



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOÃO PEDRO SASSE

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E
PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM
CAMUNDONGOS VACINADOS COM rROP18 E VACINA
pcDNAROP18 E pcDNASAG1**

Londrina
2023

JOÃO PEDRO SASSE

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E
PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM
CAMUNDONGOS VACINADOS COM rROP18 E VACINA
pcDNAROP18 E pcDNASAG1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia.

Londrina
2023

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

Sasse, João Pedro.

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM rROP18 E VACINA pcDNAROP18 E pcDNASAG1 / João Pedro Sasse. - Londrina, 2023. 67 f.

Orientador: João Luis Garcia.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.

Inclui bibliografia.

1. *Toxoplasma gondii*. - Tese. 2. Vacina. Proteínas. - Tese. 3. Vacina de DNA. - Tese. 4. Cepas *T. gondii*. - Tese. I. Garcia, João Luis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 576.8::619

JOÃO PEDRO SASSE

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E
PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM
CAMUNDONGOS VACINADOS COM rROP18 E VACINA
pcDNAROP18 E pcDNASAG1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Daniel de Barros
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fernando de Souza Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Sérgio Tosi Cardim
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof^a. Dr^a. Michelle Igarash Watanabe
Universidade Federal do Mato Grosso -UFMT

Londrina, 10 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus me guiar e me fortalecer e conseguir alcançar todas essas conquistas até o momento.

Ao Prof. Dr. João Luis Garcia, meu orientador e amigo de todas as horas, que sempre me ajudou em todo meu trajeto desde a graduação até o doutorado. Sempre que precisei ele esteve pronto para ajudar e sanar as dúvidas quanto ao que fazer nos projetos.

Ao Prof. Dr. Luiz Daniel por ajudar nos projetos e nas dúvidas junto ao Prof. João.

Agradeço a minha esposa Bruna e aos meus pais Pedro e Fatima pelo incentivo em toda minha carreira desde a graduação, especialização, mestrado e doutorado.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública da UEL que conheci em todo esse tempo e pelas conversas e ajuda no decorrer do projeto.

Agradeço aos técnicos do Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Parasitologia e do Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública da UEL pelas conversas e ensinamentos e pela ajuda no decorrer do projeto com os protocolos e tudo mais.

Agradeço ao programa Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina e a CAPES pela concessão da bolsa para a realização desta tese de doutorado.

RESUMO

SASSE, João Pedro **Avaliação da resposta imune e proteção contra *Toxoplasma gondii* em camundongos vacinados com rROP18 e vacina pcDNAROP18 e pcDNASAG1.** 2023. 67 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular que pode infectar diversos animais e os felídeos são seus hospedeiros definitivos. Para o controle desta doença, vacinas estão sendo estudadas para que se possa fazer a prevenção da infecção nos animais e humanos. Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune dos camundongos em relação as proteínas ROP18 e SAG1 do *T. gondii* e a proteção contra taquizoítos e cistos teciduais no desafio dos camundongos imunizados. Realizou-se a clonagem e a expressão da proteína recombinante ROP18 e a clonagem da proteína ROP18 e SAG1 para a vacina de DNA, ambas as vacinas foram testadas em camundongos. Em relação a produção de anticorpos, no teste ELISA, observou-se um aumento na Densidade Óptica (DO) entre a segunda e terceira dose da vacina nos camundongos vacinados com a proteína recombinante, verificando um aumento na produção de anticorpos. Quando desafiados com taquizoítos da cepa RH (1×10^4 /mL) pela via intraperitoneal, os camundongos apresentaram taxa de sobrevivência de 60% em cada grupo testado, não tendo significância estatística ($p=0.50$). Com isso a proteína rROP18 apresentou uma proteção parcial com relação a doença aguda. Nos camundongos vacinados com a vacina de DNA com as proteínas ROP18 e SAG1, estes apresentaram aumento na DO no teste ELISA, demonstrando que houve produção de anticorpos para proteína ROP18. Estes camundongos foram então desafiados com a cepa ME 49, sendo administrados 25 cistos pela via oral, e observados para quanto a evolução da doença. Os grupos apresentaram taxa de sobrevivência até os 140 dias variando entre 44% e 88%, sendo o grupo vacinado com a ROP18 juntamente com a SAG1 foi o que apresentou menor taxa de sobrevivência. Entretanto os grupos não apresentaram significância estatística quanto a taxa de sobrevivência ($p>0.05$). Em relação a produção de cistos cerebrais nos camundongos vacinados, os grupos que foram imunizados somente com a proteína apresentaram diminuição na contagem dos cistos em relação ao grupo controle do vetor. Já o grupo vacinado com uma mistura das duas proteínas apresentou uma taxa de sobrevivência baixa (44%), porém houve baixa contagem de cistos nos respectivos animais. Podemos concluir que nossas vacinas apresentaram proteção parcial contra as diferentes cepas do *T. gondii* utilizadas nos desafios devido a suas taxas de sobrevivência observadas nos grupos vacinados e controles. Em nosso estudo pode-se observar que a proteína ROP e proteína SAG apresentam resposta imunogênica nos camundongos, porém a sua proteção ainda precisa de mais estudos para desenvolvermos uma vacina com melhor proteção contra as diferentes cepas do *T. gondii*. Estudos futuros devem ser realizados para melhor compreensão da resposta imunológica perante algumas proteínas candidatas a vacina para assim conseguirmos compreender melhor o mecanismo de resposta imune dos animais infectados.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*; Vacina; Proteínas; Vacina de DNA; Cepas *T. gondii*.

