁺ (Figura 3) (Abbas Abul K. et al. 2011, Duraes et al. 2015).

Em contraste, os epítomos ligados as moléculas de MHC classe II originam-se principalmente de antígenos extracelulares (derivados de origem exógena), que são fagocitados pelas APCs e degradados por proteólise lisossômica. Estes fragmentos antigênicos são associados às moléculas de MHC de classe II nos chamados compartimentos de MHC de classe II (MIICs). As moléculas de MHC de classe II são sintetizadas no RE e associadas a um tipo específico de chaperona conhecida como cadeia invariante (Ii, também conhecida como CD74) que impede a ligação prematura dos peptídeos na fenda de ligação de peptídeo. Quando a molécula de MHC de classe II associada ao CD74 chega ao MIIC, a cadeia invariante é degradada por hidrólise lisossomal, deixando o peptídeo de cadeia invariante associado à classe II (CLIP) no sulco de ligação de peptídeo da molécula de MHC de classe II. Então, o CLIP é substituído por um epítomo exógeno de alta afinidade com a ajuda da molécula não clássica de MHC classe II HLA-DM. Após o carregamento do peptídeo, os complexos peptídeo/MHC de classe II são transportados até a superfície da célula onde ficam ancorados para apresentação aos linfócitos T CD4⁺ (Vyas et al. 2008, Abbas Abul K. et al. 2011) (Figura 3).

O mecanismo efetor da resposta imunidade adaptativa mediado por células dá-se pela ação dos linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Quando os linfócitos CD4⁺ reconhecem os epítomos associados às moléculas de MHC de classe II e são estimulados, passam a secretar citocinas cuja função é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como a

ativação de outras células, incluindo as células B, os macrófagos e outros leucócitos (Abbas Abul K. et al. 2011, Clem 2011). Já os linfócitos T $CD8^+$ estimulados pelos epítomos associados às moléculas de MHC de classe I, exercem função citolítica e atuam principalmente na destruição de células infectadas por patógenos intracelulares ou células tumorais. Tal como acontece com as células B, as células T ativadas também sofrem expansão clonal que produz células T efetoras para a infecção atual e células T de memória para futuras infecções (Abbas Abul K. et al. 2011, Clem 2011).

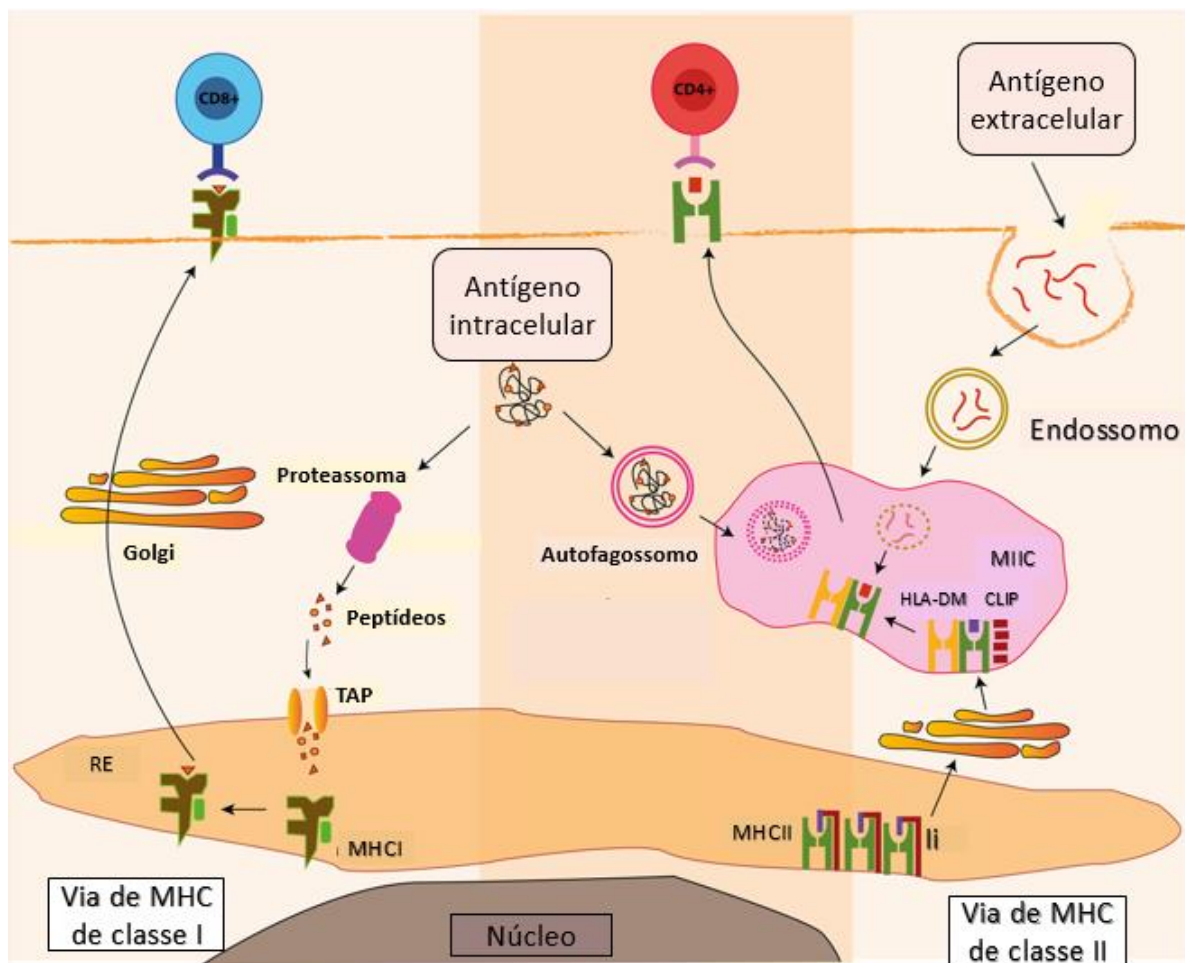


Figura 3 - Processamento e apresentação de antígeno pela via de MHC de classe I e II. Na via de MHC de classe I os antígenos intracelulares são processados pelo imunoproteassoma, ligados ao transportador TAP e associados a molécula de MHC de classe I. O complexo MHC I/peptídeo é transportado até o complexo de golgi e então é exportado por vesículas que se fundem a membrana célula onde o complexo MHC I/peptídeo ficará ancorado para o reconhecimento pelos linfócitos $CD8^+$. Na via de MHC de classe II os antígenos são fagocitados e transportado pelo endossomo até o compartimento de MHC de classe II. Nesse compartimento, os peptídeos com afinidade se ligam a fenda de ligação de epítomo das moléculas de MHC de classe II e o complexo MHC II/epítomo é transportado até a superfície das células onde será reconhecido por linfócitos $CD4^+$. (Adaptado de Duraes et al, 2015 (67)).

Dessa forma, com as células de memória que foram produzidas pelo mecanismo da resposta imune primária, qualquer exposição futura ao antígeno resultará em uma resposta imune secundária através das células de memória que são mais eficazes para combater patógenos por representarem uma população geral de linfócitos antígeno-específicos e, conseqüentemente, responderem mais rápido a reexposição a um determinado antígeno. Essa é a razão pela qual a geração de respostas de memória constitui um dos principais objetivos da vacinação.

2.4 Resposta imune ao *Toxoplasma gondii*

A resposta imune contra *T. gondii* tem início quando os esporozoítas ou bradizoítas invadem as células do hospedeiro. Após esse evento, as células epiteliais e residentes do lúmen secretam quimiocinas (como as MPC-1 e a MIP-2) que atraem as células imunes da corrente sanguínea para o sítio da infecção. Este recrutamento atua na eliminação do parasito por fagocitose e estimula outras células do sistema imune no processo de apresentação de antígenos (Brenier-Pinchart et al. 2000).

O mecanismo envolvido na resposta humoral ainda não é bem elucidado em humanos, mas experimentos usando camundongos demonstraram que no estágio inicial da infecção, após a internalização do parasito, as células são ativadas envolvendo proteínas como TLR11 e o MYD88, que dirige a produção subsequente de IL-12 (Pifer & Yarovinsky 2011) ativando as células NK. Essas células passam a secretar IFN- γ (Gazzinelli et al. 1992) resultando na ativação dos linfócitos T, que em sinergismo com o IFN- γ , mediam a eliminação do taquizoíto fagocitados por macrófagos através do aumento da produção de radicais livres e óxido nítrico.

A imunidade adquirida contra o *T. gondii* é desenvolvida mais tardiamente e é caracterizada pela forte ativação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Gazzinelli et al. 1992). O IFN- γ continua sendo a citocina central na resistência ao parasito, dirigindo a diferenciação de linfócito T CD4⁺ específicos para os antígenos do *T. gondii*. Os novos linfócitos CD8⁺ gerados exerceram o papel crucial no controle da replicação do parasito, servindo como uma fonte adicional de IFN- γ e pela sua atividade citotóxica contra as células infectadas, eliminando os parasitos e prevenindo a reativação da infecção (Bhopale 2003).

No entanto, mesmo após a imunização antes da concepção ainda se deve tomar todas as medidas de prevenção contra a infecção por *T. gondii* devido a possibilidade de re-infecção. Isso se deve ao fato de que a primeira imunização com a produção de células T e B de memória não protege a gestante contra a infecção por cepas diferentes a que ela teve contato previamente. Um caso clínico relatado na França em 2009 é um trágico exemplo desse risco. Um recém-nascido de uma mãe que havia sido imunizada antes da concepção apresentou toxoplasmose congênita disseminada inesperada após o nascimento. Ao realizar a genotipagem a partir da amostra de sangue periférico do recém-nascido, uma cepa de genótipo atípico foi identificada. Essa cepa é incomum na Europa, mas comum na América do Sul. O estudo epidemiológico revelou que a reinfecção materna pode ter ocorrido pela ingestão de carne crua de cavalo importada (Elbez-Rubinstein et al. 2009)

Outra característica importante no contexto da resposta imune contra infecção por *T. gondii* é a capacidade desse parasito em recrudescer ou reativar a infecção do estado latente para a forma aguda da infecção. Em outras palavras, esse parasito apresenta a habilidade, em condições de estresse em que há baixa da imunidade (imunodeficiência adquirida ou paciente imunossuprimidos) em alterar a sua forma bradizoíta para taquizoíta. Esse mecanismo não é bem esclarecido, mas estudos em camundongos sob condição de estresse levaram à observação de que a diminuição de IFN- γ e IL-12 associado à alteração do perfil de expressão de proteínas contribuem para reverter a forma bradizoíta em taquizoíta (Shen et al. 2016).

2.5 Vacinologia

2.5.1 Imunômica e imunoinformática

Assim como a genômica e a proteômica, a imunômica é uma nova ciência que utiliza técnicas de alto rendimento para entender os mecanismos do sistema imunológico. Tem como objetivo elucidar todos os processos envolvidos na ativação do sistema imune por um antígeno estranho (Sette et al. 2005), produzindo grande quantidade de dados funcionais, clínicos e epidemiológicos do sistema imunológico. Esse conhecimento impulsionou o desenvolvimento de novas abordagens computacionais, como a imunoinformática, que objetiva armazenar e analisar os dados gerados pela imunômica (He et al. 2010, Backert & Kohlbacher 2015).

Tendo em vista o foco deste estudo, juntamente com as áreas de pesquisa de imunologia computacional, destacaremos os avanços na predição de epítomos que por meio da imunoinformática busca identificar epítomos que apresentam propriedades antigênicas e imunogênicas, ou seja, a capacidade de ligar-se especificamente aos anticorpos complementares e induzir resposta imune (Zhang et al. 2008). Nesse contexto, os avanços da imunoinformática fomentam os bancos de dados imunológicos com informações sobre os epítomos experimentalmente confirmados, com ferramentas de análise e algoritmos de previsão que são cruciais no desenvolvimento de novas vacinas, estudos imunológicos básicos e diagnóstico de várias doenças (Zhang et al. 2008). A Tabela 4 lista alguns dos bancos de dados que disponibilizam informações relacionadas aos epítomos de célula B e T, previsão de alergênicos e frequência alélica dos receptores de HLAs.

Tabela 4 - Banco de dados de epítomos, alergênicos e frequência alélicas dos HLAs.

Informação	Base de dados	URLs
Linfócito B	CED	http://www.immunet.cn/ced/log.html
	Bcipep	http://crdd.osdd.net/raghava/bcipep/
	Epiotme	https://www.rostlab.org/services/epitome/
	IEDB	http://www.iedb.org/
	IMGT®	http://www.imgt.org/
Linfócito T	Syfpethi	http://www.syfpethi.de/
	IEDB	http://www.iedb.org/
	IMGT ®	http://www.imgt.org/
Alergênico	Database of IUIS	http://www.allergen.org/
	SDAP	http://fermi.utmb.edu/
Frequência alélica	dbMHC	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gv/mhc/main.fcgi?cmd=init
	Allelefrequency	http://www.allelefrequencys.net/default.asp
	AFND	http://www.allelefrequencys.net/default.asp

Fonte: adaptado de HE et al 2010 (He et al. 2010).

Dentre as bases de dados listadas na Tabela 4, destacamos o IEDB fundado pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas dos Estados Unidos da América. Essa base de dados é, atualmente, a mais robusta e oferece fácil acesso aos dados experimentais de caracterização de anticorpos e estudos de epítomos de célula T e B em humanos, primatas e outras espécies de animais. Além disso, o IEDB hospeda ferramentas que auxiliam na predição e análise de epítomos de célula B e T, além de várias outras ferramentas que auxiliam na predição do processamento e apresentação de epítomos (Figura 3) (Peters et al. 2005).

A Figura 3 sumariza diferentes etapas do processamento de um antígeno viral através das ferramentas disponíveis no IEDB. Como se nota, essa base oferece ferramenta de predição para o processamento de antígenos pelo proteassoma ou imunoproteassoma, bem como a ligação ao transportador TAP e ligação as moléculas de HLA. Além disso, é possível avaliar a imunogenicidade daqueles epítomos preditos, de modo a prever qual probabilidade desses peptídeos serem reconhecidos pelas células T (Fleri et al. 2017)

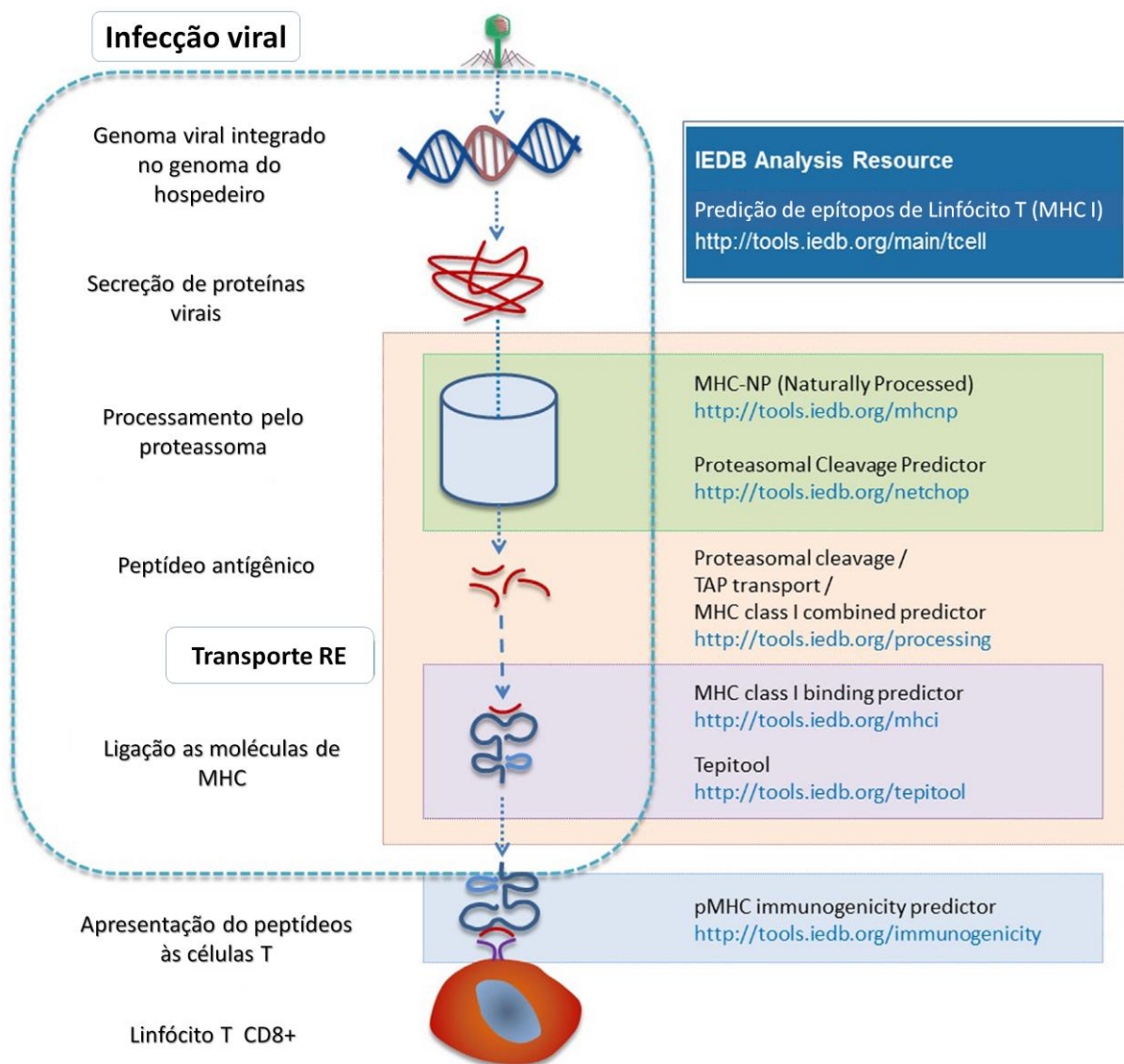


Figura 3 - Ferramentas de predição de epítomos do IEDB. MHC-NP e *Proteasomal Cleavage Predictor* são ferramentas que possibilitam a análise de processamento dos epítomos. TAP transport é uma ferramenta que possibilita a predição de ligação transportado TAP. *MHC class I binding predictor* e *Tepitool* é uma ferramenta que possibilita predição de epítomos com a associação ao proteassoma e o TAP. *pMHC immunogenicity predictor* é uma ferramenta para realizar a predição da antigenicidade (Adaptado de Fleri et al 2017 (Fleri et al. 2017)).

2.5.2 Ferramentas de predição de epítomos para linfócito T

Atualmente, são mais de 22 ferramentas de predição de epítomos de células T disponibilizadas em bancos de dados (Tabela 5). Aqui destacaremos o *Propred-I*, *nHLAPred*, *RANKPEP*, *IEDB binding*, o *NetMHCpan 3.0 servers*, *NetMHCIIpan 3.1 servers* e *TEPITOPEpan* (Tabela 5).

O *ProPred1* (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/index.html>) é uma ferramenta on-line para a predição de peptídeo de MHC classe I por meio de uma matriz que permite a previsão de sítios de ligação a 47 alelos de MHC classe I. Esta ferramenta permite também a previsão dos sítios de clivagem por proteassoma e imunoproteassoma em uma sequência antigênica (Singh & Raghava 2003). Da mesma forma, o *nHLAPred* (<http://crdd.osdd.net/raghava/nhlapred/index.html>) é uma ferramenta de predição de epítomos de MHC de classe I, capaz de identificar epítomos ligantes a 67 alelos dessa via. Essa ferramenta permite também a predição da clivagem pelo proteassoma na extremidade C terminal e apresenta um servidor dividido em dois componentes: *ComPred* e *ANNpred*. No *ComPred*, a previsão baseia-se na abordagem híbrida das matrizes quantitativas e da rede neural artificial. Já no *ANNpred*, a predição baseia-se exclusivamente na rede neural artificial (Bhasin & Raghava 2007).