ABSTRACT

SASSE, João Pedro. **Avaliação de resposta imune e proteção contra *Toxoplasma gondii* em camundongos vacinados com rROP18 e vacina de DNA pcDNAROP18 e pcDNASAG1.** 2023. 67 p. Tese (Doutorado em Ciências da Zootecnia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan that can infect several animals and felines are its definitive hosts. To control this disease, vaccines are being studied in order to prevent infection in animals and humans. This study aimed to evaluate the immune response of mice to ROP18 and SAG1 proteins from *T. gondii* and the protection against tachyzoites and tissue cysts in the challenge of immunized mice. The cloning and expression of the recombinant ROP18 protein and the cloning of the ROP18 and SAG1 protein for the DNA vaccine were performed, both vaccines were tested in mice. Regarding the production of methamphetamine, in the ELISA test, an increase in Optical Density (OD) was observed between the second and third dose of the vaccine in mice vaccinated with the recombinant protein, verifying an increase in serum production. When challenged with RH strain tachyzoites (1×10^4 /mL) intraperitoneally, the mice had a survival rate of 60% in each group tested, with no statistical significance ($p=0.50$). Thus, the rROP18 protein showed partial protection against acute disease. In mice vaccinated with DNA vaccine with ROP18 and SAG1 proteins, these showed an increase in OD in the ELISA test, demonstrating that there was protein production for ROP18. These mice were then challenged with the ME 49 strain, 25 cysts were administered orally, and observed for disease progression. The groups had a survival rate up to 140 days ranging from 44% to 88%, with the group vaccinated with ROP18 together with SAG1 having the lowest survival rate. However, the groups did not show statistical significance regarding the survival rate ($p>0.05$). Regarding the production of brain cysts in vaccinated mice, the groups that were immunized only with the protein showed a decrease in the number of cysts in relation to the vector control group. The group vaccinated with a mixture of the two proteins had a low survival rate (44%), but there was a low cyst count in the respective animals. We can conclude that our vaccines showed partial protection against the different *T. gondii* strains used in the challenges due to their observed survival rates in the vaccinated and control groups. In our study, it can be observed that the ROP protein and SAG protein present an immunogenic response in mice, but their protection still needs further studies in order to develop a vaccine with better protection against different strains of *T. gondii*. Future studies should be carried out to better understand the immune response to some vaccine candidate proteins so that we can better understand the immune response mechanism of infected animals.