RANKPEP (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.html>) possui destaque por ser capaz de identificar epítomos ligantes a 118 alelos de MHC de classe I e 67 alelos de MHC de classe II através de uma "matriz de pontuação específicas de posição" (PSSMs). Essa ferramenta, assim como as anteriores, é capaz de prever a clivagem proteassomal através dos resíduos da extremidade terminal C. O *IEDB-binding*, que faz parte dos recursos de análise do *ImmunologyEpitopeDataBase* (*IEDB-AR*: <http://tools.immuneepitope.org/main/>) gera uma previsão quantitativa da afinidade de qualquer interação de peptídeo-MHC de classe I pelo método de matrizes quantitativas e da rede neural artificial, cobrindo HLA-A e HLA-B para humanos, bem como chimpanzés, macacos, gorilas, vacas, porcos e ratos (Vaughan et al. 2013).

No entanto, dentre as ferramentas de predição de epítomos de MHC de classe I, o *NetMHCpan 3.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>) possui maior destaque, pois sua predição se dá por meio do método pan-específico que é capaz de obter previsões precisas para moléculas com pouco ou nenhum dado experimental. A última versão do *NetMHCpan* disponibiliza 172 moléculas de MHC de classe I incluindo humanos (HLA-A, B, C e E), camundongos (H-2), bovinos (BoLA), primatas (Patr, Mamu, Gogo) e ovelhas (SLA) (Nielsen et al. 2016).

Essa robustez quanto a capacidade de predição do *NetMHCpan 3.0* é fruto do uso de uma rede neural artificial que consiste em técnicas computacionais que apresentam um

modelo matemático inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes e que adquirem conhecimento através da experiência, melhorando a tomada de decisão. Essa rede neural artificial foi associada ao aprendizado de máquinas, que, reduzidamente, seria um método computacional que habilita a máquina a aprender sem ser explicitamente programada, o que gerou a possibilidade de prever epítopos para esse elevado número de alelos (Nielsen et al. 2016).

Para predição de epítopos para o MHC de classe II, destaca-se o *TEPITOPEpan* (<http://datamining-iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/TEPITOPEpan.html>) por realizar previsões para 50 alelos de HLA DRB usando 50 modelos de *PSSM* (modelo matemático que se baseia na caracterização da variabilidade intrínseca das sequências padrões) (Zhang et al. 2012a). Todavia, o *NetMHCIIpan 3.1 servers* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>), que utiliza o método pan-específico, se sobressai, uma vez que disponibiliza a predição de epítopos para os três isotipos de MHC de classe II de humanos (HLA-DR, DP e DQ) e também apresenta um bom modelo de predição para alelos de camundongo (H-2) (Andreatta et al. 2015).

Tabela 5 - Ferramentas de predição de epítopos para linfócitos T.

Ferramenta	LINKS	MHC		MÉTODO *
		I	II	
ANNPRED	http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/neural.html	30	-	ANN
EpiJen	http://www.ddg-pharmfac.net/epijen/EpiJen/EpiJen.htm	24	-	QM
IEDB binding	http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_processing.html	77	-	ANN e SMM
IMTECH	http://www.imtech.res.in/raghava/mhc	-	3	QM
MHC2Pred	http://www.imtech.res.in/raghava/mhc2pred/		42	SVM
MMBPred	http://www.imtech.res.in/raghava/mmbpred/	46	-	QM
NetCTL	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL	12	-	ANN
NetMHCIIpan 3.1	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/		694	PSSM e ANN
NetMHCpan 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/	172	-	ANN
nHLAPred	http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/	67	-	ANN
ProPred	http://www.imtech.res.in/raghava/propred/		51	QM
ProPred I	http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/	47	-	QM
RANKPEP	http://bio.dfci.harvard.edu/RANKPEP/	118	62	PSSM
SVMHC	http://abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/SVMHC	33	51	SVR
SVRMHC	http://us accurascience.com/SVRMHCdb/	36	6	SVR
SYFPEITHI	http://www.syfpeithi.de/bin/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm	42	7	Published motifs
TEPITOPEpan	http://datamining-iip.fudan.edu.cn/service/TEPITOPEpan/index.html	0	50	PSSM

*ANN - Artificial neural networks (ANNs); PSSM – Position Specific Scoring Matrices; SVR- support vector machine regression; Quantitative Matrices (QM).

2.5.3 Ferramentas de predição epítomos para linfócito B

Em relação a predição para os epítomos de linfócitos B, a ferramenta se divide em predição de epítomos contínuos e epítomos descontínuos (Tabela 6). Os contínuos são epítomos lineares em que os resíduos de aminoácidos são ordenados em sequência como na estrutura primária da proteína. Já os epítomos descontínuos são formados por resíduos ordenados distantes na estrutura primária, mas que, em consequência ao dobramento da proteína, tornam-se próximos (Ansari & Raghava 2010).

Os epítomos descontínuos correspondem a aproximadamente 90% de todos os epítomos de células B, são complexos e mais difíceis de serem preditos. Entre as ferramentas usadas para prever esses epítomos, podemos citar o *DiscoTope* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>), que usa a estrutura tridimensional de proteínas para determinar acessibilidade da superfície e a pontuação para os resíduos de aminoácidos do epítopo (Kringelum et al. 2012). O *DiscoTope*, juntamente com o *BEpro* (<http://pepito.proteomics.ics.uci.edu/>) e *SEPPA* (<http://lifecenter.sgst.cn/seppa/index.php>), requer uma estrutura 3-D como entrada, especificamente no formato PDB (Sweredoski & Baldi 2008).

O *Ellipro* (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) e o *CEBTOPE*. (<http://osddlinux.osdd.net/raghava/cbtope/submit.php>) são as ferramentas mais complexas dentre as listadas na Tabela 5. O *Ellipro* prediz epítomos lineares e descontínuos com base na estrutura 3-D do antígeno proteico (Ponomarenko et al. 2008). Já o *CEBTOPE* realiza a predição usando apenas a sequência primária da proteína e foi desenvolvida com máquinas de vetores de suporte (SVM) e é validada com 187 cadeias de proteínas não redundantes, consistindo em 2261 resíduos que interagem com anticorpos de epítomos de células B. Além do mais, essa ferramenta apresenta uma precisão na predição dos epítomos superior a 85% e área sob curva (AUC) de 0,9.

Não o bastante, dentre as ferramentas de predição de epítomos listada na Tabela 5, destaca-se ainda, para a predição de epítomos contínuos, o *B-cell epitope prediction server* (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/index.html>) que usa método de kernel para previsão epítomos alcançando um desempenho preditivo de AUC = 0.758 (El-Manzalawy et al. 2008). Além do mais, a implementação atual do *BCPREDS* permite ao usuário selecionar entre três métodos de predição: (I) *AAP* (Chen et al. 2007); (II) *BCPred* (El-Manzalawy et al. 2008) e (III) *FBCPred* (El-Manzalawy et al. 2008) em uma mesma ferramenta.

Diante desse breve apanhado sobre os avanços que a imunômica trouxe ao contexto de vacinologia, é possível projetar as aplicações dessas ferramentas de imunoinformática em uma abordagem vacinal racional, como a vacinologia reversa, discutida adiante.

Tabela 6 - Ferramentas de predição de epítomos de linfócito B.

FERRAMENTA	TIPO DE EPÍTOPE	LINKS
ABCPred	Contínuo	http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/
Bcepred	Contínuo	http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/
BCPREDS	Contínuo	http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict.html
BepiPred	Contínuo	http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/
BEPro (PEPITO)	Descontínuo	http://pepito.proteomics.ics.uci.edu/
BEST	Contínuo	http://biomine.ece.ualberta.ca/BEST/
CEBTOPE	Descontínuo	http://osddlinux.osdd.net/raghava/cbtope/submit.php
DiscoTope	Descontínuo	http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/
ElliPro	Contínuo e Descontínuo	http://tools.immuneepitope.org/tools/ElliPro/iedb_input
EPCEs	Descontínuo	http://sysbio.unl.edu/services/EPCEs/
EpiSearch	Descontínuo	http://curie.utmb.edu/episearch.html
Epitopia	Contínuo e Descontínuo	http://epitopia.tau.ac.il/
MimoPro	Descontínuo	http://informatics.nenu.edu.cn/MimoPro
MIMOX	Descontínuo	http://immunet.cn/mimox/
Pep-3D-Search	Descontínuo	http://kyc.nenu.edu.cn/Pep3DSearch
PepSurf	Contínuo e Descontínuo	http://pepitope.tau.ac.il
SEPPA	Descontínuo	http://lifecenter.sgst.cn/seppa/index.php

Fonte: Soria-Guerra et al. 2015 (Soria-Guerra et al. 2015).

2.5.4 Vacinologia reversa

A ideia original da vacinologia reversa foi iniciar, *in silico*, o rastreamento do genoma de um determinado agente patogênico e identificar os genes que codificam proteínas com as propriedades de potenciais alvos vacinais conforme descrito na Figura 4 (Seib et al. 2012).

Através dessa técnica, um conjunto de proteínas hipotéticas podem ser processado com programas de *software* dedicados a deduzir sua possível localização celular, domínios transmembranares, estrutura 3D, proteínas ortólogas, presença de adesina, dentre outras características. Tais aproximações possibilitam a escolha dos melhores candidatos vacinais, que depois de selecionados, podem ser expressos em bactérias, leveduras ou plantas e serem

utilizados para imunizar camundongos, permitindo a avaliação da imunogenicidade com base na análise de antissoros e citometria de fluxo (Heinson et al. 2015).

Essa metodologia tem uma enorme vantagem sobre abordagens convencionais de vacinologia, por duas razões principais. Em primeiro lugar, a análise *in silico* é muito rápida e barata, além disso essa abordagem permite a identificação de proteínas que são expressas nos diferentes estágios de vida do micro-organismo, inclusive aquelas de difícil obtenção nos experimentos *in vitro* (He et al. 2010).

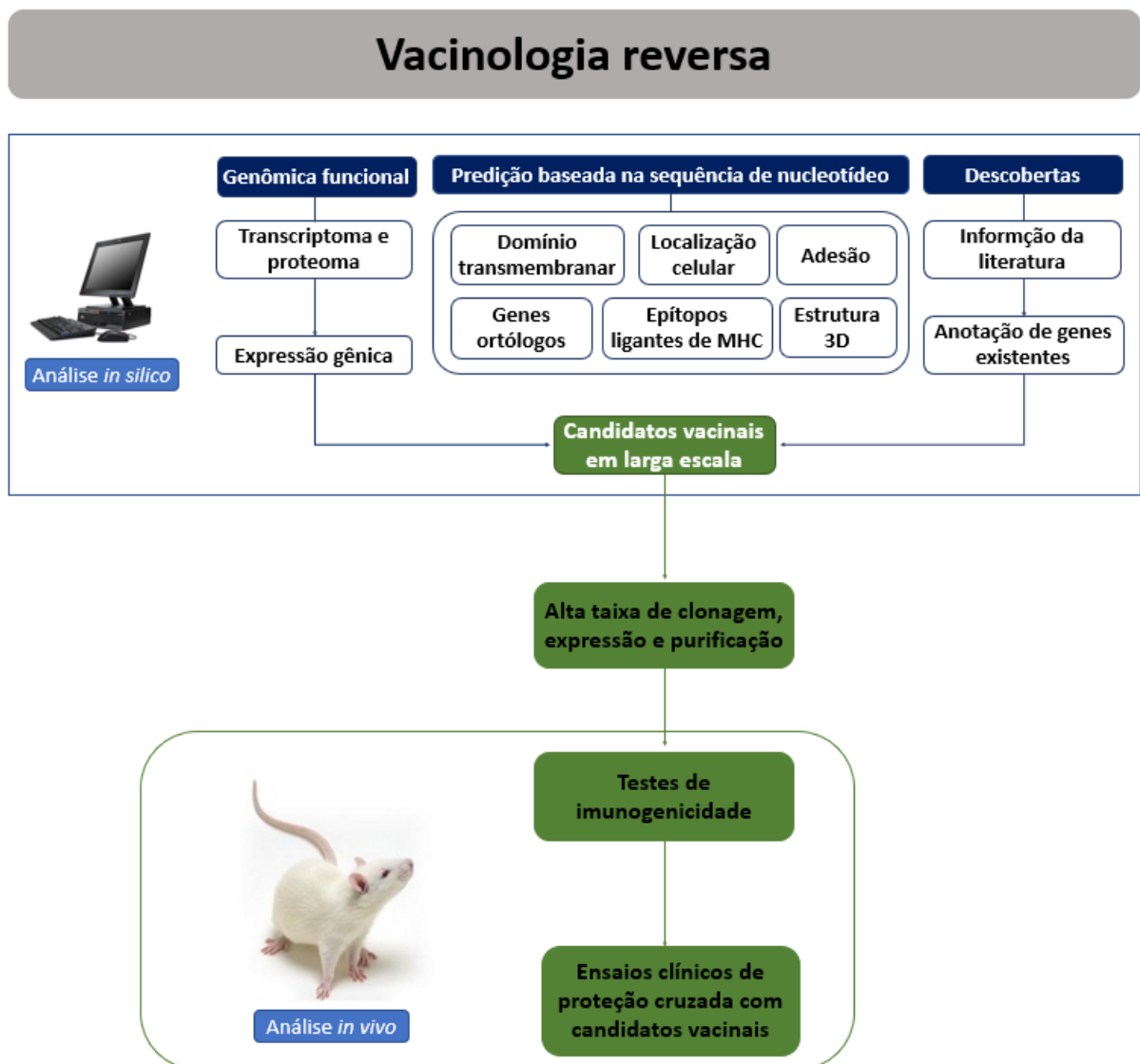


Figura 4 - Fluxograma de trabalho em Vacinologia Reversa. As etapas de trabalho por abordagem de vacinologia reversa tem início com análise computacional incluindo: análise genômica, proteômica e imunômica. Posteriormente a análise computacional e seleção dos alvos a serem analisadas, inicia-se as etapas *in vitro* e *in vivo* (Adaptado de Rappuoli, 2001)

Nesse contexto, *Neisseria meningitidis* B (MenB), o meningococo responsável por 50 % da meningite meningocócica em todo o mundo, foi o primeiro agente em que essa abordagem foi usada. O desenvolvimento de uma vacina contra esse patógeno foi problemático devido ao fato de potenciais antígenos vacinais, como polissacarídeo capsular, ser idêntico a um carboidrato amplamente distribuído em humanos [$\alpha(2\rightarrow8)$ ácido *N*-acetilneuramínico, além disso, esse patógeno possui proteínas de superfície extremamente variáveis. No entanto, ao analisar a informação genômica para a construção de uma nova vacina, mais de 600 antígenos potenciais foram testados quanto à antigenicidade e 29 deles conseguiram induzir anticorpos capazes de bloquear a bactéria *in vitro*. O poder dessa tecnologia tornou-se evidente ao notar que, antes da abordagem, apenas 12 antígenos de superfície do meningococo haviam sido descritos na literatura, e destes, apenas 4 ou 5 apresentaram atividade bactericida (Pizza et al. 2000).

Atualmente, os métodos empregados na identificação de novos alvos vacinais através da vacinologia reversa incluem massivamente as ferramentas de imunoinformática, avaliando os novos candidatos vacinais quanto uma resposta imune a nível de célula T, pela ligação aos receptores de HLAs, como uma resposta humoral pela ativação de células B (Heinson et al. 2015, Rappuoli et al. 2016). Essas vantagens são de grande importância no contexto da construção de vacinas contra patógenos de ciclo de vida complexo como *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Schistosoma* e *Toxoplasma gondii* (“Vaccination Against Protozoa” 2008).

2.6 Avanços e desafios em uma vacina contra *Toxoplasma gondii*

Avanços significativos foram feitos nos últimos 20 anos no desenvolvimento de uma vacina contra *T. gondii*, tanto no isolamento e caracterização de antígenos, como na clonagem de genes, geração de mutantes e nos métodos imunológicos (Kur et al. 2009, Liu et al. 2012, Lim & Othman 2014). De fato, uma variedade de estratégias foi empregada no desenvolvimento de vacinas contra esse parasita em que podemos destacar a utilização de vacinas vivas, vacinas vivas atenuadas, vacinas mortas, vacinas de subunidade e vacinas de DNA. Os candidatos mais promissores para o desenvolvimento de uma vacina contra este protozoário foram aqueles que envolveram antígenos da superfície (SAG), antígenos da roptria (ROP), antígenos do micronema (MIC), antígenos de grânulo denso (GRA) e alguns

outros antígenos secretados pelo taquizoíta e bradizoíta (Jongert et al. 2009, Zhang et al. 2013, Ching et al. 2016, Sonaimuthu et al. 2016).

Atualmente, existem mais de 30 vacinas experimentais testadas em camundongos capazes de produzir resposta imune contra *T. gondii*. Estas vacinas são capazes de ativar tanto a resposta inata como a adaptativa e em alguns casos provocar a redução dos cistos de bradizoítos nestes animais (Zhang et al. 2013, 2015a). No entanto, a grande maioria desses estudos foram realizados com vacinas de DNA, que, mesmo sendo capazes de produzir uma resposta imune Th1 melhorada com produção aumentada de citocinas inflamatórias IFN- γ e IL-2, não foram eficazes na proteção do hospedeiro contra novas infecções pelo *T. gondii* (Zhang et al. 2012b, Yuan et al. 2013, Pena et al. 2013, Chen et al. 2013, 2014, 2015, 2016, Parthasarathy et al. 2013, Lim & Othman 2014, Ahmadvour et al. 2017, Rahimi et al. 2017). Em adição, a resposta imune produzida por vacinas de DNA mostrou-se significativamente, mais fracas em primatas e humanos em comparação com camundongos, o que sustenta a hipótese de que as diferenças quantitativas observadas em várias abordagens de vacina de DNA em camundongos, raramente se traduzem em seres humanos (Saade & Petrovsky 2012). Além do mais, vacinas de DNA trazem consigo questionamentos importantes sobre segurança e saúde. Sobretudo, com as possibilidades de efeitos adversos ao uso de vetores virais, seja relativo a ativação de oncogenes (Hacein-Bey-Abina et al. 2003) ou a uma resposta imune excessiva (Fox 1999). Em relação aos estudos com vacinas vivas atenuadas, até o momento uma única vacina de taquizoíto atenuado, a ToxoVax® (Intervet BV) com a cepa S48, foi licenciada. Porém, o seu uso se restringe apenas a medicina veterinária (Buxton & Innes 1995, Innes et al. 2009).

Esse panorama no contexto do desenvolvimento de uma vacina contra o *T. gondii* se estabeleceu pelas várias características desafiadoras que esse parasito apresenta. A expressão de proteínas específicas aos estágios desse parasito pode tornar uma vacina direcionada à fase aguda, ineficaz no estágio crônico e vice-versa; a variabilidade genotípica das cepas do *T. gondii* indica que uma vacina contra uma determinada cepa pode não ser protetora contra infecções causadas por outras cepas (Jongert et al. 2009). Além do mais, os mecanismos de evasão da resposta imune desse parasito permitem a calcificação de cistos nos tecidos, uma vez que a infecção crônica ao longo da vida tem sido resistente, tanto para os tratamentos medicamentosos, quanto para as tentativas de vacinação (Lim & Othman 2014).

Portanto, uma vacina ideal para a prevenção da toxoplasmose deverá ser, eficientemente, imunogênica na indução de uma resposta imune capaz de prevenir essa patogênese eficaz contra diferentes cepas de *T. gondii*.

3 JUSTIFICATIVA

T. gondii apresenta grande potencial teratogênico que pode se manifestar como coriorretinite leve, aborto espontâneo, retardo mental, microcefalia, hidrocefalia e convulsões. Essa infecção apresenta também, caráter oportunista em indivíduos imunocomprometido (Pappas et al. 2009) e, na fase crônica, tem sido relacionado com o desenvolvimento de distúrbios neurológicos em consequência ao seu forte tropismo pelo sistema nervoso central (Dubey et al. 2012)

O tratamento para essa patologia é bastante deficiente com apenas três drogas capazes de combater esse parasito. Das quais, apenas a esperimicina pode ser usada durante a gestação sem risco de efeito teratogênico, por não atravessar a placenta e, pelo mesmo motivo, não é indicada quando há infecção fetal. As demais drogas, sulfadiazina e a pirimetamina apresentam significativa toxicidade, podendo causar depressão da medula óssea na mãe e no feto, caso não administrada com ácido fólico (Wallon et al. 1999, Rorman et al. 2006, Montoya & Remington 2008b).

Infelizmente, até o momento não há vacinas licenciadas para uso em humanos e, nem relatos de formulação de vacinas contra *T. gondii* em fases de testes clínicos. Na verdade, esse parasito apresenta fatores limitantes na construção de uma vacina, como a alta variabilidade genotípica entre as cepas, estágio de latência e diferentes estágios durante a infecção (Lim & Othman 2014). Todavia, os avanços alcançados nas abordagens e técnicas usadas na construção de vacinais, fruto da era pós genômica, apontam para novas perspectivas no desenvolvimento de vacinas contra patógenos de ciclo de vida complexos (Rappuoli 2001).

A exemplo dessas novas abordagem, a vacinologia reversa destaca-se pela sua eficácia na descoberta de novos alvos vacinais, como em *N. meningitidis* B (MenB) (Heinson et al. 2015, Rappuoli et al. 2016), também encontrada em estudos mais recentes como: *Cystoisospora suis* (Palmieri et al. 2017), *Treponema pallidum* (Kumar Jaiswal et al. 2017), Leptospirosis (Grassmann et al. 2017) e *Plasmodium* sp. (Ntege et al. 2017). Essa abordagem racionaliza a procura do alvo por meio de ferramentas de bioinformática, o que torna o custo

mais baixo, e possibilita a escolha de proteínas conservadas entre as diferentes cepas, que sejam importantes quanto a virulência e específicas aos diferentes estágios do parasito. Tudo isso é possível por se tratar de uma análise a nível genômico (He et al. 2010).

Empregando a vacinologia reversa, na tentativa de construir uma vacina contra o *T. gondii*, que é obrigatoriamente intracelular, buscou-se estabelecer a melhor estratégia frente a patogênese dessa infecção. Portanto, diante de uma resposta imune sustentada, principalmente, na produção de INF- γ pela ativação de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, buscou-se para a seleção de antígenos, os mecanismos envolvidos na apresentação e reconhecimento de antígenos em humanos (10,55).

Dessa forma, utilizamos a imunômica, a ciência que busca a elucidação de todo o processo envolvido no reconhecimento e ativação da resposta imune por parte um antígeno exógeno (Sette et al. 2005, Braga-Neto & Marques 2006). O conhecimento produzido por essa ciência fomentou a imunoinformática, sobretudo, no contexto da apresentação de antígenos estranho, que envolve as vias de MHC de classe I e II, que estão relacionados, respectivamente, a ativação dos linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ (76). O uso desses receptores para a predição de potenciais epítomos ligantes, foi um grande avanço para vacinologia atual. Essas ferramentas podem ser associadas a outras, capazes de predizer imunogenicidade, processamento dos prováveis epítomos e o transporte pelo transportador associado ao processamento de antígeno, o TAP (Peters et al. 2003, Tenzer et al. 2005a, Calis et al. 2013, Karosiene et al. 2013, Nielsen et al. 2016). O que possibilita avaliar a imunogenicidade de um determinado antígeno de modo *in silico* antes mesmo de testá-lo experimentalmente.

Assim, associando a vacinologia reversa à imunômica, buscou-se nesse estudo, identificar epítomos expressos na fase aguda e crônica, homólogos às cepas mais frequentes, para construção de uma vacina contra *T. gondii*. Para essa seleção dos epítomos, buscou-se avaliar a capacidade desses em se ligarem aos HLAs de humano de classe I e II, relacionados à ativação de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺, que constituem a principal via efetora contra a infecção causada por esse patógeno. Nessa análise, adotou-se os alelos de HLAs mais frequentes nas populações da América do Norte, Europa e América do Sul que constituem, onde há ocorrência de cepas de diferentes genótipos, inclusive genótipos atípicas (Shwab et al. 2014).

4 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo identificar antígenos conservados entre cepas de diferentes genótipos de *T. gondii*, com vista à produção de uma vacina de subunidade utilizando estratégia imunômica associado a vacinologia reversa.

4.1 Objetivos específicos

- Construir uma biblioteca de proteínas com domínio transmembranar e com peptídeo sinal das cepas de *T. gondii* depositadas no ToxoDB® não homologas a humanos.
- Determinar os alelos de HLAs de classe I e II mais frequentes na população da América do Sul, América do Norte e Europa;
- Determinar os critérios de definição de um alelo promíscuo aos HLAs de classe I e II;
- Padronizar o *threshold* para o processamento dos epítomos de MHC de classe I;
- Predizer os epítomos para HLAs classe I de humanos;
- Predizer a clivagem dos epítomos de HLAs de classe I;
- Predizer os epítomos para HLAs classe II de humanos;
- Predizer epítomos capazes de serem reconhecidos por linfócitos B;
- Avaliação *in silico* da antigenicidade dos epitopes usando VaxiJen preditos para linfócito B;
- Buscar na literatura informações sobre as proteínas selecionadas;
- Selecionar e propor os melhores candidatos (proteínas ou epítomos) para a construção de uma vacina de subunidade proteica.

5 MATERIAS E MÉTODOS

Para melhor compreensão das etapas experimentais do presente projeto, é apresentado um fluxograma (Figura 5).

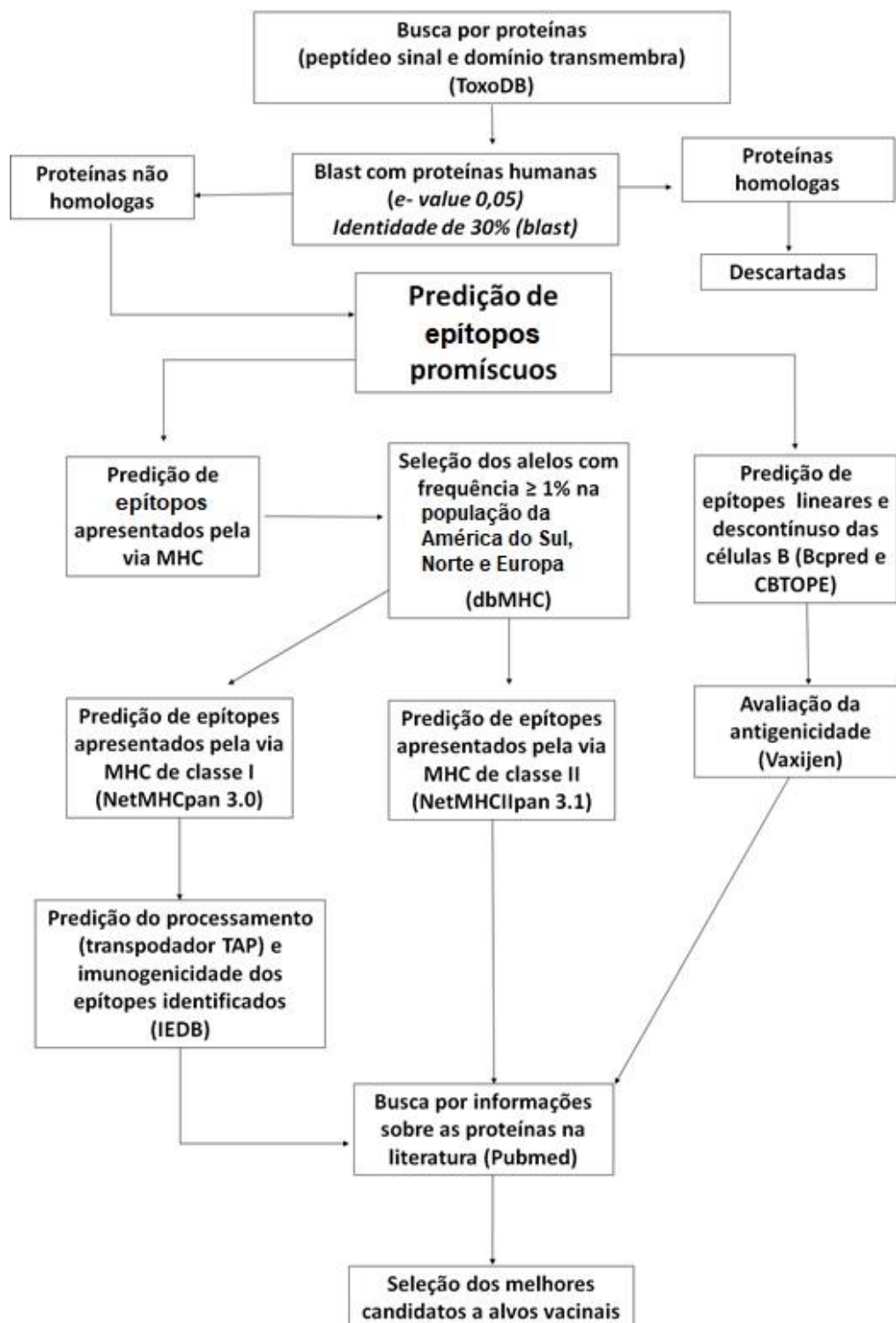


Figura 5 - Fluxograma de trabalho executado neste projeto.

5.1 Construção da biblioteca de proteínas de *Toxoplasma gondii*

5.1.1 Identificação das proteínas com domínio transmembranar e peptídeo sinal

A construção da biblioteca com as proteínas das cepas de *T. gondii* foi realizada empregando ferramentas de bioinformática disponíveis no portal ToxoDB (<http://www.toxodb.org/toxo/>), utilizando o menu de identificação de genes, selecionando a opção alvos proteicos e localização. Por meio da intersecção entre os filtros, todas as proteínas com peptídeo sinal e domínio transmembranar das oito cepas de *T. gondii* disponíveis na base de dados (Tabela 7) foram identificadas e organizadas em formato FASTA conforme opção oferecida pelo ToxoDB.

Tabela 7- Cepas atípicas do *Toxoplasma gondii* depositadas no ToxoDB.

Nº	Cepas	Local	Continente	Hospedeiro
1	ARI	EUA	América do Norte	Humano
2	TgCatPRC2	China	Ásia Oriental	Gato
3	FOU	França	Europa	Humano
4	GAB2-2007-GAL-OM2	Makokou, Gabão	África	Galinha
5	MAS	França	Europa	Humano
6	p89	EUA	América do Norte	Suíno
7	RUB	Guiana Francesa	América do Sul	Humano
8	VAND	Guiana Francesa	América do Sul	Humano

Fonte: Alruhaili, 2015 (Alruhaili 2015).

5.1.2 Análise da similaridade entre as proteínas de *Toxoplasma gondii* e as de humano

Para excluir das análises as proteínas de *T. gondii* com homologia as proteínas de humanos, avaliou-se a similaridade entre a biblioteca de proteínas de *T. gondii* construída conforme item 5.1 com o proteoma humano obtido na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/proteomes/>) sob ID UP000005640.

Para o alinhamento das proteínas, utilizamos a ferramenta *BLASTp* obtida na plataforma *NCBI* (do inglês: *National Center for Biotechnology Information*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adotamos os parâmetros: identidade $\leq 30\%$ em um *E-value* $\leq 0,05$ e aquelas proteínas que apresentaram resultados de alinhamento com identidade maior 30 % não foram utilizadas nas análises seguintes.

5.2 Determinação dos alelos de HLAs de classe I e II mais frequentes

As ferramentas de predição de epítomos de MHC de classe I e II exigem a indicação da matriz alélica a ser utilizada em suas análises. Assim, antes de realizar a predição dos epítomos, fez-se necessário a identificação dos alelos de MHC a serem utilizados. Neste estudo, o critério utilizado para a escolha dos alelos baseou-se na frequência em que eles ocorrem nas populações analisadas. Considerando a população da América do Sul, Europa e da América do Norte, buscou-se por todos os alelos que apresentam uma frequência $\geq 1\%$. Para isso usou-se a base de dados *dbMHC* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gv/mhc/ihwg.cgi?cmd=page&page=AnthroMain>) ancorado na plataforma NCBI. O nome dos alelos de cada população e suas respectivas frequências foram organizados em tabelas através da ferramenta Excel do pacote office 2013.

5.3 Predição de epítomos promíscuos para HLAs de classe I

Após a seleção dos alelos conforme descrito no item 5.2, as proteínas da biblioteca foram submetidas a predição de epítomos para os HLAs de classe I e II. Para os HLAs de classe I, usou-se o *NetMHCpan 3.0* que realiza a predição dos epítomos pelo método pan-específico e uma rede neural artificial que possibilita a predição de epítomos para as moléculas de HLA-A, B, C de humanos, camundongos (H-2) e outros organismos (Nielsen & Andreatta 2016).

Na análise, as sequências de aminoácidos das proteínas de *T. gondii* foram submetidas ao programa indicando os alelos das respectivas populações com frequência $\geq 1\%$. Os parâmetros adotados foram: *threshold* de 0.5 % para forte ligante e 2 % para fraco. Essas análises foram realizadas em servidor de alto desempenho do setor de melhoramento de plantas da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

Um epítopo foi definido como promíscuo de acordo o número de vezes que ele foi previsto pelo programa como ligante das moléculas de HLAs usado na análise. Assim, para a via de MHC de classe I relacionada principalmente com processamento e apresentação de epítomos citosólicos, adotou-se a proteína de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) usada na vacina contra essa doença (Zuckerman 1985, Kane 1995) como controle positivo. Para isso, a sequência de aminoácido da HBsAg foi obtida no bando de dados NCBI sob ID (GenBank: ABF71042.1) e submetida ao *NetMHCpan 3.0* com os alelos selecionados conforme item 5.3. O número máximo de ligantes para os epítomos preditos em HBsAg foi considerado como *threshold* para as análises com as proteínas de *T. gondii*.

O resultado da análise com as proteínas de *T. gondii* deu-se em plataforma Linux aplicando os filtros acima descritos por meio de *script* desenvolvido pelo nosso grupo e os epítomos considerados promíscuos foram listados em arquivo texto com o respectivo ID da proteína a qual pertencia.

5.4 Predição de processamento e transporte pelo transportador associado ao processamento de antígenos

Os epítomos apresentados pelas moléculas de HLA de classe I foram selecionados por um processo que envolve múltiplos passos: clivagem proteasomal, transporte pelo transportador associado ao processamento de antígeno (TAP) e a ligação ao MHC de classe I. Assim, depois de predizer os epítomos ligantes aos receptores de HLA de classe I, avaliou-se também o processamento desse epítomo e a ligação deles ao transportador TAP. Para isso, usou-se a fermentada *MHC-I Processing Predictions* ancorado no *IEDB* (<http://tools.iedb.org/processing/>) que utiliza um novo método de predição, o imunoproteassoma, capaz de identificar epítomos que serão, naturalmente, processados e apresentados por células infectadas (Tenzer et al. 2005a).

Portanto, para prosseguir com as análises, as sequências de aminoácidos das proteínas com epítomos promíscuos identificados conforme o item 5.4 foram submetidas ao *MHC-I Processing Predictions*. Para essa análise, adotaram-se as matrizes alélicas, bem como, a definição do melhor score de acordo com o trabalho de Comber et al. realizado em 2014 (Comber et al. 2014). Esse estudo conseguiu identificar, através do imunoproteassoma, cinco epítomos ligantes aos alelos HLA-A2 e A24 capazes de induzir resposta de células T contra o HBV.

5.5 Predição de epítomos promíscuos para HLAs classe II

Para a predição dos epítomos promíscuos aos HLAs de classe II, seguiu-se semelhante à dos alelos de classe I. Os alelos foram selecionados conforme item 5.3 e as análises foram realizada no *NetMHCIIpan 3.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>) utilizando o método pan-específico para os três isótipos de MHC de classe II de humanos (HLA-DR, DP e DQ). Esse software foi executado, em colaboração com o Professor Doutor Evandro Novaes, no servidor de alta desenho do Setor de Melhoramento de Plantas da Faculdade de Agronomia

da Universidade Federal de Goiás, adotando forte ligante com $\leq 2\%$ e $\geq 10\%$ como fraco ligante.

A definição dos epítomos promíscuos aos alelos de HLAs de classe II, ocorreu de maneira semelhante aos HLAs de classe I. Os epítomos promíscuos foram definidos de acordo o número de ligações que estabeleciam entre os alelos analisados. Porém, como a via de HLA de classe II está relacionada ao processamento e apresentação de moléculas fagocitadas, adotou-se os antígenos usados na vacina recombinante contra tétano e difteria na definição do *threshold*. Assim, as sequências de aminoácidos da toxina tetânica (WP_011100836.1) e da toxina diftérica (CAA24778.1) foram obtidas no NCBI e submetidas ao *NetMHCIIpan 3.1*. O número máximo de ligantes para os epítomos preditos foi comparado entre esses dois antígenos e aquele que apresentou o menor número foi adotado como *threshold* nas análises com as proteínas de *T. gondii*.

5.6 Predição dos epítomos para MHC de classe I e II de camundongos

Os epítomos preditos nas proteínas de *T. gondii* foram avaliados quanto a sua capacidade de ligação aos receptores MHC de camundongos, vista confirmação desses epítomos *in vivo*. Portanto, na análise, as sequências das proteínas foram submetidas ao *NetMHCpan 3.0* (Nielsen & Andreatta 2016) para os alelos de MHC de classe I: H-2-Db, H-2-Dd, H-2-Kb, H-2-Kd, H-2-Kk, H-2-Ld, H-2-Qa1, H-2-Qa2) adotando forte ligante com *threshold* $\leq 0.5\%$ e $\geq 2\%$ para fraco ligante. E para a via de MHC de classe II usou-se o *NetMHCIIpan 3.1* (Karosiene et al. 2013) indicando os alelos: H-2-IAb e H-2-IAd, definindo *threshold* de forte ligante $\leq 2\%$ e $\geq 10\%$ para fraco ligante.

5.7 Predição de epítomos contínuos de células B

Para a análise de epítomo de células B contínuos, as sequências de aminoácidos das proteínas foram inseridas no *BCPREDS* (El-Manzalawy et al. 2008) e adotou-se os seguintes parâmetros: *BCpred* como método de predição, 16 como quantidade de resíduos de aminoácido e a especificidade de 85 %. Os epítomos considerados positivos foram aqueles que apresentaram score igual um.

5.8 Predição de epítomos descontínuos de células B

Para a predição de epítomos conformacionais ou descontínuos, as sequências de proteínas do *T. gondii* foram submetidas ao *CBTOPE* (Ansari & Raghava 2010) sobre um

threshold para o SVM de -0,3, o mesmo usado no desenvolvimento do algoritmo. Para os resultados, as proteínas do *T. gondii* que apresentaram resíduos de aminoácidos com score igual ou superior a seis foram selecionadas e submetidas a avaliação da antigenicidade.

5.9 Predição da antigenicidade dos epítomos

Após a predição dos epítomos contínuos e descontínuos de células B, avaliou-se a antigenicidade dessas proteínas através do *VaxiJean* v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>), uma ferramenta que realiza a predição independente de alinhamento com antígenos protetores. A classificação do antígeno ocorre, exclusivamente, com base nas propriedades físico-químicas das proteínas. Um único organismo alvo pode ser selecionado e a acurácia fica em torno de 70 a 89 % (Doytchinova & Flower 2007).