Key-words: *Toxoplasma gondii*; Vaccine; Recombinant Protein; DNA Vaccine; *T. gondii* strain.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
4	ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E PROTEÇÃO CONTRA <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE ROP18	25
	Referências bibliográficas.....	34
	Figuras e tabelas	39
5	ARTIGO 2 – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E PROTEÇÃO CONTRA O <i>Toxoplasma gondii</i> EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM VACINA pcDNAROP18 e pcDNASAG1	41
	Referências bibliográficas.....	50
	Figuras e tabelas	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	61
	ANEXOS.....	62
	ANEXO A – Protocolos e Soluções	63

1 INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório e pode infectar animais de sangue quente, sendo os felídeos os hospedeiros definitivos (Dubey, 2008). Os humanos se infectam através da ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados, ou mesmo pela ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos teciduais do protozoário (DUBEY, 2008; GARCIA, 2009).

Para que ocorra o controle da toxoplasmose algumas medidas podem ser praticadas, como a higienização dos alimentos e a destinação correta das fezes dos felídeos. Além das medidas de prevenção, estudos sobre o uso de vacinas contra o protozoário tem evoluído e estas tem como intuito diminuir a contaminação ambiental pelas fezes dos felídeos e realizar a prevenção da doença nos animais e humanos (MÉVÉLEC; LAKHRIF; DIMIER-POISSON, 2020; ZULPO et al., 2017).

A imunidade contra o *T. gondii* é mediada principalmente pela imunidade celular, no entanto, a imunidade humoral é importante na resistência da célula do hospedeiro, tendo os epítomos envolvidos na fixação e invasão as células hospedeiras importantes candidatos a vacina (HAJISSA et al., 2019). Algumas proteínas candidatas a vacina são encontradas nos três estágios do parasita, entre elas estão a ROP2 (VERCAMMEN et al., 2000), GRA5 (TILLEY et al., 1997) e GRA7 (FERGUSON et al., 1999).

Dentre as tecnologias utilizadas para produção de uma vacina temos a utilização de proteínas recombinantes, vacinas de DNA, cepas atenuadas e subunidades estruturais (FARIDNIA et al., 2018; PAGHEH et al., 2020; WU et al., 2021). Entretanto as proteínas de superfícies do *T. gondii* se apresentam como melhores candidatas a vacina contra o protozoário.

O uso de adjuvantes tem sido muito estudado, com a finalidade de encontrar um com menor reação de interferência com relação a proteína estudada. Alguns trabalhos têm utilizado PBS enquanto outros testaram adjuvante completo e incompleto de Freund's (DODANGEH et al., 2021), Alumínio (KHOSROSHAHI et al., 2012), entre outros.

Para a realização dos testes com as proteínas candidatas à vacina o modelo animal mais utilizado são os camundongos, devido a estes terem um custo menor, fácil manutenção em biotérios, facilidade em se manter a mesma linhagem e a produção de animais livres de patógenos (FIEGE et al., 2021; JAMESON;

MASOPUST, 2018).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 INTRODUÇÃO

No ano de 1908 Nicolle e Manceaux realizavam pesquisa com leishmaniose, quando encontraram um protozoário nos tecidos de um roedor da espécie *Ctenodactylus gundi*. Inicialmente acreditava-se ser uma *Leishmania*, porém logo notaram que seria um novo protozoário. Então Nicolle e Manceaux no ano de 1909 nomearam o novo parasita como *Toxoplasma gondii*, sendo este nome baseado na morfologia e no hospedeiro em que foi encontrado (*toxoplasma* = arco, *plasma* = vida e seu hospedeiro) (DUBEY, 2008).

É um protozoário intracelular obrigatório e pode infectar animais de sangue quente e humanos, os felídeos são os hospedeiros definitivos deste parasita. *T. gondii* em seu ciclo apresenta três formas: oocistos, taquizoítos e bradizoítos (presentes nos cistos teciduais).

Os oocistos são eliminados nas fezes dos felídeos, e em condições ideais de temperatura e umidade, ocorre a esporulação tornando-os infectantes, os taquizoítos realizam a invasão celular e sua multiplicação, causando a doença aguda no indivíduo infectado, e após resposta imune do hospedeiro são formados os cistos teciduais, onde encontra-se os bradizoítos, sendo considerada a fase crônica da doença (Dubey, 2008).