Portanto, as sequências de aminoácidos das proteínas de *T. gondii* com epítomos de células B foram inseridas no *VaxiJean* sob *threshold* de 0.5, selecionando o organismo alvo como “parasite”. Aquelas proteínas consideradas como antígenos foram organizadas em tabela usando a ferramenta Excel do pacote office 2013.

5.10 Busca na literatura de informações sobre as proteínas selecionadas

As proteínas que foram positivas em todos os filtros acima descritos foram avaliadas com base a dados da literatura, sobre função, localização, uso em estudo vacinal e estágio de *T. gondii* em que é expressa. A busca dos artigos foi realizada utilizando as bases de dados SciELO, LILACS, PUBMED e Google Acadêmico.

Após as análises foram escolhidas as proteínas ou epítomos mais promissores para a realização da etapa experimental, visando a síntese e expressão, bem como os ensaios *in vitro* e *in vivo*.

6 RESULTADOS

6.1 Identificação *in silico* de proteínas de *Toxoplasma gondii* com domínio transmembranar e peptídeo sinal

Utilizando o *ToxoDB*, identificamos um total de 7717 proteínas com peptídeo sinal e domínio transmembranar entre as 11 cepas de *T. gondii* depositadas na base de dados. Desse total, aplicamos filtros para remover as proteínas redundantes entre as cepas e alcançamos um total de 1228 proteínas das quais apenas 29 % (n=356) apresentaram localização celular descrita pelo *Gene ontology*. Dessas 357 proteínas, (57,87 %, n= 206) estão localizadas na membrana, e também relacionadas a virulência, tais como: proteínas apicais (10,67 %, n= 38), do aplicoplasto (3,09 %, n= 11), da roptría (0,56 %, n= 2) e proteínas secretadas (1,40 %, n= 5 (Figura 7).

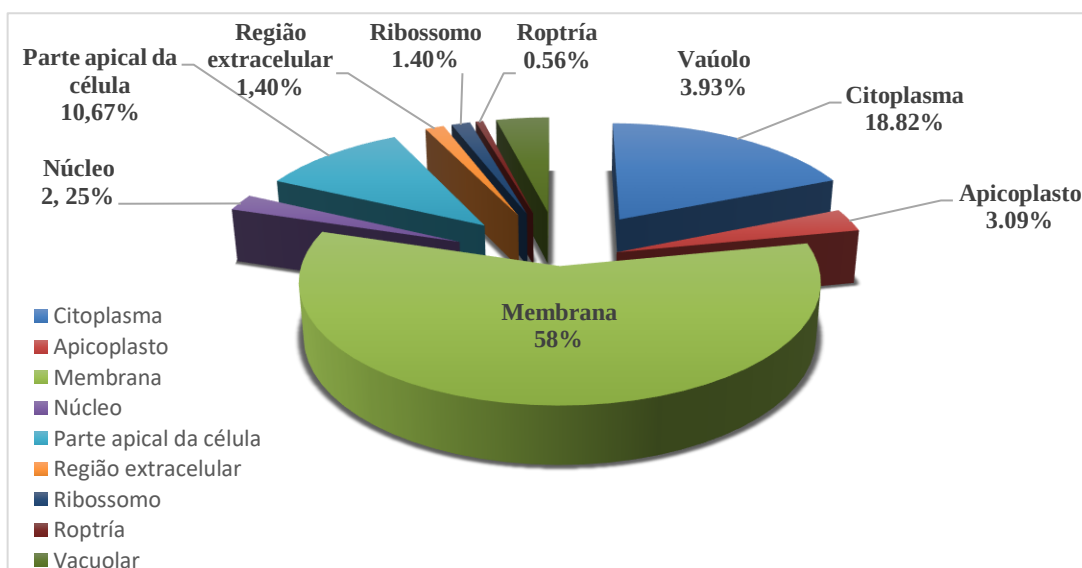


Figura 7- Localização celular das proteínas de *Toxoplasma gondii* com peptídeo sinal e domínio transmembranar selecionadas nesse estudo através do *ToxoDB*. A localização celular foi obtida através do termo GO (*Gene ontology*= *Cellular Component*) e 57,87 %, n= 206 das proteínas estão localizadas na membrana, 18,82 %, n= 67 no citoplasma, 10,67 %, n= 38 na parte apical do *T. gondii*, vacúolos 3,93 %, n=14, aplicoplasto 3,09 %, n= 11, núcleo com 2,65 %, n= 8 e região extracelular 1,40 %, n= 5 , ribossomo 1,40 %, n= 5 e roptría com 0,56 %, n= 2.

Posteriormente, as 1228 proteínas de *T. gondii* foram alinhadas com o proteoma humano e o resultado foi avaliado quanto a identidade sob um *e-value* de 0.05. Todas as proteínas que apresentaram identidade maior ou igual a 30 % foram consideradas homólogas e removidas da biblioteca. As análises seguintes foram realizadas com 349 proteínas com domínios transmembranar e peptídeo sinal que não apresentaram homologia com as proteínas

de humanos. Das 349 proteínas analisadas, cerca de 54 % (188 proteínas) das proteínas são da cepa VEG (Tipo III) (Figura 8).

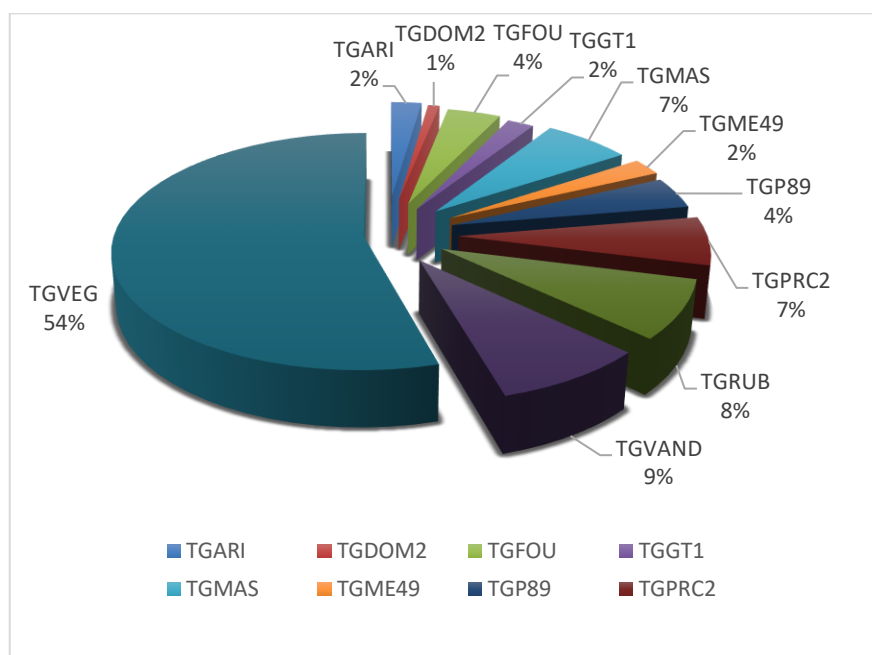


Figura 8 - Distribuição das proteínas entre as cepas de *Toxoplasma gondii* depositadas no *ToxoDB*. Um total de 11 cepas de *T. gondii* (GT1, VEG, ARI, DOM2, FOU, MAS, P89, PRC2, RUB e VAND) foi usada para a construção da biblioteca de proteínas. Das 349 proteínas, 54% (188) pertencem a cepa VEG. As outras 10 cepas apresentaram porcentagens próximas (GT1 - 2%, ARI - 2%, DOM2 - 1%, FOU - 4%, MAS - 7%, P89 - 4%, PRC2 - 7%, RUB - 8% e VAND - 9%).

6.2 Identificação *in silico* dos alelos de HLAs mais frequente na população da América do Sul, América Norte e Europa

O número de alelos com frequência maior ou igual uma das populações da América do Sul, América do Norte e Europa foram obtidos a partir da base de dados *dbMHC* e estão ilustrados abaixo de acordo a via em que pertencem (quadro 2)

Quadro 2 - Quantidade de alelos de MHC de classe I e II com frequência ≥ 1 das populações da América do Sul, América do Norte e Europa, dados obtidos a partir da base de dados *dbMHC*

População	Quantidade de alelos	
	MHC I	MHC II
América do Sul	35	47
América do Norte	44	35
Europa	50	53

6.3 Definição *in silico* dos epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II

A definição dos epítomos promíscuos aos receptores de HLA de classe I e II foi realizada adotando como modelo o antígeno da vacina contra hepatite B (HBsAg), toxinas diftérica e tetânica que são usadas como antígenos vacinais contra hepatite B, difteria e tétano, respectivamente. Para a via de MHC de classe I usou-se o número máximo de ligantes encontrado para o antígeno HBsAg e para via de MHC de classe II usou-se o número máximo de ligantes encontrados para as toxinas diftérica e tetânica conforme ilustrado abaixo (Quadro 3).

Quadro 3 -Números de ligações preditas dos antígenos vacinais HBsAg, tóxina diftérica e tetânica aos alelos selecionados das populações analisadas.

População	HBsAg	Toxina diftérica e tetânica
	MHC I	MHC II
América do Sul	28	10
América do Norte	31	13
Europa	35	37

6.3.1.1 Processamento *in silico* dos epítomos promíscuos pela via de MHC de classe I

Os cinco epítomos de HBV foram analisados pelo *MHC-I processing Prediction* tanto para a predição da ligação ao TAP como para a clivagem pelo imunoproteassoma e o resultado da análise foi usados como *threshold* para a análise das proteínas de *T. gondii* (Tabela 8).

Tabela 8 - Controle positivo para a predição do TAP e imunoproteassoma.

Número de acesso (UniProt)	Proteína	Peptídeo	MHC-I Processing Prediction Results – IEDB (score)
Q0EED2	Surface (S)	FLGGPPVCL	2.15
Q6WYY8	Surface (S)	ILRSFIPLL	1.91
I0DE20	Polymerase (P)	FLKQQYMNL	1.88
L7QBE1	Polymerase (P)	FLSKQYMDL	1.64
Q8B4E6	Polymerase (P)	TVSTKLCKI	1.36

Fonte: Comber et al. 2014 (Comber et al. 2014)

6.3.2 Epítomos preditos para a população da América do Sul

6.3.2.1 Epítomos promíscuos aos de HLAs de classe I e II

Para a via de MHC de classe II, todos os epítomos das proteínas de *T. gondii* previsto como ligantes a pelo menos 10 dos 47 alelos analisados foram considerados promíscuos. Esse foi o número máximo de ligações previstas aos receptores de HLA de classe II encontrado para a toxina diftérica. Dessa forma, das 349 proteínas do *T. gondii* analisadas para essa via apenas 286 apresentaram epítomos promíscuos aos HLAs de classe II da população da América do Sul.

Em relação à via de MHC de classe I, usamos como modelo o antígeno HBsAg que se ligou a 28 dos 35 alelos mais frequente dessa população. Assim, identificamos 230 proteínas de *T. gondii* com epítomos promíscuos aos receptores de classe I. Avaliamos o processamento desses epítomos e, assim, as 230 proteínas anteriormente identificadas foram reduzidas a 78 que realmente apresentaram epítomos promíscuos, processados e apresentados pela via de HLA de classe I.

Dessa forma, 56 proteínas com epítomos promíscuos aos de MHC de classe I e II foram identificadas na população sul-americana. Com base nos dados da literatura, destacamos entre essas 56 proteínas: ROM4, ROP7, ROP8, *cathepsin CPC1*, além de duas proteínas putativas, a *rhoptry neck protein* e *LMBR1 family region protein* conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 - Alvos vacinais contra *Toxoplasma gondii* selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população da América do Sul.

Proteína	Processo Biológico	Estágio do Parasita	MHC – I*	MHC-I processamento	MHC de classe II*	Importância médica	Referência
LMBR1			YAAFVCYLL LLAEHSAAL	1.70 1.78	FLITLLANLKLLFYF FLLYFLITLLANLKL LITLLANLKLLFYFE LLYFLITLLANLKLL PWKRALSKTVLAVCC RRTPWKRALSKTVLA VVFVVYILCRSISLK VYILCRSISLKIDDD FVVYILCRSISLKID LYFLITLLANLKLLF RTPWKRALSKTVLAV TPWKRALSKTVLAVC VFVVYILCRSISLK VYVYILCRSISLKID YFLITLLANLKLLFY	Diagnóstico e candidato vacinal	(Cardona et al. 2015)
<i>Putative rhoptry neck protein</i>	Invasão	-	LVAPTFAAL TMMARATAL YIFANDASL	2.19 2.04 2.02	GSAILLDEAFVELVQ LRVRLYIMALLPQFT NMMRFAGIAFEQLSM RVRLYIMALLPQFTP SLGLIFAYTLLSALD VNSFRY IFANDASL N FRY IFANDASL NFFE KSGQAFMYANMMRFA NSFRY IFANDASL NF GLIFAYTLLSALDIA IFAYTLLSALDIAQF LGLIFAYTLLSALDI LIFAYTLLSALDIAQ AYTLLSALDIAQFLT FAYTLLSALDIAQFL SFRY IFANDASL NFF	Candidato vacinal	ToxoDB (http://toxodb.org/toxo)
ROM4	Invasão	Taquizoíto	YMHGGWLHI	1.60	WLHILINLSCQIQL	Vacina	(Buguliskis et al. 2010, Rugarabamu et al. 2015, Zhang et al. 2015b, Han et al. 2017, Rahimi et al. 2017)
ROP7	Fase crônica	Bradizoíto	YSIEFLFSL	1.64	AARLYLTVQAVRLVA DAARLYLTVQAVRLV	Vacina e Diagnóstico	(Hajj et al. 2006, Frickel et al. 2008a, b, Wang et al. 2016)
ROP8	Fosforilação de proteínas	Taquizoíto	MTFSFDAWAL	2.00	VHTFFRAVDIVLDQR GLVHTFFRAVDIVLD LVHTFFRAVDIVLDQ	Diagnóstico e vacina	(Huang et al. 2004, Parthasarathy et al. 2013, Sonaimuthu et al. 2014)

*Epítomos em negrito foram positivos para MHC de classe I e II.

6.3.3 Epítomos preditos para a população da América do Norte

6.3.3.1 Epítomos promíscuos aos de HLAs de classe I e II

A predição para essa população foi realizada conforme descrito para a população da América do Sul. Para a via de HLA de classe II, foram considerados como epítomos promíscuos aqueles previstos como ligantes a pelos menos 13 dos 35 alelos indicados na análise. Assim, foram identificadas 275 proteínas com epítomos previsto como ligantes aos receptores de HLA de classe II das população norte-americana. Para a via de HLA de classe I, foram considerados como promíscuos aqueles que apresentaram ligação a 31 dos 44 alelos analisados. Foram identificadas 116 proteínas de *T. gondii* com epítomos previsto.

Portanto, dentre as 105 proteínas de *T. gondii* que apresentavam epítomos promíscuos aos receptores de HLA de classe I e II mais frequente na população da América do Norte, buscamos, eleger com base na literatura, as que apresentavam as melhores características de um bom candidato vacinal contra o *T. gondii*. Assim, destacamos MIC15, ROP7, ROP31, subtilisina SUB2 e duas proteínas putativa, *HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein* e *rhoptry neck protein* (Tabela 10).

Tabela 10 - Alvos vacinais contra *Toxoplasma gondii* selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população da América do Norte.

Proteína	Processo Biológico	Estágio do Parasita	MHC-I	Processamento MHC I	MHC de classe II*	Importância médica	Referência
HECT	-	-	FSLFGAAAL FALWGLSPF	1.89 1.89	VFEFLQRLAALRAVE VGSLKSLGAGRGVA VKNFLFRASTIYRVH VLQHYTNLPAAAFPS VLQKQLKLAITSCVD VLVALAGTKSLLPA VPTFTRLMSRVHARH VRQQILRLPGFSYAF VSLSPSFALLPASH VSLVRLHAPLEALCV VVRPFQVATSLDGAL WGWTFAVSVANRAEV WQLLNALPADAFDLA WTFAVSVANRAEVLQ WTVGSLKSLGAGRG YKVALSASSFALPLR YQRAFALAEHLKRSY	Diagnóstico e candidato vacinal	(Felgner et al. 2015)
MIC15	Invasão	Taquizoíto	YRSTAAYLPL FPRWPAVTSL FTNPAAAYL FLFFGTFSL	1.48, 1.64 1.73, 1.79	VAVVISNLKTNSELE WITAFRALSHKKGVV YHLQTFRIPAAAYSA	Candidato vacinal	ToxoDB (http://toxodb.org/toxo)
<i>Putative rhoptry neck protein</i>	Invasão	-	YPSFANFFFF	2.39	VGNAYMIIRSQSRTI VNSFRYIFANDASLN VRAQTFRRQPPPTTLR VVGNAVMIIRSQSRT WTKRLFSHSRSIPML YGLENLMNLATSHQA YMIIRSQSRTILRTE YVNSFRYIFANDASL	Candidato vacinal	ToxoDB (http://toxodb.org/toxo)
ROP31	Esporulação	Esporozoíto	FAVPFATFY	2.77	VAVKILSSY AQMTNL VWNRFRVQTHFARL WNRFRVQTHFARLA	Candidato Vacinal	(Wang et al. 2017)
ROP7	Fase crônica	Bradizoíto	YSIEFLFSL	1.64	VGRFFRHGIPAAAGR VKLLVYKLINPSVEA YLANRYLRFLAPFDL YSIEFLFSLCRRRAPE	Vacina e Diagnóstico	(Hajj et al. 2006, Frickel et al. 2008a, b, Wang et al. 2016)
Subtilisina SUB2	Invasão	Taquizoíto	YMMDPVPGL	2.00	VKDIIRITASPVEQL VLRLVHMSAVARNG YGMHMITATHAWIHG	Candidato vacinal	(Smith et al. 2014)

*Epítomos em negrito foram positivos para MHC de classe I e II.

6.3.4 Epítomos preditos para a população Européia

A predição dos epítomos ocorreu de maneira semelhante à utilizada para as populações anteriores. Para a via de HLA de classe II, adotamos como promíscuos aqueles epítomos previstos como ligantes a 37 dos 53 receptores de HLA de classe II analisados. Identificamos 242 proteínas do *T. gondii* que apresentavam epítomos promíscuos aos alelos de HLA de classe II dessa população. Com relação à via de HLA de classe I, aqueles epítomos das proteínas de *T. gondii* que foram previstos como ligantes a pelo menos 35 dos 50 alelos indicados na análise, foram considerados promíscuos. Assim, foram identificadas 100 proteínas que apresentaram epítomos previsto. Após análise de processamento dos epítomos, as 100 proteínas de *T. gondii* com epítomos ligantes foram reduzidas a 83 proteínas.

Dentre as 83 proteínas de *T. gondii* com epítomos promíscuos selecionadas, buscamos eleger, com base em dados da literatura, aquelas que apresentavam as melhores características para um bom candidato vacinal. Assim, destacamos MIC15, ROP7, *HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein (HECT)* e *LMBR1 family region protein* conforme Tabela 11.

Tabela 11 - Alvos vacinais contra *Toxoplasma gondii* selecionados por predição de epítomos ligantes aos alelos da população europeia.

Proteína	Processo Biológico	Estágio do Parasita	MHC-I	MHC-I processamento IEDB	MHC de classe II	Importância médica	Referência
HECT	-		FRFSYAFHPF FPLPAFASLL	2.26 1.37	AFFSLQASLFLDVFQ DPPIYQRAFALAEHL DWQLLNALPADAFD EFLQRLAALRAVERS FLQRLAALRAVERS IYQRAFALAEHLKRS RDWQLLNALPADAFD SSRYFWLSCSTQVLS YTPLLLTSPLQLSLA AAFFVFEFLQRLAAL ADAFLDAFAPRRVRL FEFLQRLAALRAVER PPIYQRAFALAEHLK AKAFFSLQASLFLDV EAKAFFSLQASLFLD KAFFSLQASLFLDVF LLFTEIAAQIRVPRV PIYQRAFALAEHLKR REAKAFFSLQASLFL RFFLLLFTEIAAQI VFEEFLQRLAALRAVE AFFVFEFLQRLAALR FFFLLLFTEIAAQIR FFVFEFLQRLAALRA LLLFTEIAAQIRVPR FLLLFTEIAAQIRV FLLLFTEIAAQIRVP FVFEFLQRLAALRAV	Diagnóstico e candidato vacinal	(Felgner et al. 2015)
LMBR1	-		MSFVGWFTF	2.78	AFLKLLAEHSAALLA LKLLAEHSAALLALL DAFLKLLAEHSAALL FLKLLAEHSAALLAL AFGFLDAFLKLLAEH PAFGFLDAFLKLLAE	Diagnóstico e candidato vacinal	(Cardona et al. 2015)
MIC15	Invasão	Taquizoíto	HAFDVTTHAF YTYTHTDAY	2.50 2.48	CFETDFRS AETLMAL TLYAVRWLAVEATSA ANATRLDWITAFRAL ATRLDWITAFRALSH NATRLDWITAFRALSH TRLDWITAFRALSHK	Candidato vacinal	ToxoDB (http://toxodb.org/toxo)
ROP7	Fase crônica	Bradizoíto	YSIEFLFSL	1.64	AARLYLTQAVRLVA DAARLYLTQAVRLV	Vacina e Diagnóstico	(Hajj et al. 2006, Frickel et al. 2008a, b, Wang et al. 2016)

7 Predição de epítomos de *Toxoplasma gondii* preditos para linfócitos B

7.1 Score adotado para predição de epítomos de células B

O *CBTOPE* foi avaliado quanto a sua capacidade de identificar as regiões imunodominantes de antígenos vacinais previamente descritos na literatura. A bactéria *Burkholderia pseudomallei*, *Bophilus microplus*, vírus da hepatite B, West Nile vírus, *Papiloma vírus humano* e o Zika vírus foram usados. Essa ferramenta foi capaz de identificar, com alta precisão, os resíduos de aminoácidos que interagem com os anticorpos. Assim, adotou-se 6 como o menor score na predição com as proteínas de *T. gondii* (Tabela 12).

Tabela 12 - Definição do score para a predição de epítomos de célula B.

Patógeno	Tipo	Antígeno	Epítopo	Epítopo predito CBTOPE	score	Ref.
Hepatite B	Recombinante	HBsAg	120- CRTCTTLAQG TSMYPSCCTK PSDGNCTCIPI PSSWAFGK- 160	130- SMYPSCCCTKPSDG NCTCIPI-156	8	(Paulij et al. 1999, Zuckerman & Zuckerman 2000, Zhang et al. 2006)
Papilomavírus humano	Recombinante	L1 -HPV	11- VYLPPVPVFK VVSTDEYVA RTNIYYHAGT SRL LAVGHPY FPIKKPNNNK ILVPKVSGLQ YRVFRIXLPD PNKFGFPD-88	49- FPIKKPNNNKILV- 63	8	(Karanam et al. 2009, Jagu et al. 2010, Lee et al. 2016)
West Nile virus (WNV)	Vacina de DNA	Glicoproteína de envelope	130- IFVHGPTTVE SHGNYSTQA GATQAGRFSI TPAAPSYTLK LGEYGEVTV DCEPRSGIDT NAYY-193	160- PAAPSYTLKLGE YGEVTV DCEPRS GIDTN-190	8	(Minke et al. 2004, Sánchez et al. 2005)
<i>Bophilus microplus</i>	Recombinante	BM86	516- QCPPDTKPGE IGCIE-530	502- KGQIFVYENGKAN CQCPPDTKP-522	7	(Odongo et al. 2007, Freeman et al. 2010)
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Epitope sintético	Flagelina	270- ATAMVAQIN AVNKPQTVS- 288	282- KPQTVSNLDISTQ -295	7	(Nithichanon et al. 2015)
Zika vírus	Vacina de DNA	Proteína E	231**	233- PHWNNKEALVEF KDAHAKRQTVV VLGSQEGAVH- 267	6	(Crill & Chang 2004, Hasan et al. 2017, Boigard et al. 2017)

**231 resíduo de triptofano essencial na interação entre o anticorpo e a proteína de envelope E do Zika vírus (Crill & Chang 2004).

7.2 Epítomos preditos de células B

Foram identificadas 93 proteínas de *T. gondii* que apresentam epítomos descontínuos de célula B. No entanto, listamos aqui apenas 13 proteínas que estão diretamente envolvidas na virulência desse patógeno e dentre essa damos destaque as proteínas MIC8 e MIC9 que apresentaram score igual a 8 (Tabela 13).

Tabela 20 - Epítomos descontínuos preditos para os linfócitos B.

Proteína	Processo biológico	Estágio do parasita	CBTOPE (score)	Bcpred (Nº)	VaxiJen (score 0.5)	Estudo	Ref.
ROM5	Protease	Taquizoíto	6	1	0.5514	Vacina de DNA	(Buguliskis et al. 2010, Shen et al. 2014, Rugarabamu et al. 2015, Zhang et al. 2015b)
RON6	Desconhecido	-	6	47	1,0840	Não avaliada	-
ROP8	Fosforilação de proteínas	Taquizoíto e Bradizoíto	6	3	0.6801	Diagnóstico e Vacina	(Parthasarathy et al. 2013, Sonaimuthu et al. 2014)
ROP9	Invasão	Taquizoíto	6	1	0.5943	Vacina de DNA	(Reichmann et al. 2002, Chen et al. 2014)
MIC17C	Proteólise	Bradizoíto	7	0	0.6367	Não avaliado	(Pittman et al. 2014)
MIC2	Invasão	Taquizoíto	7	8	0.677	Vacina de DNA e de subunidade de proteica	(Huynh & Carruthers 2006, Dautu et al. 2007)
ROM4	Invasão	Taquizoíto	7	5	0.677	Vacina de DNA	(Buguliskis et al. 2010, Han et al. 2017, Rahimi et al. 2017)
ROP20	Fosforilação de proteínas	Taquizoíto	7	3	0.4157	Não avaliado	(Ning et al. 2015)
ROP7	Fosforilação de proteínas	Bradizoíto	7	3	0.587	Vacina de DNA	(Frickel et al. 2008a, Parthasarathy et al. 2013, Wang et al. 2016)
MIC15	Invasão (domínios)	Taquizoíto	7	8	0.5918	Não avaliado	ToxoDB (http://toxodb.org/toxo)
HECT	-	-	7	28	0.671	Diagnóstico	(Felgner et al. 2015)
MIC9	Desconhecido	Bradizoíto	8	2	0.6254	Não avaliado	(Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig et al. 2002)
MIC8	Invasão	Taquizoíto	8	2	0.5522	Vacina de DNA	(Kessler et al. 2008, Liu et al. 2010)

7.3 Proteínas positivas em diferentes populações

Com o objetivo de selecionar as proteínas mais promissoras, avaliamos se haviam proteínas positivas incomum entre a populações analisadas. Assim, identificamos 29 proteínas que foram positivas para as todas a populações, 26 proteínas entre população da América do Norte e Europa e 14 proteínas comum a população da américa do sul e américa do Norte (Figura 9).

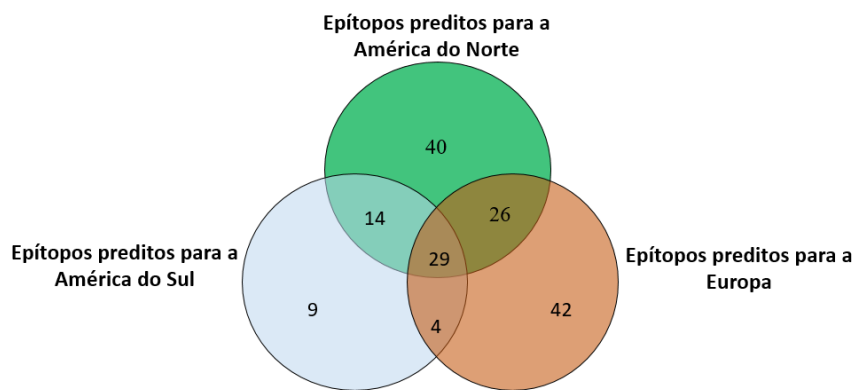


Figura 21 - Proteínas com epítomos promíscuos comuns entre as diferentes populações.

Com base nas informações obtidas na literatura, algumas proteínas foram destacadas por estarem envolvidas em processos importantes na biologia do parasito como a invasão celular, serem conservadas entre a cepas de *T. gondii* e serem possíveis marcadores para diagnóstico ou antígeno vacinal (Figura 10).

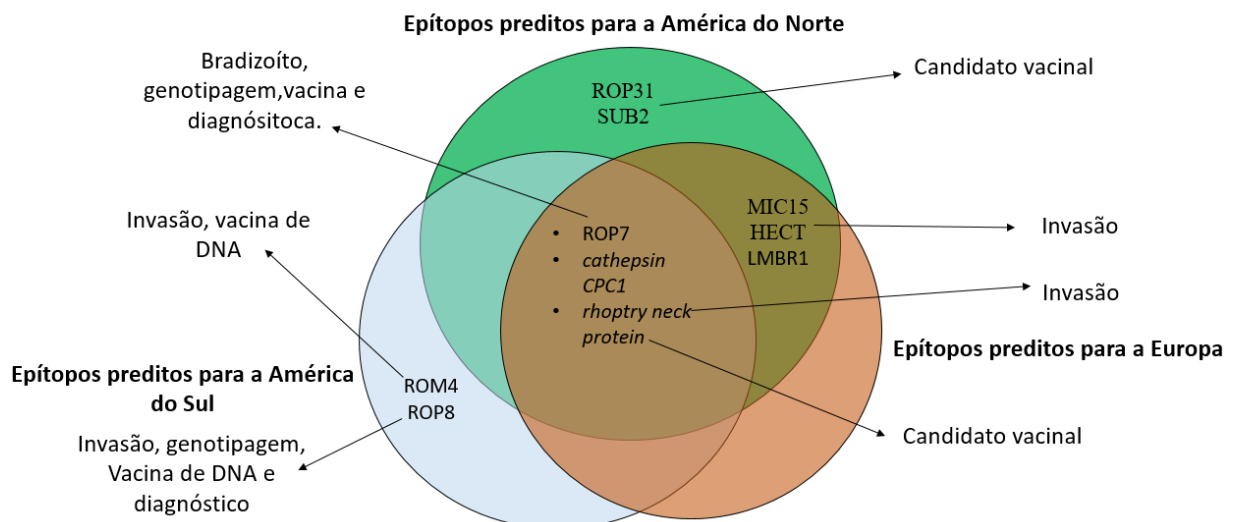


Figura 29 - Característica funcionais e de interesse médico das proteínas comuns as diferentes populações.

8 DISCUSSÃO

T. gondii apresenta características intrínsecas que dificultam o desenvolvimento de uma vacina eficaz. Esse protozoário possui três formas infectante em humanos, taquizoíta, esporozoíta (Oocisto) e bradizoíta, correspondente a fase aguda e crônica da infecção, respectivamente. Esses três estágios apresentam perfis de expressão de proteínas diferente, fazendo com que uma proteína vacinal específica de um determinado estágio não seja eficaz contra a outro. Essa dificuldade soma-se ainda ao crescente surgimento de cepas atípicas e recombinantes que aumentam a variabilidade genética desse protozoário (Jongert et al. 2009) e também aos mecanismos de evasão da resposta imune que permitem a permanência de cistos de bradizoítos nos tecidos onde ficam protegidos da defesa do hospedeiro e também da ação medicamentosa (Lim & Othman 2014).

No entanto, a abordagem empregada nesse estudo permitiu selecionar proteínas de *T. gondii* que são bons candidatos vacinais por serem homologas entre cepas clonais, atípicas e recombinantes, apresentarem epítomos de células B e epítomos de célula T promíscuos aos alelos de HLAs das populações que são acometidas por infecção provocada por cepas com diferentes genótipos.

8.1 Característica das proteínas de *Toxoplasma gondii* selecionada para o estudo de predição de epítomos de células B e T

Visando identificar candidatos para a construção de uma vacina contra *T. gondii*, buscamos no proteoma desse patógeno, proteínas que apresentam peptídeo sinal e domínios transmembranas, ou seja, proteínas que teoricamente são secretadas ou ancoradas na superfície da célula. Aplicamos filtros para selecionar apenas as proteínas conservadas entre as onze cepas depositada no ToxoDB e realizamos o alinhamento das proteínas de *T. gondii* com o proteoma humano para excluir da análise todas as proteínas que apresentam homologias com as proteínas humanas e selecionar aquelas mais antigênicas (Abbas Abul K. et al. 2011).

Assim, foram selecionadas 349 proteínas homologas entre as 11 cepas analisadas. Desse total, 54 % (188 proteínas) são da cepa VEG (Tipo III) (Figura 7), que teve o seu genoma novamente sequenciada indicando que sua anotação genômica pode ser mais acurada em relação as outras cepas analisadas (Ramaprasad et al. 2015) e provavelmente por esse

motivo ocorreu esse destaque. Com relação a localização celular, realizamos a pesquisa através do termo GO (*Gene ontology*) associado ao *ToxoDB* e a maioria das 349 proteínas selecionadas estão localizadas na membrana (57,87 %, n= 206), seguida do citoplasma (18,82 %, n= 67), na parte apical do *T. gondii* (10,67 %, n= 38), vacúolos (3,93 %, n=14), apicoplasto (3,09 %, n= 11), núcleo com (2,65 %, n= 8) e região extracelular (1,40 %, n= 5) , ribossomo (1,40 %, n= 5) e roptria (0,56 %, n= 2). (Figura 6). Componente celulares importante não só com relação a identificação de antígenos vacinais, como as proteínas de membrana, mas também para a identificação de novos alvos de drogas, como apicoplasto que será discutido adiante.

Dessa forma, podemos afirmar que as proteínas usadas neste estudo são conservadas entre as diferentes cepas desse patógeno, não apresentam homologias com as proteínas de humanos e são mais propensas a interagirem com as células do hospedeiro e serem reconhecidas pelo sistema imune.

8.2 Alelos de HLAs da população da América do Sul, América do Norte e Europeia usados nesse estudo

Selecionamos os alelos com frequência maior ou igual a 1 % nas populações da América do Norte, Europa e América do Sul que constituem as regiões em que as cepas tipo I, II, III e cepas atípicas ocorrem, respectivamente, como maioria dos casos relatados (Shwab et al. 2014). Em outras palavras, buscamos identificar epítomos que fossem comuns entre as onze cepas de *T. gondii*, mas que também fossem imunogênicos nas populações em que essas cepas circulam com maior frequência.

8.3 Aspectos gerais na definição de epítomos promíscuos aos HLAs para o desenvolvimento de uma vacina contra *Toxoplasma gondii*

A principal via efetora do sistema imune envolvida na proteção contra *T. gondii* se dá pela produção de IFN- γ induzida por linfócitos CD8⁺. Apesar disso, linfócitos CD4⁺ também atuam nesse mecanismo exercendo um papel sinérgico no combate ao parasito, provavelmente estimulando o aumento da síntese de IFN- γ produzido pelas células CD8⁺. Desse modo, uma vacina contra o *T. gondii* deve induzir um papel sinérgico entre as células CD8⁺ e CD4⁺ resultando na ativação de linfócito *helper* e na produção de IFN- γ gerando a proteção contra as infecções posteriores (Gazzinelli et al. 1992, Yarovinsky 2014).

Com vista nesse mecanismo, buscamos definir os epítomos promíscuos aos receptores de HLA de classe I e II, e para isso utilizamos como modelo o antígeno da vacina contra hepatite B, o HBsAg e as toxinas diftérica e tetânica que são usadas como antígenos nas vacinas contra difteria e tétano (McAleer et al. 1984). A escolha do HBsAg se deu pelo fato de que, apesar de ser uma molécula produzida através da tecnologia de DNA recombinante em leveduras e ser processada pela via de MHC de classe II, tratar-se de um antígeno de origem viral, obrigatoriamente intracelular e que será reconhecida principalmente pelas células CD8⁺ (Thimme et al. 2003). Diferente do antígeno HBsAg, as toxinas diftérica e tetânica são fagocitadas e processada pela via de MHC de classe II e por esse motivo foram adotadas nesse estudo.

Desse modo, utilizando os antígenos vacinais, estabelecemos um controle positivo para a definição dos epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II. Assim, o número máximo de ligações predito para os antígenos vacinais (HBsAg, toxinas tetânica e diftérica) foi usado como *threshold* na predição dos epítomos das proteínas de *T. gondii*, fazendo com que todas as proteínas desse patógeno, identificadas nesse estudo, com epítomos promíscuos aos HLAs analisados, apresentaram no mínimo o mesmo número de ligação que os antígenos da vacina contra hepatite B, tetânica e diftérica.

8.4 Correlação entre o score do processamento dos epítomos promíscuos pela via de MHC de classe I e a antigenicidade do epítopo

Como a via de MHC de classe I apresenta distinção quanto ao processamento, apresentação e natureza do antígeno envolvido, fez-se necessário avaliar as etapas intrínsecas dessa via que inclui a clivagem pelo imunoproteassoma e a ligação ao transportador TAP que estão relacionadas aos epítomos citósolicos (Abbas Abul K. et al. 2011). Para essa análise, foi necessário definir o melhor *score* para o resultado do *MHC-I processing Prediction*.

Utilizamos cinco epítomos oriundo do HBV, tanto para a predição da ligação ao TAP, como para a clivagem pelo imunoproteassoma. Esses epítomos foram selecionados por se ligarem aos receptores de HLAs de classe I e induzirem a produção de IFN- γ conforme demonstrado por Comber et al. 2014. Nesse sentido, os epítomos das proteínas de *T. gondii* que apresentaram pontuação igual ou superior à obtida pelo *MHC-I processing Prediction* para os epítomos de HBV foram considerados positivos conforme demonstrado na Tabela 8.

Vale ressaltar que a abordagem empregada para a definição do *score* para o *MHC-I processing Prediction* constitui um importante dado para a literatura tendo em vista que essa ferramenta não possui uma avaliação detalhada da correlação entre o *score* previsto e a antigenicidade do peptídeo, o que dificulta a interpretação dos resultados da previsão (Tenzer et al. 2005b).

8.4.1 A promiscuidade das proteínas de *Toxoplasma gondii* entre as populações da América do Sul, América do Norte e Europa

Em razão da diversidade dos alelos entre as diferentes populações analisadas, foram identificados quantidade diferentes de proteínas positivas para cada população, sendo: 56 proteínas para a América do Sul, 105 para a América do Norte e 83 para a população europeia. Das quais, foi possível notar que houve proteínas específicas em cada população, bem como, proteínas comuns as três populações analisadas, criando perspectivas não só no contexto vacinal, mas também de diagnóstico.