As formas de infecção ocorrem através da via fecal-oral, principalmente, pela ingestão de oocistos presentes na água e nos alimentos, por ingestão de cistos teciduais presentes nas carnes, quando ingeridas cruas ou mal-cozidas, e na forma congênita, onde os taquizoítos invadem a barreira transplacentária causando aborto ou alterações nos fetos (GARCIA, 2009; MÉVÉLEC; LAKHRIF; DIMIER-POISSON, 2020).

Toxoplasma. gondii normalmente causa infecção subclínica, porém, a infecção primária em humanos, durante a gestação, pode causar doenças e má formações fetais através da transmissão congênita (DE SOUZA-E-SILVA et al., 2013) como hidrocefalia, coriorretinites, surdez e retardo mental (JONES et al., 2006).

Com estas informações denota-se a necessidade de ferramentas para diminuir a ocorrência da toxoplasmose em humanos e animais de consumo, bem

como, medidas que visem diminuir a eliminação de oocistos pelos felídeos.

2.2 RESPOSTA IMUNE

A principal forma de infecção pelo *T. gondii* nos animais e humanos é a via oral através da ingestão de oocistos ou cistos teciduais (HAMILTON et al., 2019; MÉVÉLEC; LAKHRIF; DIMIER-POISSON, 2020; MONTAZERI et al., 2020). Portanto a imunidade local via linfócitos (principalmente linfócitos intraepiteliais que apresentam atividade CD8) e Imunoglobulinas Tipo A (IgA) são de fundamental importância na proteção inicial contra o parasita (VELGE-ROUSSEL et al., 2000).

Após a ingestão de cistos ou oocistos do *T. gondii*, inicia-se a invasão das células intestinais por esporozoítos e a formação do vacúolo parasitóforo ativando a migração de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células dendríticas) (GARCIA, 2009; MÉVÉLEC; LAKHRIF; DIMIER-POISSON, 2020).

A invasão celular por taquizoítos ocorre através de um mecanismo cálcio dependente na membrana da célula e é extremamente rápida (15 - 40 segundos), sendo seguida de secreção de proteínas (GARCIA; INNES; KATZER, 2014). A primeira linha de defesa do organismo é a mucosa intestinal, sendo responsável pela migração das células inflamatórias e a produção de citocinas e quimiocinas.

O sistema imune não consegue eliminar completamente os taquizoítos, porém com a ativação dos neutrófilos e a migração das células dendríticas ocorre o estímulo da resposta imune inata e adaptativa.

Nas demais células do corpo os taquizoítos se transformam em bradizoítos mantendo a doença na forma crônica (cistos teciduais) no hospedeiro infectado; porém, em caso de imunodepressão, estes bradizoítos se transformam em taquizoítos e invadem as células novamente reagudizando a infecção (DODANGEH et al., 2019; GARCIA, 2009; KHODADADI et al., 2021; MÉVÉLEC; LAKHRIF; DIMIER-POISSON, 2020; REZAEI et al., 2019; WU et al., 2021).

A imunidade de mucosa tem sido utilizada para avaliar a resposta imune contra o protozoário (BONENFANT et al., 2001; GARCIA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; CUNHA et al., 2012; ZULPO et al., 2012; ZULPO et al., 2017; CHU et al., 2018; KANG et al., 2019) sendo esta resposta imune responsável pela produção de IgA, encontrada principalmente na região nasal e no intestino, esta imunoglobulina é responsável por proteger os tecidos linfóides (BRANDTZAEG, 2009).

Portanto a resposta de mucosa referente ao *T. gondii* tem sido desafiadora pela dificuldade em escolher a melhor proteína a ser utilizada para que se possa ocorrer a ativação desta resposta imune de mucosa no intestino, sendo este o local de invasão celular e parte do ciclo de vida do protozoário nos felinos e de invasão celular nos demais animais homeotérmicos.