Com relação as proteínas específicas de cada população, das 56 proteínas identificadas na população da América do Sul, nove foram positivas somente nessa população. E dessas, destacamos ROM4 e ROP8 que são descritas como fatores de virulência de *T. gondii* e demonstraram potencial imunogênico através de vacinas de DNA, sendo capazes de induzir proteção parcial contra novas infecções por *T. gondii* (122,149,150, 152,189). Além do mais, ROP8 é conhecida por ser um marcador para o diagnóstico da toxoplasmose (Sonaimuthu et al. 2014). Em relação a análise para população da América do Norte, das 105 proteínas positivas, 40 foram positivas apenas nessa população e dessas destacamos ROP31 que é expressa durante os quatro primeiros dias da infecção (Nam 2009, Wang et al. 2017) e apresentou epítomos preditos com o melhor *score* de processamento para a via de MHC de classe I. Destacamos também a subtilisina SUB2 que apesar de não haver nenhum estudo avaliando o potencial imunogênico dessa proteína contra o *T. gondii*, a homóloga dela em *Plasmodium falciparum* foi capaz de ativar a resposta imune bloqueando o desenvolvimento do parasito e induzindo proteção contra malária severa (Smith et al. 2014). Com base nas informações obtidas na literatura, não destacamos proteínas que foram positivas somente na população europeia (Figura 9).

Também analisamos as proteínas que foram positivas em diferentes populações e destacamos ROP7, cathepsin CPC1 e *rhopty neck protein* por terem sido selecionada nas três

populações analisadas e apresentarem-se promissoras no contexto de diagnóstico e vacina. A proteína ROP7 e *cathepsin CPC1* foram capazes de induzir proteção parcial contra novas infecções por *T. gondii* (152,191) e ROP7 destaca-se ainda por ser um marcador para genotipagem, reafirmando a sua conservação entre as cepas de *T. gondii* (191). A proteína putativa *rhostry neck protein* por apresentar o maior número de epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II da população da América do Sul, inclusive, um mesmo epítopo para ambas as vias, bem como a maior pontuação quanto ao processamento dos epítomos de classe I (Tabela 9). Além disso, essa proteína possui um domínio Clag, que está relacionado à invasão celular e está presente em outras proteínas como RON2 que junto as outras proteínas do complexo RON (RON4, RON5 e RON8) exercem um papel importante no processo de invasão das células do hospedeiro por *T. gondii* (Takemae et al. 2013).

Destacamos ainda, três proteínas *LMBR1 family region protein*, *HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein* e MIC15 por serem positivas para a população da América do Norte e Europeia. A proteína *LMBR1 family region protein* chama atenção por seu potencial como marcador para diagnóstico sendo capaz de induzir níveis significativos de IFN- γ em abordagem similar à empregada no presente estudo, limitando-se, contudo, ao uso de apenas um alelo de classe I, o *HLA-A*02*. MIC15 por apresentar seis domínios *Thrombospondin type-1 (TSP1) repeat profile* que estão relacionados com as proteínas de superfície celular e matriz extracelular indicando envolvimento no processo de invasão das células do hospedeiro (Vizcaino et al. 2013). E, as proteínas *HECT-domain (ubiquitin-transferase) domain-containing protein* por apresentar potencial como marcador para diagnóstico da infecção por *T. gondii* com 47 % de sensibilidade e 100 % de especificidade (Felgner et al. 2015).

Dessa forma, ressaltamos que foram identificadas proteínas específicas de cada população, bem como proteínas positivas em duas ou até mesmo todas as populações analisadas. Essa promiscuidade das proteínas selecionadas entre as populações analisadas é uma característica importante no contexto de uma vacina contra *T. gondii* pelo fato de se esperar uma resposta protetiva nas três populações. No entanto, as proteínas que não foram comuns as três populações, ou até mesmo foram específicas a uma única população também são importantes, caso sejam imunogênicas, porque podem ser associadas as proteínas comuns em uma vacina de subunidade, levando ao aumentando a imunogenicidade dessa vacina.

Além do mais, tanto as proteínas específicas como as promíscuas entre as populações podem ser usadas como marcadores para o diagnóstico da infecção.

8.5 Vantagens da abordagem de predição de epítomos de células B empregada nesse estudo

Com objetivo de construir uma vacina com os melhores antígenos de *T. gondii*, as 349 proteínas selecionadas neste estudo foram avaliadas também quanto à presença de epítomos reconhecidos pelos linfócitos B. Essa predição foi realizada para os epítomos descontínuos e contínuos através do software *CBTOPE* e do *BCPREDS*, respectivamente. No entanto, o foco desse trabalho foi voltados aos epítomos descontínuos por constituírem 80 % dos peptídeos reconhecidos pelas células B (Pomés 2010).

Antes de realizarmos a predição de epítomos de células B com as proteínas de *T. gondii*, avaliamos a capacidade do *CBTOPE* em reconhecer os resíduos de aminoácidos de antígenos vacinais que possuem mapeamento da região de interação epítopo anticorpo descrita na literatura. Para isso adotamos a bactéria *Burkholderia pseudomallei*, o carrapato *Bophilus microplus* e os vírus da hepatite B, West Nile vírus, Papiloma vírus humano e o Zika vírus, os resultados dessa avaliação foram ilustrados na tabela 12 mostrando uma precisão surpreendente dessa ferramenta. O que nos levou adotar score 6 como o ponto de corte para a predição de epítomos de célula B de *T. gondii*. Pois esse foi o mesmo score encontrado para a região imunodominante da proteína de envelope E do zika vírus que comprovadamente é imunogênica sendo capaz de prevenir a infecção por Zika vírus em camundongos (Crill & Chang 2004, Hasan et al. 2017, Boigard et al. 2017).

Assim, a abordagem empregada na definição do score na análise de epítomos de célula B fomentou a eficiência do *CBTOPE* e possibilitou que selecionássemos nesse estudo apenas aquelas proteínas de *T. gondii* que realmente apresentam epítomos de célula B imunodominantes.

8.6 Proteínas de *Toxoplasma gondii* apresentam epítomos promíscuos aos HLAs e de classe I e II e epítomos de célula B

Das 349 proteínas de *T. gondii* utilizada nesse estudo, 93 apresentam epítomos descontínuos de célula B. No entanto, aqui destacaremos apenas 13 proteínas que estão diretamente envolvidas na virulência desse patógeno (Tabela 13). Primeiramente, destaca-se

cincos proteínas, ROP7, ROP8, ROM4, MIC15 e HECT que também apresentaram epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II das populações analisadas. ROM4, MIC15 e HECT apresentaram resíduos com score 7, ou seja, 70 % de probabilidade de interagirem com a fenda dos anticorpos (Ansari & Raghava 2010). Sendo esse, o mesmo score encontrado para os antígenos das vacinas contra *Bophilus microplus* e *Burkholderia pseudomallei* (Kemp et al. 1989, Dowd et al. 2016, Aschenbroich 2017) indicando o potencial dessas proteínas como bons candidatos vacinais contra *T. gondii*.

Além do mais, foram identificadas nessa análise, outras proteínas MIC2, ROM5, ROP9 e MIC8 que foram avaliadas em estudos vacinais contra *T. gondii* e se mostraram capazes de induzir proteção contra a infecção (Dautu et al. 2007, Liu et al. 2010, Chen et al. 2014, Zhang et al. 2015b). MIC2 foi capaz de induzir a redução de 80 % dos cisto de bradizoíto em camundongos (Beghetto et al. 2005), já MIC8 em nossa análise, apresentou um score 8 e, recentemente, foi descrita em um estudo vacinal, associada a partículas virais, que gerou 100 % de proteção contra a infecção por *T. gondii* em camundongos (Lee et al. 2017). Chama-se atenção ainda para outra proteína identificada nesse estudo com score 8, a proteína MIC9 que é altamente expressa no estágio de bradizoíto (Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig et al. 2002) e que até o momento não foi usada em estudos vacinais, mesmo apresentando-se como forte candidato vacinal para a construção de uma vacina terapêutica contra o estágio crônico da infecção.

Diante desses resultados, pode-se afirmar que a vacinologia reversa associada a imunômica constitui uma abordagem eficaz na seleção de bons candidatos vacinais contra *T. gondii*, como foi mostrado nesse estudo através da identificação de proteínas que não só apresentaram epítomos promíscuos aos alelos de HLAs analisados, mas também epítomos de células B com interação epítopo anticorpo semelhante à de antígenos de vacinas licenciadas.

8.7 Proteínas de *Toxoplasma gondii* selecionadas para a expressão heteróloga

Por meio da vacinologia reversa associada imunômica foram identificadas nove proteínas com epítomos promíscuos aos alelos de HLAs analisados e 14 proteínas com epítomos de células B. No entanto, avaliar *in vitro* e *in vivo* a imunogenicidade dessas proteínas demandaria um alto investimento financeiro o que tornaria inviável a consumação desse projeto. Por isso, selecionamos entre as proteínas de *T. gondii* identificadas nesse estudo

aquelas que apresentaram as melhores características como candidatos vacinais, mas que também possuem um potencial como marcador de diagnóstico.

Assim, primeiramente elegemos as dez melhores proteínas selecionadas nesse estudo não só por apresentarem epítomos de célula B e epítomos de células T promíscuos aos alelos de HLAs (ROP7, ROP8, ROM4, MIC15 e HECT), mas também por serem proteínas de virulências (MIC2, ROM5, ROP9, MIC8 e MIC9) que não possuem epítomos promíscuos aos alelos de HLAs, mas que apresentaram epítomos descontínuos de células B com score elevado.

Das dez proteínas de *T. gondii* selecionadas, com exceção de MIC15 e MIC9, todas as outras proteínas indicadas foram usadas em vacinas de DNA e se mostraram capazes de induzir resposta imune parcial contra *T. gondii*. No entanto, como já foi dito, mesmo as vacinas de DNA sendo capazes de produzir uma resposta imune Th1 melhorada com produção aumentada de citocinas inflamatórias, IFN- γ e IL-2, até o momento, essa abordagem vacinal não foi eficaz na proteção do hospedeiro contra novas infecções por *T. gondii* (Zhang et al. 2012b, Yuan et al. 2013, Pena et al. 2013, Chen et al. 2013, 2014, 2015, 2016, Parthasarathy et al. 2013, Lim & Othman 2014, Ahmadpour et al. 2017, Rahimi et al. 2017).

Dessa forma, o uso dessas proteínas em vacinas de DNA confirma a eficácia da abordagem empregada nesse estudo para a identificação de bons alvos vacinais e permite sugerir ROP7, ROP8, ROM4, MIC15, MIC8, bem como, MIC8 e MIC9 para a construção de uma vacina de subunidade contra *T. gondii*. Pois, essas proteínas foram positivas nos filtros adotados para a seleção de epítomos de MHC de classe I e II das populações analisadas, como também, na predição de epítomos de células B. Nesse contexto, vale ressaltar que as vacinas de subunidades proteicas foram eficazes na proteção contra infecções causadas por protozoários como *Bophilus microplus* em bovinos (Gavac®) (Kemp et al. 1989), *Babesia canis* em cachorro (Schetters 2005) e também em *Eimeria máxima* (Coxabac®) (Witcombe et al. 2004) que faz parte do filo apicomplexa.

Em relação as proteínas MIC8 e MIC9, que apresentaram score 8 na predição para epítomos de células B. MIC8 foi capaz de gerar 100% de proteção contra a infecção pelo *T. gondi* em camundongos com testes vacinais usando vetores (Lee et al. 2017) e MIC9 é altamente expressa no estágio de bradizoíto (Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig et al. 2002) constituindo um bom alvo para construção de uma vacina terapêutica que induza a redução dos cisto de bradizoíto.

Assim, com o objetivo validar a metodologia *in silico* empregada nesse estudo. Seleccionamos cinco proteínas dentre as dez acima citadas: ROP7, ROP8, ROM4, MIC8 e MIC9 para expressão heteróloga com o objetivo de avaliar o potencial imunogênico dessas proteínas *in vivo*, bem como, avaliar a especificidade e sensibilidade no contexto do diagnóstico.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A abordagem adotada nesse estudo para a seleção de antígeno através da vacinologia reversa associada imunômica foi capaz de identificar nove proteínas com epítomos promíscuos aos alelos de HLAs analisados, 14 proteínas com epítomos de células B e 12 alvos para o desenvolvimento de novos fármacos contra *T. gondii*.

Assim, a associação da imunômica à vacinologia reversa foi eficaz na seleção de alvos vacinais promissores contra *T. gondii* e fato de algumas das proteínas terem sido usadas em vacinas de DNA, somados as outras características anteriormente citadas, bem como a identificação de outras proteínas ainda não avaliada em estudos vacinais, confirmam a eficácia da metodologia desenvolvida nesse estudo para a seleção de novos alvos vacinais. Além do mais, as proteínas identificadas como potenciais alvos de fármacos, indica que a metodologia aqui empregada foi eficaz tanto na identificação de novos alvos vacinais, como na seleção de alvos para o desenvolvimento de novas drogas.

10 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados discutidos anteriormente, nós propomos duas abordagens para avaliar experimentalmente o potencial imunogênico das proteínas aqui selecionadas. Primeiro, produziremos e purificaremos as proteínas ROP7, ROP8, ROM4, MIC8 e MIC9 que possuem epítomos promíscuos aos HLAs de classe I e II das populações analisadas e epítomos positivos para linfócito B. Essas proteínas, além de imunogênicas, fazem parte do arsenal de virulências do *T. gondii* (Frickel et al. 2008c, Buguliskis et al. 2010, Parthasarathy et al. 2013, Rugarabamu et al. 2015), constituindo assim, alvos promissores para a construção de uma vacina eficaz. Portanto, avaliaremos a imunogenicidade dessas proteínas associadas a um adjuvante como antígenos vacinal contra a infecção por *T. gondii* em camundongos.

A segunda abordagem consiste na avaliação da especificidade e sensibilidade dessas proteínas no contexto do diagnóstico da infecção. Para isso, nós utilizaremos uma biblioteca de soro de crianças e gestantes com diagnóstico confirmado para infecção por *T. gondii* cedida gentilmente pela Professora Doutora Ana Maria de Castro do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás – UFG – Goiânia (GO).

REFERÊNCIAS

- Abbas Abul K., Lichtman; AH, Pillai S 2011. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, Rio de Janeiro.
- Ahmadpour E, Sarvi S, Hashemi Sotesh MB, Sharif M, Rahimi MT, Valadan R, Tehrani M, Khalilian A, Montazeri M, Fasihi-Ramandi M, Daryani A 2017. Enhancing immune responses to a DNA vaccine encoding *Toxoplasma gondii* GRA14 by calcium phosphate nanoparticles as an adjuvant. *Immunol. Lett.* 185: 40–47.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Su C, Dumètre A, Demar M, Carme B, Dardé ML 2004. Genetic diversity, clonality and sexuality in *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 34: 1185–1196.
- Ajzenberg D, Bañuls AL, Tibayrenc M, Dardé ML 2002. Microsatellite analysis of *Toxoplasma gondii* shows considerable polymorphism structured into two main clonal groups. *Int. J. Parasitol.* 32: 27–38.
- Almeida MJ de, Oliveira LHH de, Freire RL, Navarro IT 2011. Aspectos sociopolíticos da epidemia de toxoplasmose em Santa Isabel do Ivaí (PR). *Cien. Saude Colet.* 16: 1363–1373.
- Alruhaili MH 2015. Genetic diversity of African isolates of *Toxoplasma gondii*. *University of Salford*.
- Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M 2015. Accurate pan-specific prediction of peptide-MHC class II binding affinity with improved binding core identification. *Immunogenetics* 67: 641–650.
- Ansari HR, Raghava GP 2010. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res.* 6: 6.
- Aoun K 2014. *Neglected Tropical Diseases - Middle East and North Africa* (MA McDowell and S Rafati, Eds.). Springer Vienna, Vienna.
- Aschenbroich SA 2017. DNA vaccination resurfaces in the struggle against melioidosis. *Virulence* 5594: 1–3.
- Backert L, Kohlbacher O 2015. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. *Genome Med.* 7: 1–12.
- Bahia-Oliveira, L., Gomez-Marin, J., and Shapiro K 2017. Part Three . Specific Excreted Pathogens : Environmental And Epidemiology Aspects Copyright : Toxoplasmosis. *Glob. Water Pathog. Proj.*
- Beghetto E, Nielsen H V., Porto P Del, Buffolano W, Guglietta S, Felici F, Petersen E, Gargano N 2005. A Combination of Antigenic Regions of *Toxoplasma gondii* Microneme Proteins Induces Protective Immunity against Oral Infection with Parasite Cysts. *J. Infect. Dis.* 191: 637–645.
- Bhasin M, Raghava GPS 2007. A hybrid approach for predicting promiscuous MHC class I restricted T cell epitopes. *J. Biosci.* 32: 31–42.

- Bhopale GM 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26: 213–222.
- Bischoff AR, Friedrich L, Cattán JM, Uberti FA de F 2014. Incidência de toxoplasmose congênita no período de 10 anos em um hospital universitário e frequência de sintomas nesta população. *Artig. Orig. Incidência* 4: 38–44.
- Blader IJ, Coleman BI, Chen C-T, Gubbels M-J 2015. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii* : 15 Years Later. *Annu. Rev. Microbiol.* 69: 463–485.
- Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P 2013. Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 443–473.
- Boigard H, Alimova A, Martin GR, Katz A, Gottlieb P, Galarza JM 2017. Zika virus-like particle (VLP) based vaccine (RC Kading, Ed.). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005608.
- Bottos J, Miller RH, Belfort RN, Macedo AC, Belfort Jr. R, Grigg ME 2009. Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of *Toxoplasma gondii*. *Br J Ophthalmol* 93: 1546–1550.
- Braga-Neto UM, Marques ETA 2006. From Functional Genomics to Functional Immunomics: New Challenges, Old Problems, Big Rewards. *PLoS Comput. Biol.* 2: e81.
- Brenier-Pinchart MP, Pelloux H, Simon J, Ricard J, Bosson JL, Ambroise-Thomas P 2000. *Toxoplasma gondii* induces the secretion of monocyte chemotactic protein-1 in human fibroblasts, in vitro. *Mol Cell Biochem* 209: 79–87.
- Buguliskis JS, Brossier F, Shuman J, Sibley LD 2010. Rhomboid 4 (ROM4) affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii* (K Kim, Ed.). *PLoS Pathog.* 6: e1000858.
- Buxton D, Innes E a 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 110 Suppl: S11-6.
- Calis JJA, Maybeno M, Greenbaum JA, Weiskopf D, Silva AD De, Sette A, Keşmir C, Peters B 2013. Properties of MHC Class I Presented Peptides That Enhance Immunogenicity. *PLoS Comput. Biol.* 9.
- Câmara JT, Silva MG da, Castro AM de 2015. Prevalência de toxoplasmose em gestantes atendidas em dois centros de referência em uma cidade do Nordeste, Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 37: 64–70.
- Cardona NI, Moncada DM, Gómez-Marin JE 2015. A rational approach to select immunogenic peptides that induce IFN- γ response against *Toxoplasma gondii* in human leukocytes. *Immunobiology* 220: 1337–1342.
- Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, Bichat S, Louvel D, Bourbigot AM, Peneau C, Neron P, Darde ML 2002. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. *J Clin Microbiol* 40: 4037–4044.
- Carme B, Demar M, Ajzenberg D, Dardé ML 2009. Severe Acquired Toxoplasmosis Caused by Wild Cycle of *Toxoplasma gondii*, French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 656–658.

- Carmo EL do, Póvoa MM, Monteiro NS, Marinho RR, Nascimento JM, Freitas SN, Bichara CNC 2010. Surto de toxoplasmose humana no Distrito de Monte Dourado, Município de Almeirim, Pará, Brasil. *Rev. Mex. Neurocienc.* 1: 61–66.
- Casella AMB, Reiche EMV, Lago EG, Morimoto HK, Inoue IT, Capobianco JD, Kohatsu M, Freire RL, Narciso SG 2010. Toxoplasmose Adquirida Na Gestação E Cong nita. *Div. Process. Técnicos da Bibl. Cent. da Univ. Estadual Londrina.*: Sistema de Gerenciamento de Conteudo.
- Castillo Martín F Del 2004. Toxoplasmosis congênita. Una enfermedad con demasiados interrogantes. *An. Pediatr.* 61: 115–117.
- Chen J, Huang S-Y, Li Z-Y, Yuan Z-G, Zhou D-H, Petersen E, Zhang N-Z, Zhu X-Q 2013. Protective immunity induced by a DNA vaccine expressing eIF4A of *Toxoplasma gondii* against acute toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 31: 1734–1739.
- Chen J, Li Z-Y, Petersen E, Huang S-Y, Zhou D-H, Zhu X-Q 2015. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens ROP5 and GRA15 induces protective immunity against toxoplasmosis in Kunming mice. *Expert Rev. Vaccines* 14: 617–624.
- Chen J, Li Z-Y, Petersen E, Liu W-G, Zhu X-Q 2016. Co-administration of interleukins 7 and 15 with DNA vaccine improves protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Exp. Parasitol.* 162: 18–23.
- Chen J, Liu H, Yang J, Chou KC 2007. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids* 33: 423–428.
- Chen J, Zhou D-H, Li Z-Y, Petersen E, Huang S-Y, Song H-Q, Zhu X-Q 2014. *Toxoplasma gondii*: Protective immunity induced by rhoptry protein 9 (TgROP9) against acute toxoplasmosis. *Exp. Parasitol.* 139: 42–48.
- Ching XT, Fong MY, Lau YL 2016. Evaluation of Immunoprotection Conferred by the Subunit Vaccines of GRA2 and GRA5 against Acute Toxoplasmosis in BALB/c Mice. *Front. Microbiol.* 7: 609.
- Clem AS 2011. Fundamentals of vaccine immunology. *J. Glob. Infect. Dis.* 3: 73–78.
- Comber JD, Karabudak A, Shetty V, Testa JS, Huang X, Philip R 2014. MHC Class I Presented T Cell Epitopes as Potential Antigens for Therapeutic Vaccine against HBV Chronic Infection. *Hepat. Res. Treat.* 2014: 860562.
- Contini C 2008. Clinical and diagnostic management of toxoplasmosis in the immunocompromised patient. *Parassitologia* 50: 45–50.
- Correia VR, Barros S, Colvero L de A 2013. Aten  o   saude do Recém-Nascido: Guias para os profissionais de Saúde -“Interven  es comuns, icter cia e infecções.” *MINISTÉRIO DA SAÚDE* 2.
- Crill WD, Chang G-JJ 2004. Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *J. Virol.* 78: 13975–13986.
- Crotzer VL, Blum JS 2010. Autophagy and adaptive immunity. *Immunology* 131: 9–17.

- Dardé ML 2008. *Toxoplasma gondii* , “new” genotypes and virulence. *Parasite* 15: 366–371.
- Dautu G, Munyaka B, Carmen G, Zhang G, Omata Y, Xuenan X, Igarashi M 2007. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. *Exp. Parasitol.* 116: 273–282.
- Demar M, Hommel D, Djossou F, Peneau C, Boukhari R, Louvel D, Bourbigot a-M, Nasser V, Ajzenberg D, Darde M-L, Carme B 2012. Acute toxoplasmoses in immunocompetent patients hospitalized in an intensive care unit in French Guiana. *Clin. Microbiol. Infect.* 18: E221-31.
- Desai D V., Kulkarni-Kale U 2014. T-Cell Epitope Prediction Methods: An Overview. In: *Methods Mol. Biol. Springer Protoc.*, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 333–364.
- Dowd KA, Ko S-Y, Morabito KM, Yang ES, Pelc RS, DeMaso CR, Castilho LR, Abbink P, Boyd M, Nityanandam R, Gordon DN, Gallagher JR, Chen X, Todd J-P, Tsybovsky Y, Harris A, Huang Y-JS, Higgs S, Vanlandingham DL, Andersen H, Lewis MG, La Barrera R De, Eckels KH, Jarman RG, Nason MC, Barouch DH, Roederer M, Kong W-P, Mascola JR, Pierson TC, Graham BS 2016. Rapid development of a DNA vaccine for Zika virus. *Science (80-.)*. 354: 237–240.
- Doytchinova IA, Flower DR 2007. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8: 4.
- Dubey JP 1980. Mouse pathogenicity of *Toxoplasma gondii* isolated from a goat. *Am. J. Vet. Res.* 41: 427–429.
- Dubey JP 2004. Toxoplasmosis - A waterborne zoonosis. *Vet. Parasitol.* 126: 57–72.
- Dubey JP 2008. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 467–475.
- Dubey JP 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 39: 877–882.
- Dubey JP, Frenkel JK 1972. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *J. Protozool.* 19: 155–177.
- Dubey JP, Graham DH, Dahl E, Hilali M, El-Ghaysh A, Sreekumar C, Kwok OCH, Shen SK, Lehmann T 2003. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* from chickens and ducks from Egypt. *Vet. Parasitol.* 114: 89–95.
- Dubey JP, Karhemere S, Dahl E, Sreekumar C, Diabaté a, Dabiré KR, Vianna MCB, Kwok OCH, Lehmann T 2005. First biologic and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Africa (Democratic Republic of Congo, Mali, Burkina Faso, and Kenya). *J. Parasitol.* 91: 69–72.
- Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL 2012. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology* 139: 1375–1424.
- Duraes F V., Niven J, Dubrot J, Hugues S, Gannagé M 2015. Macroautophagy in Endogenous Processing of Self- and Pathogen-Derived Antigens for MHC Class II Presentation.

Front. Immunol. 6: 1–9.

- El-Manzalawy Y, Dobbs D, Honavar V 2008. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels. *J. Mol. Recognit.* 21: 243–255.
- Elbez-Rubinstein A, Ajzenberg D, Dardé M, Cohen R, Dumètre A, Yera H, Gondon E, Janaud J, Thulliez P 2009. Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review. *J. Infect. Dis.* 199: 280–285.
- Elsheikha HM, Büsselberg D, Zhu X-Q 2016. The known and missing links between *Toxoplasma gondii* and schizophrenia. *Metab. Brain Dis.*
- Esshili A, Thabet S, Jemli A, Trifa F, Mechri A, Zaafrane F, Gaha L, Juckel G, Babba H, Bel Hadj Jrad B 2016. *Toxoplasma gondii* infection in schizophrenia and associated clinical features. *Psychiatry Res.* 245: 327–332.
- Felgner J, Juarez S, Hung C, Liang LI, Jain A, Doskaya M, Felgner PL, Caner A, Guruz Y, Davies DH 2015. Identification of *Toxoplasma gondii* antigens associated with different types of infection by serum antibody profiling. *Parasitology* 142: 827–838.
- Fleri W, Paul S, Dhanda SK, Mahajan S, Xu X, Peters B, Sette A 2017. The Immune Epitope Database and Analysis Resource in Epitope Discovery and Synthetic Vaccine Design. *Front. Immunol.* 8: 1–16.
- Fox J 1999. Gene therapy safety issues come to fore. *Nat. Biotechnol.* 17: 1153–1153.
- Freeman JM, Davey RB, Kappmeyer LS, Kammlah DM, Olafson PU 2010. Bm86 midgut protein sequence variation in South Texas cattle fever ticks. *Parasit. Vectors* 3: 101.
- Frickel E-M, Sahoo N, Hopp J, Gubbels M-J, Craver MPJ, Knoll LJ, Ploegh HL, Grotenbreg GM 2008a. Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. *J. Infect. Dis.* 198: 1625–1633.
- Frickel E-M, Sahoo N, Hopp J, Gubbels M-J, Craver MPJ, Knoll LJ, Ploegh HL, Grotenbreg GM 2008b. Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. *J. Infect. Dis.* 198: 1625–1633.
- Frickel E, Sahoo N, Hopp J, Gubbels M, Craver M, Knoll L, Ploegh H, Grotenbreg G 2008c. Parasite Stage-Specific Recognition of Endogenous *Toxoplasma gondii* - Derived CD8+ T Cell Epitopes. *J. Infect. Dis.* 198: 1625–1633.
- Fuentes I, Rubio JM, Ramírez C, Alvar J 2001. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* strains associated with human toxoplasmosis in Spain: direct analysis from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 39: 1566–1570.
- Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever a, Sher a 1992. Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 149: 175–180.
- Grande C Del, Galli L, Schiavi E, Dell'osso L, Bruschi F 2017. Is *Toxoplasma gondii* a Trigger of Bipolar Disorder?

- Grassmann AA, Kremer FS, Santos JC Dos, Souza JD, Pinto L da S, McBride AJA 2017. Discovery of Novel Leptospirosis Vaccine Candidates Using Reverse and Structural Vaccinology. *Front. Immunol.* 8: 463.
- Grigg ME, Sundar N 2009. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int. J. Parasitol.* 39: 925–933.
- Guo M, Dubey JP, Hill D, Buchanan RL, Gamble HR, Jones JL, Pradhan AK 2015. Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. *J. Food Prot.* 78: 457–476.
- Gutiérrez SE, Esteban EN, Lützelshwab CM, Juliarena MA 2017. Major Histocompatibility Complex-Associated Resistance to Infectious Diseases: The Case of Bovine Leukemia Virus Infection. In: *Trends Adv. Vet. Genet.*, InTech, p. .
- Hacein-Bey-Abina S, Kalle C Von, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, Saint Basile G de, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Deist F Le, Fischer A, Cavazzana-Calvo M 2003. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X1. *Science (80-.).* 302: 415–419.
- Hajj H El, Lebrun M, Fourmaux MN, Vial H, Dubremetz JF 2006. Characterization, biosynthesis and fate of ROP7, a ROP2 related rhoptry protein of *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 146: 98–100.
- Han Y, Zhou A, Lu G, Zhao G, Wang L, Guo J, Song P, Zhou J, Zhou H, Cong H, He S 2017. Protection via a ROM4 DNA vaccine and peptide against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. *BMC Infect. Dis.* 17: 59.
- Hasan SS, Miller A, Sapparapu G, Fernandez E, Klose T, Long F, Fokine A, Porta JC, Jiang W, Diamond MS, Crowe Jr. JE, Kuhn RJ, Rossmann MG 2017. A human antibody against Zika virus crosslinks the E protein to prevent infection. *Nat. Commun.* 8: 14722.
- He Y, Rappuoli R, Groot AS De, Chen RT 2010. Emerging vaccine informatics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 26.
- Heinson AI, Woelk CH, Newell M-L 2015. The promise of reverse vaccinology. *Int. Health* 7: 85–89.
- Ho-Yen DO 2009. Toxoplasmosis. *Medicine (Baltimore).* 37: 665–667.
- Horton R, Gibson R, Coggill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, Forbes S, Gilbert JGR, Halls K, Harrow JL, Hart E, Howe K, Jackson DK, Palmer S, Roberts AN, Sims S, Stewart CA, Traherne JA, Trevanion S, Wilming L, Rogers J, Jong PJ de, Elliott JF, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S 2008. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project. *Immunogenetics* 60: 1–18.
- Howe DK, Sibley LD 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: Correlation of parasite genotype with human disease. *J. Infect. Dis.* 172: 1561–1566.

- Huang X, Xuan X, Hirata H, Yokoyama N, Xu L, Suzuki N, Igarashi I, Garberi J, Angel S, Cesbron-Delauw M 2004. Rapid Immunochromatographic Test Using Recombinant SAG2 for Detection of Antibodies against *Toxoplasma gondii* in Cats. *J. Clin. Microbiol.* 42: 351–353.
- Innes E a, Bartley PM, Buxton D, Katzer F 2009. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 136: 1887–1894.
- Jagu S, Kwak K, Garcea RL, Roden RBS 2010. Vaccination with multimeric L2 fusion protein and L1 VLP or capsomeres to broaden protection against HPV infection. *Vaccine* 28: 4478–4486.
- Janse JJ, Wong GWK, Potts J, Ogorodova LM, Fedorova OS, Mahesh PA, Sakellariou A, Papadopoulos NG, Knulst AC, Versteeg SA, Kroes ACM, Vossen ACTM, Campos Ponce M, Kummeling I, Burney P, Ree R van, Yazdanbakhsh M 2014. The association between foodborne and orofecal pathogens and allergic sensitisation - EuroPrevall study. *Pediatr. Allergy Immunol.* 25: 250–256.
- Jongert E, Roberts CW, Gargano N, Förster-Waldl E, Förster-Wald E, Petersen E 2009. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104: 252–266.
- Kane M 1995. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine* 13 Suppl 1: S47-9.
- Karanam B, Jagu S, Huh WK, Roden RBS 2009. Developing vaccines against minor capsid antigen L2 to prevent papillomavirus infection. *Immunol. Cell Biol.* 87: 287–299.
- Karosiene E, Rasmussen M, Blicher T, Lund O, Buus S, Nielsen M 2013. NetMHCIIpan-3.0, a common pan-specific MHC class II prediction method including all three human MHC class II isotypes, HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. *Immunogenetics* 65: 711–724.
- Kaufman HE, Melton ML, Remington JS, Jacobs L 1959. Strain Differences of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 45: 189.
- Kedzierski L 2010. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J. Glob. Infect. Dis.* 2: 177–185.
- Kemp DH, Pearson RD, Gough JM, Willadsen P 1989. Vaccination against *Boophilus microplus*: localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarol.* 7: 43–58.
- Khan A, Jordan C, Muccioli C, Vallochi AL, Rizzo L V., Belfort R, Vitor RWA, Silveira C, Sibley LD 2006. Genetic divergence of *Toxoplasma gondii* strains associated with ocular toxoplasmosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 942–949.
- Kravetz J 2013. Congenital toxoplasmosis. *Clin. Evid. (Online)*. 2013: 2131–2138.
- Kringelum JV, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M 2012. Reliable B Cell Epitope Predictions: Impacts of Method Development and Improved Benchmarking. *PLoS Comput. Biol.* 8.
- Kumar Jaiswal A, Tiwari S, Jamal SB, Barh D, Azevedo V, Soares SC 2017. An In Silico Identification of Common Putative Vaccine Candidates against *Treponema pallidum*: A

- Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Based Approach. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Kur J, Holec-G?si?r L, Hiszczy?ska-Sawicka E 2009. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* 8: 791–808.
- Lee SH, Kim AR, Lee DH, Rubino I, Choi HJ, Quan FS 2017. Protection induced by virus-like particles containing *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 against highly virulent RH strain of *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS One* 12.
- Lee DH, Lee SH, Kim AR, Quan FS, Petersen E, Katz J 2016. Virus-Like Nanoparticle Vaccine Confers Protection against *Toxoplasma gondii* (SJ Turner, Ed.). *PLoS One* 11: e0161231.
- Lehmann T, Graham DH, Dahl E, Sreekumar C, Launer F, Corn JL, Gamble HR, Dubey JP 2003. Transmission dynamics of *Toxoplasma gondii* on a pig farm. *Infect. Genet. Evol.* 3: 135–141.
- Lim SS-Y, Othman RY 2014. Recent Advances in *Toxoplasma gondii* Immunotherapeutics. *Korean J. Parasitol.* 52: 581–593.
- Liu Q, Singla L Das, Zhou H 2012. Vaccines against *Toxoplasma gondii* Status, challenges and future directions. *Hum. Vaccin. Immunother.* 8: 1305–1308.
- Liu MM, Yuan ZG, Peng GH, Zhou DH, He XH, Yan C, Yin CC, He Y, Lin RQ, Song HQ, Zhu XQ 2010. *Toxoplasma gondii* microneme protein 8 (MIC8) is a potential vaccine candidate against toxoplasmosis. *Parasitol. Res.* 106: 1079–1084.
- Markus Meissner, Matthias Reiss, Nicola Viebig VB arruthers, Catherine Toursel, Stanislas Tomavo JWA and DS, Meissner M., Reiss M., Viebig N., Carruthers VB. TC, Tomavo S. AJ, and Soldat D. 2002. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domains and function as escorts. *J. Cell Sci.* 115: 563–574.
- Martin-Iguacel R, Ahlstr?m MG, Touma M, Engsig FN, St?rke NB, St?rkind M, Obel N, Rasmussen LD 2017. Incidence, presentation and outcome of toxoplasmosis in HIV infected in the combination antiretroviral therapy era. *J. Infect.* 75: 263–273.
- McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* 307: 178–180.
- Minke JM, Siger L, Karaca K, Austgen L, Gordy P, Bowen R, Renshaw RW, Loosmore S, Audonnet JC, Nordgren B 2004. Recombinant canarypoxvirus vaccine carrying the prM/E genes of West Nile virus protects horses against a West Nile virus-mosquito challenge. *Arch. Virol. Suppl.*: 221–230.
- Montoya JG, Remington JS 2008a. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 47: 554–566.
- Montoya JG, Remington JS 2008b. Clinical Practice: Management of *Toxoplasma gondii* Infection during Pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* 47: 554–566.
- Montoya JG, Rosso F 2005. Diagnosis and Management of Toxoplasmosis. *Clin. Perinatol.* 32: 705–726.

- Morais R dos APB, Freire ABC, Barbosa DRL, Silva L de CT da, Pinheiro AF, Costa SS da, Ramos FL de P, Bichara CNC, Lima LJB, Silva AV da, Souza SRP de, Piqueira LP, Gonçalves NV, Póvoa MM, Carmo EL do 2016. Surto de toxoplasmose aguda no Município de Ponta de Pedras, Arquipélago do Marajó, Estado do Pará, Brasil: características clínicas, laboratoriais e epidemiológicas. *Rev. Pan-Amazônica Saúde* 7: 143–152.
- Nam HW 2009. GRA proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of host-parasite interactions across the parasitophorous vacuolar membrane. *Korean J. Parasitol.* 47: 29–38.
- NEVES DP 2011. Parasitologia humana. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 34: 546.
- Nicolle C, Manceaux L 1909. Sur un protozoaire nouveau de Gondi, Toxoplasma. *Arch Inst Pasteur.* 2: 97–103.
- Nielsen M, Andreatta M 2016. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med.* 8: 33.
- Nielsen M, Andreatta M, Yewdell J, Bennink J, Hoof I, Peters B, Sidney J, Pedersen L, Sette A, Lund O, Nielsen M, Lundegaard C, Blicher T, Lamberth K, Harndahl M, Justesen S, Robinson J, Halliwell J, Hayhurst J, Flicek P, Parham P, Marsh S, Trolle T, Metushi I, Greenbaum J, Kim Y, Sidney J, Lund O, Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M, Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemoller S, Lamberth K, Buus S, Peters B, Sette A, Kim Y, Sidney J, Pinilla C, Sette A, Peters B, Karosiene E, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M, Kim Y, Sidney J, Buus S, Sette A, Nielsen M, Peters B, Lundegaard C, Lund O, Nielsen M, Deres K, Schumacher T, Wiesmuller K, Stevanovic S, Greiner G, Jung G, Rammensee H, Bachmann J, Emmerich N, Bachor O, Stevanovic S, Andreatta M, Nielsen M, Vita R, Overton J, Greenbaum J, Ponomarenko J, Clark J, Cantrell J, Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Paul S, Weiskopf D, Angelo M, Sidney J, Peters B, Sette A, Rao X, Costa A, Baarle D, Kesmir C, Larsen ME, Kloverpris H, Stryhn A, Koefethile C, Sims S, Ndung'u T, Kullback S, Leibler R, Andreatta M, Schafer-Nielsen C, Lund O, Buus S, Nielsen M, Nielsen M, Lund O, Karosiene E, Rasmussen M, Blicher T, Lund O, Buus S, Nielsen M, Nielsen M, Justesen S, Lund O, Lundegaard C, Buus S, Andreatta M, Karosiene E, Rasmussen M, Stryhn A, Buus S, Nielsen M, Collins E, Garboczi D, Wiley D, Rist M, Theodossis A, Croft N, Neller M, Welland A, Chen Z, Geironsen L, Thuring C, Harndahl M, Rasmussen M, Buus S, Roder G, Eichmann M, Ru A, Veelen P, Peakman M, Kronenberg-Versteeg D, Ternette N, Yang H, Partridge T, Llano A, Cedeno S, Fischer R 2016. NetMHCpan-3.0; improved prediction of binding to MHC class I molecules integrating information from multiple receptor and peptide length datasets. *Genome Med.* 8: 33.
- Nithichanon A, Rinchai D, Gori A, Lassaux P, Peri C, Conchillio-Solé O, Ferrer-Navarro M, Gourlay LJ, Nardini M, Vila J, Daura X, Colombo G, Bolognesi M, Lertmemonkolchai G 2015. Sequence- and Structure-Based Immunoreactive Epitope Discovery for *Burkholderia pseudomallei* Flagellin. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003917.
- Ntege EH, Takashima E, Morita M, Nagaoka H, Ishino T, Tsuboi T 2017. Blood-stage malaria vaccines: post-genome strategies for the identification of novel vaccine candidates. *Expert Rev. Vaccines* 16: 769–779.