2.3 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Cerca de 1360 proteínas foram descritas no *T. gondii* e das quais os antígenos de superfície, conhecidos como SAG's, tem grande importância antigênica no momento da invasão celular no hospedeiro (WASMUTH et al., 2009).

Estudos para o desenvolvimento de vacinas contra a toxoplasmose foram realizados utilizando subunidades estruturais, proteínas totais e recombinantes, DNA, parasitas heterólogos, e cepas atenuadas (LU et al., 2018; PICCHIO et al., 2018; REZAEI et al., 2019; ZHOU et al., 2019).

As proteínas mais utilizadas como candidatas à vacinas recombinantes e de DNA tem sido a SAG1 e ROP2 (KHOSROSHAHI et al., 2012), rROP2/rGRA4/rSAG1/rROP4 (DZIADEK; BRZOSTEK, 2012), rROP2 (ZULPO et al., 2017), GRA2 e GRA5 (CHING; FONG; LAU, 2017), GRA8 (CHU et al., 2018), SAG1, GRA2 e GRA7 (HAJISSA et al., 2018), ROP16 e GRA7 (LIU et al., 2014), BAG1, SRS4 e SRS9 (SUN et al., 2014), ROP2, ROP4, SAG1 e MAG1 (GATKOWSKA et al., 2018), ROP4 e ROP13 (KANG et al., 2019), ROP14, ROP18 e as proteínas Romboides (FOROUTAN et al., 2019a; RAHIMI et al., 2017a), embora algumas outras proteínas tem se mostrado como bons candidatos a vacina, como por exemplo a HSP70 (CZARNEWSKI et al., 2017) e HSP90 (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2019).

Algumas proteínas são encontradas nos três estágios do parasita, entre elas estão as rhoptrias (ROP's) (VERCAMMEN et al., 2000), grânulo denso (GRA's) (TILLEY et al., 1997; FERGUSON et al., 1999) sendo estas associadas à virulência do parasita.

A imunidade para *T. gondii* é mediada principalmente pela imunidade celular, sendo a melhor resposta de imunização obtido de vacinas vivas de agentes com replicação intracelular (SUPPLY et al., 1999). No entanto, a imunidade humoral é importante na resistência da célula do hospedeiro, sendo os epítomos envolvidos na

fixação e invasão da célula os candidatos à vacina (HAJISSA et al., 2019; KASPER; MINEO, 1994).

A partir desse e outros estudos, desenvolveu-se uma vacina comercial (Toxovax) para ser utilizada em ovinos e caprinos, com o objetivo de evitar a toxoplasmose congênita, sendo atualmente a única vacina comercial existente contra a toxoplasmose em ovinos, comercializada somente na Europa e Oceania. No entanto

contém taquizoítos vivos da cepa S48 na respectiva vacina, não evitando que possa ocorrer a toxoplasmose nos ovinos (WILKINS, M. F.; O'CONNEL, E.; TE PUNGA, 1988).

As vacinas de DNA são consideradas a terceira geração das vacinas, sendo estas baseadas na engenharia genética de vetores, demonstram-se mais seguras para os humanos e animais, quando associadas com adjuvantes genéticos e imunostimuladores tem-se potencializado a resposta imune dos indivíduos (GHAFFARIFAR, 2018).

Uma vacina de DNA com os genes de grânulos densos GRA1, GRA4, GRA6 e GRA7 clonados, foi testada em ovinos e demonstrou uma resposta imune contra o *T. gondii* (HISZCZYŃSKA-SAWICKA et al., 2011).

BONENFANT et al. (2001) imunizaram camundongos com duas toxinas mutantes e a proteína SAG1 do *T. gondii* (LTR72 + SAG1 e LTK63 + SAG1) através da via intranasal e observaram altos níveis de proteção devido as baixas contagens de cistos cerebrais após o desafio com a cepa 76K de *T. gondii*.

IGARASHI et al. (2008) demonstraram uma diminuição na formação de cistos teciduais em camundongos BALB/c vacinados pela via nasal com proteínas rROP2, rGRA5 e rGRA7 do *T. gondii* quando comparados ao grupo controle negativo.