- Odongo D, Kamau L, Skilton R, Mwaura S, Nitsch C, Musoke A, Taracha E, Daubenberger C, Bishop R 2007. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Vaccine* 25: 1287–1296.
- Olariu TR, Remington JS, McLeod R, Alam A, Montoya JG 2011. Severe congenital toxoplasmosis in the United States: clinical and serologic findings in untreated infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 30: 1056–1061.
- Palmieri N, Shrestha A, Rutkowski B, Beck T, Vogl C, Tomley F, Blake DP, Joachim A 2017. The genome of the protozoan parasite *Cystoisospora suis* and a reverse vaccinology approach to identify vaccine candidates. *Int. J. Parasitol.* 47: 189–202.
- Pappas G, Roussos N, Falagas ME 2009. Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* 39: 1385–1394.
- Parmley SF, Goebel FD, Remington JS 1992. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 3000–3002.
- Parthasarathy S, Fong MY, Ramaswamy K, Lau YL 2013. Protective immune response in BALB/c mice induced by DNA vaccine of the ROP8 gene of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88: 883–887.
- Paulij WP, Wit PLM De, Sünnen CMG, Roosmalen MH Van, Petersen-Van Ettehoven A, Cooreman MP, Heijtink RA 1999. Localization of a unique hepatitis B virus epitope sheds new light on the structure of hepatitis B virus surface antigen. *J. Gen. Virol.* 80: 2121–2126.
- Pena HFJ, Vitaliano SN, Beltrame MAV, Pereira FEL, Gennari SM, Soares RM 2013. PCR-RFLP genotyping of *Toxoplasma gondii* from chickens from Espírito Santo state, Southeast region, Brazil: New genotypes and a new SAG3 marker allele. *Vet. Parasitol.* 192: 111–117.
- Pessanha TM, Carvalho M de, Pone MVS, Gomes Júnior SC 2011. Abordagem diagnóstica e terapêutica da toxoplasmose em gestantes e as repercussões no recém-nascido. *Rev. Paul. Pediatr.* 29: 341–347.
- Peters B, Bulik S, Tampe R, Endert PM Van, Holzhütter H-G 2003. Identifying MHC class I epitopes by predicting the TAP transport efficiency of epitope precursors. *J. Immunol.* 171: 1741–1749.
- Peters B, Sidney J, Bourne P, Bui H-H, Buus S, Doh G, Fleri W, Kronenberg M, Kubo R, Lund O, Nemazee D, Ponomarenko J V, Sathiamurthy M, Schoenberger S, Stewart S, Surko P, Way S, Wilson S, Sette A 2005. The Immune Epitope Database and Analysis Resource: From Vision to Blueprint. *PLoS Biol.* 3: e91.
- Pfaff a W, Abou-Bacar a, Letscher-Bru V, Villard O, Senegas a, Mousli M, Candolfi E 2007. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: the dual role of IFN-gamma. *Parasitology* 134: 1895–1902.

- Pifer R, Yarovinsky F 2011. Innate responses to *Toxoplasma gondii* in mice and humans. *Trends Parasitol.* 27: 388–393.
- Pizza M, Scarlato V, Masignani V, Giuliani MM, Aricò B, Comanducci M, Jennings GT, Baldi L, Bartolini E, Capecchi B, Galeotti CL, Luzzi E, Manetti R, Marchetti E, Mora M, Nuti S, Ratti G, Santini L, Savino S, Scarselli M, Storni E, Zuo P, Broeker M, Hundt E, Knapp B, Blair E, Mason T, Tettelin H, Hood DW, Jeffries AC, Saunders NJ, Granoff DM, Venter JC, Moxon ER, Grandi G, Rappuoli R 2000. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* (80-.). 287: 1816–1820.
- Plotkin SA 2009. Vaccines: the fourth century. *Clin. Vaccine Immunol.* 16: 1709–1719.
- Pomés A 2010. Relevant B cell epitopes in allergic disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 152: 1–11.
- Ponomarenko J, Bui H-H, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, Peters B 2008. ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 9: 514.
- Prefeitura de Cuiabá M 2011. Surto de Toxoplasmose em Cuiabá. 29 setembro.
- Prefeitura de São Marcos/ RS 2015. TOXOPLASMOSE: Ministério da Saúde divulga nova nota técnica sobre surto de toxoplasmose em São Marcos. 15 abril.
- Rahimi MT, Sarvi S, Sharif M, Abediankenari S, Ahmadpour E, Valadan R, Ramandie MFR, Hosseini SA, Daryani A 2017. Immunological evaluation of a DNA cocktail vaccine with co-delivery of calcium phosphate nanoparticles (CaPNs) against the *Toxoplasma gondii* RH strain in BALB/c mice. *Parasitol. Res.* 116: 609–616.
- Ramaprasad A, Mourier T, Naeem R, Malas TB, Moussa E, Panigrahi A, Vermont SJ, Otto TD, Wastling J, Pain A 2015. Comprehensive evaluation of *Toxoplasma gondii* VEG and *Neospora caninum* LIV genomes with tachyzoite stage transcriptome and proteome defines novel transcript features. *PLoS One* 10: 1–16.
- Rappuoli R 2001. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine* 19: 2688–2691.
- Rappuoli R, Bottomley MJ, D’Oro U, Finco O, Gregorio E De 2016. Reverse vaccinology 2.0: Human immunology instructs vaccine antigen design. *J. Exp. Med.* 213: 469–481.
- Robert-Gangneux F, Darde M-L 2012. Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264–296.
- Robert-Gangneux F, Dardé M-L 2012. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 25: 264–296.
- Roberts F, McLeod R 1999. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. *Parasitol. Today* 15: 51–57.
- Rodríguez-Morales O, Monteón-Padilla V, Carrillo-Sánchez SC, Rios-Castro M, Martínez-Cruz M, Carabarin-Lima A, Arce-Fonseca M 2015. Experimental Vaccines against Chagas Disease: A Journey through History. *J. Immunol. Res.* 2015: 489758.

- Rorman E, Zamir CS, Rilkis I, Ben-David H 2006. Congenital toxoplasmosis-prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. *Reprod. Toxicol.* 21: 458–472.
- Rugarabamu G, Marq JB, Guérin A, Lebrun M, Soldati-Favre D 2015. Distinct contribution of *Toxoplasma gondii* rhomboid proteases 4 and 5 to micronemal protein protease 1 activity during invasion. *Mol. Microbiol.* 97: 244–262.
- Saade F, Petrovsky N 2012. Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 11: 189–209.
- Sabin AB 1941. Toxoplasmic Eencephalitis in children. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 116: 801.
- Sánchez MD, Pierson TC, McAllister D, Hanna SL, Puffer BA, Valentine LE, Murtadha MM, Hoxie JA, Doms RW 2005. Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus. *Virology* 336: 70–82.
- Sartori AL, Minamisava R, Avelino MM, Martins CA 2011. Triagem pré-natal para toxoplasmose e fatores associados à soropositividade de gestantes em Goiânia, Goiás. *Rev. Bras. Ginecol. e Obs.* 33: 93–98.
- Schettters T 2005. Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol.* 21: 179–184.
- Secretaria de Saúde do Estado do Paraná - RS 2015. Surto de toxoplasmose no Iapar está controlado, avalia Secretaria Estadual da Saúde. 20 novembro.
- Seib KL, Zhao X, Rappuoli R 2012. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 Suppl 5: 109–116.
- Sette A, Fleri W, Peters B, Sathiamurthy M, Bui H-H, Wilson S 2005. A Roadmap for the Immunomics of Category A–C Pathogens. *Immunity* 22: 155–161.
- Shen B, Yuan Y, Cheng J, Pan M, Xia N, Zhang W, Wang Y, Zhou Y, Zhao J 2016. Activation of chronic toxoplasmosis by transportation stress in a mouse model. *Oncotarget* 7: 87351–87360.
- Shwab EK, Zhu X-Q, Majumdar D, Pena HFJ, Gennari SM, Dubey JP, Su C 2014. Geographical patterns of *Toxoplasma gondii* genetic diversity revealed by multilocus PCR-RFLP genotyping. *Parasitology* 141: 453–461.
- Singh H, Raghava GPS 2003. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. *Bioinformatics* 19: 1009–1014.
- Sissoko MS, Healy SA, Katile A, Omaswa F, Zaidi I, Gabriel EE, Kamate B, Samake Y, Guindo MA, Dolo A, Niangaly A, Niaré K, Zeguime A, Sissoko K, Diallo H, Thera I, Ding K, Fay MP, O’Connell EM, Nutman TB, Wong-Madden S, Murshedkar T, Ruben AJ, Li M, Abebe Y, Manoj A, Gunasekera A, Chakravarty S, Sim BKL, Billingsley PF, James ER, Walther M, Richie TL, Hoffman SL, Doumbo O, Duffy PE 2017. Safety and efficacy of PfSPZ Vaccine against *Plasmodium falciparum* via direct venous inoculation in healthy malaria-exposed adults in Mali: a randomised, double-blind phase 1 trial. *Lancet Infect. Dis.* 17: 498–509.
- Smith RC, Colón-López DD, Bosch J 2014. Immunization against a merozoite sheddase promotes multiple invasion of red blood cells and attenuates *Plasmodium* infection in

- mice. *Malar. J.* 13: 313.
- Sonaimuthu P, Ching XT, Fong MY, Kalyanasundaram R, Lau YL 2016. Induction of Protective Immunity against Toxoplasmosis in BALB/c Mice Vaccinated with *Toxoplasma gondii* Rhoptry-1. *Front. Microbiol.* 7: 808.
- Sonaimuthu P, Fong M, Kalyanasundaram R, Mahmud R, Lau Y 2014. Sero-diagnostic evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant Rhoptry antigen 8 expressed in *E. coli*. *Parasit. Vectors* 7: 297.
- Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J. Biomed. Inform.* 53: 405–414.
- Sousa S De, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, Costa JMC Da, Dardé ML, Thulliez P, Dubey JP 2006. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet. Parasitol.* 135: 133–136.
- Speer C a, Dubey JP 1998. Ultrastructure of early stages of infections in mice fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *Parasitology* 116 (Pt 1: 35–42.
- Splendore A 1908. Un nuovo protozoa parassita deconigli incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell'uoma. *Rev Soc Sci Sao Paulo* 3: 109–112.
- Sreekumar C, Graham DH, Dahl E, Lehmann T, Raman M, Bhalerao DP, Vianna MCB, Dubey JP 2003. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from India. *Vet. Parasitol.* 118: 187–194.
- Stepanova E V, Kondrashin A V, Sergiev VP, Morozova LF, Turbabina NA, Maksimova MS, Brazhnikov AI, Shevchenko SB, Morozov EN 2017. Significance of chronic toxoplasmosis in epidemiology of road traffic accidents in Russian Federation (A Calderaro, Ed.). *PLoS One* 12.
- Sweredoski MJ, Baldi P 2008. PEPITO: Improved discontinuous B-cell epitope prediction using multiple distance thresholds and half sphere exposure. *Bioinformatics* 24: 1459–1460.
- Takemae H, Sugi T, Kobayashi K, Gong H, Ishiwa A, Recuenco FC, Murakoshi F, Iwanaga T, Inomata A, Horimoto T, Akashi H, Kato K 2013. Characterization of the interaction between *Toxoplasma gondii* rhoptry neck protein 4 and host cellular β -tubulin. *Sci. Rep.* 3: 1–9.
- Tebeje BM, Harvie M, You H, Loukas A, McManus DP 2016. Schistosomiasis vaccines: where do we stand? *Parasit. Vectors* 9: 528.
- Tenzer S, Peters B, Bulik S, Schoor O, Lemmel C, Schatz MM, Kloetzel PM, Rammensee HG, Schild H, Holzhütter HG 2005a. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1025–1037.
- Tenzer S, Peters B, Bulik S, Schoor O, Lemmel C, Schatz MM, Kloetzel P-M, Rammensee

- H-G, Schild H, Holzhütter H-G 2005b. Modeling the MHC class I pathway by combining predictions of proteasomal cleavage, TAP transport and MHC class I binding. *C. Cell. Mol. Life Sci.* 62: 1025–1037.
- Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari F V 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 77: 68–76.
- Tomar N, De RK 2014. Immunoinformatics: A Brief Review. In: *Methods Mol. Biol.*, pp. 23–55.
- Torgerson PR, Mastroiacovo P 2013. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* 91: 501–508.
- Torrey EF, Yolken RH 2016. Schizophrenia and Infections: The Eyes Have It. *Schizophr. Bull.*
- Trevisani N, Barros LD, Vieira-Neto A, Sartor AA, Souza AP, Garcia JL, Moura AB 2017. Genotyping of *Toxoplasma gondii* isolates from naturally infected Gallus domesticus in Santa Catarina state, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 69: 139–145.
- Vaccination Against Protozoa 2008. In: *Encycl. Parasitol.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1545–1545.
- Vasconcelos-Santos DV, Machado Azevedo DO, Campos WR, Oréface F, Queiroz-Andrade GM, Carellos ÉVM, Castro Romanelli RM, Januário JN, Resende LM, Martins-Filho OA 2009. Congenital Toxoplasmosis in Southeastern Brazil: Results of Early Ophthalmologic Examination of a Large Cohort of Neonates. *Ophthalmology* 116: 2199–2205.e1.
- Vaudaux JD, Muccioli C, James ER, Silveira C, Magargal SL, Jung C, Dubey JP, Jones JL, Doymaz MZ, Bruckner DA, Belfort, Jr R, Holland GN, Grigg ME 2010. Identification of an Atypical Strain of *Toxoplasma gondii* as the Cause of a Waterborne Outbreak of Toxoplasmosis in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *J. Infect. Dis.* 202: 1226–1233.
- Vaughan K, Peters B, Larche M, Pomes A, Broide D, Sette A 2013. Strategies to query and display allergy-derived epitope data from the immune epitope database. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 160: 334–345.
- Vizcaino JA, Cote RG, Csordas A, Dienes JA, Fabregat A, Foster JM, Griss J, Alpi E, Birim M, Contell J, O’Kelly G, Schoenegger A, Ovelheiro D, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Rios D, Wang R, Hermjakob H 2013. The Proteomics Identifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013. *Nucleic Acids Res.* 41: D1063–D1069.
- Vyas JM, Veen AG Van der, Ploegh HL 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 607–618.
- Wallon M, Liou C, Garner P, Peyron F 1999. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. *BMJ* 318: 1511–1514.
- Wang JL, Li TT, Elsheikha HM, Chen K, Zhu WN, Yue DM, Zhu XQ, Huang SY 2017. Functional characterization of rhoptry kinome in the virulent *Toxoplasma gondii* RH

- strain. *Front. Microbiol.* 8: 84.
- Wang L, Lu G, Zhou A, Han Y, Guo J, Zhou H, Cong H, He S 2016. Evaluation of immune responses induced by rhoptry protein 5 and rhoptry protein 7 DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 38: 209–217.
- Wilking H, Thamm M, Stark K, Aebischer T, Seeber F 2016. Prevalence, incidence estimations and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. *Sci. Rep.* 6: 22551.
- Witcombe DM, Ferguson DJ., Belli SI, Wallach MG, Smith NC 2004. Eimeria maxima TRAP family protein EmTFP250: subcellular localisation and induction of immune responses by immunisation with a recombinant C-terminal derivative. *Int. J. Parasitol.* 34: 861–872.
- Y. Zhou 2012. Sequence variation in TgROP7 gene among *Toxoplasma gondii* isolates from different hosts and geographical regions. *African J. Biotechnol.* 11: 6658–6661.
- Yarovinsky F 2014. Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 109–121.
- Yilmaz SM, Hopkins SH 1972. Effects of different conditions on duration of infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. *J. Parasitol.* 58: 938–939.
- Yuan Z-G, Ren D, Zhou D-H, Zhang X-X, Petersen E, Li X-Z, Zhou Y, Yang G-L, Zhu X-Q 2013. Evaluation of protective effect of pVAX-TgMIC13 plasmid against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in a murine model. *Vaccine* 31: 3135–3139.
- Zepp F 2010. Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine* 28: 14–24.
- Zhang N-Z, Chen J, Wang M, Petersen E, Zhu X-Q 2013. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: new developments and perspectives. *Expert Rev. Vaccines* 12: 1287–1299.
- Zhang L, Chen Y, Wong H-S, Zhou S, Mamitsuka H, Zhu S 2012a. TEPITOPEpan: extending TEPITOPE for peptide binding prediction covering over 700 HLA-DR molecules. *PLoS One* 7: e30483.
- Zhang L, Chen Y, Wong H-S, Zhou S, Mamitsuka H, Zhu S 2012b. TEPITOPEpan: extending TEPITOPE for peptide binding prediction covering over 700 HLA-DR molecules. *PLoS One* 7: e30483.
- Zhang Q, Wang P, Kim Y, Haste-Andersen P, Beaver J, Bourne PE, Bui H-H, Buus S, Frankild S, Greenbaum J, Lund O, Lundegaard C, Nielsen M, Ponomarenko J, Sette A, Zhu Z, Peters B 2008. Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR). *Nucleic Acids Res.* 36: W513–W518.
- Zhang N-Z, Wang M, Xu Y, Petersen E, Zhu X-Q 2015a. Recent advances in developing vaccines against *Toxoplasma gondii*: an update. *Expert Rev. Vaccines* 14: 1609–1621.
- Zhang NZ, Xu Y, Wang M, Petersen E, Chen J, Huang SY, Zhu XQ 2015b. Protective efficacy of two novel DNA vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhomboid 4 and rhomboid 5 proteins against acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Expert Rev Vaccines* 14: 1289–1297.

- Zhang P, Yu M-YW, Venable R, Alter HJ, Shih JW-K 2006. Neutralization epitope responsible for the hepatitis B virus subtype-specific protection in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 9214–9219.
- Zhao G, Zhou A, Lv G, Meng M, Sun M, Bai Y, Han Y, Wang L, Zhou H, Cong H, Zhao Q, Zhu X-Q, He S 2013. *Toxoplasma gondii* cathepsin proteases are undeveloped prominent vaccine antigens against toxoplasmosis. *BMC Infect. Dis.* 13: 207.
- Zin AA, Carvalho KM de 2016. *Prevenção da Cegueira e Deficiência Visual na Infância*. 60º Congresso Brasileiro de Oftalmologia.
- Zuckerman AJ 1985. Subunit, recombinant and synthetic hepatitis B vaccines. *Microbiol Sci* 2: 129-130-138.
- Zuckerman JN, Zuckerman AJ 2000. Current topics in hepatitis B. *J. Infect.* 41: 130–136.