KANG et al. (2019) utilizaram o vírus Influenza para produção de uma vacina, inserindo os genes das proteínas recombinantes rROP4 e rROP13, sendo realizadas 2 doses, pela via intranasal e os camundongos (BALB/c) desafiados com a cepa ME49 do *T. gondii*. Observaram que a imunização apresentou uma proteção eficiente contra o parasita, sendo a resposta mais eficaz no grupo imunizado com ambas as proteínas recombinantes.

CUNHA et al. (2012) imunizaram suínos através da via nasal, utilizando o adjuvante Quil-A (50µg) e a fração 3 (roptrias) dos taquizoítos e observaram que estas proteínas estimulam uma resposta imune humoral, local e sistêmica, além de

uma proteção parcial a formação de cistos cerebrais nos suínos.

Uma das ferramentas para o controle da toxoplasmose é o desenvolvimento de vacinas com enfoque no hospedeiro definitivo, ou seja, o gato doméstico, com o objetivo de diminuir a eliminação de oocistos pelas fezes (Garcia et al., 2007; Zulpo et al., 2012, 2017a) ou nos animais de consumo, com a finalidade de diminuir a formação de cistos teciduais (CUNHA et al., 2012, 2020; GARCIA et al., 2017).

Os primeiros estudos imunizando felinos foram realizados por FRENKEL et al. (1991) e FREYRE et al. (1993). Utilizando a cepa mutante de *T. gondii* T-263, FREYRE et al. (1993) observaram soroconversão em todos os gatos do estudo, quando desafiados com cistos teciduais da cepa *T. gondii* T-265, e nenhum animal eliminou oocistos nas fezes, tendo uma proteção total.

MISHIMA et al. (2002) desenvolveram uma vacina com a proteína ROP2 inserida no Herpes-vírus felino tipo 1 deficiente de Thymidina Kinase (FHV1TK), a proteína recombinante ROP2 foi utilizada para imunizar os gatos em 2 doses, após o desafio com bradizoítos da cepa Beverley do *T. gondii*, analisaram os cérebros dos animais através da PCR e não detectaram DNA do parasita, demonstrando que a vacina FHV/ROP2 foi eficiente para evitar a formação de cistos teciduais, entretanto este é um órgão grande e de difícil análise como um todo.

Os animais utilizados com maior frequência como modelo de estudo foram os camundongos (GATKOWSKA et al., 2018; IGARASHI et al., 2008; KANG et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2019), seguido dos gatos (MISHIMA et al., 2002; ZULPO et al., 2017) e alguns outros animais como modelo de estudo são os suínos (CUNHA et al., 2012, 2020) entre outros animais que podem ser possíveis hospedeiros intermediários.

Nos últimos anos observamos um avanço no desenvolvimento das vacinas contra o *T. gondii* e na escolha dos melhores candidatos a vacina proporcionando assim um melhor entendimento da resposta imune e qual via de imunização apresentará uma melhor resposta perante a infecção do *T. gondii* (GARCIA, 2009; KANG et al., 2021; VELGE-ROUSSEL et al., 2000; WU et al., 2021; ZULPO et al., 2017)

2.4 CONCLUSÃO

Nos últimos anos as pesquisas em relação ao desenvolvimento de novas

formulações antigênicas contra o *T. gondii* tem evoluído, porém, ainda carecem do interesse do mercado e produtores para a sua comercialização.

Contudo, a produção de vacina contra um protozoário é um grande desafio devido as milhares de proteínas presentes, via de infecção diversas, e resposta imune do animal infectado, as pesquisas têm evoluído ao longo dos anos, e as expectativas para o desenvolvimento de novas formulações vacinais.

Portanto o desenvolvimento de vacinas que utilizem proteínas recombinantes ou vacinas de DNA tem grande importância, não só pela segurança que elas proporcionam, mas pela garantia de ter o desenvolvimento da resposta imune de memória em futuras infecções pelo *T. gondii*. Desta forma, novos estudos, além da mudança de paradigmas, são necessários para avançarmos nessa área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONENFANT, C. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605–1612, 2001.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 6, p. 505–515, dez. 2009.

CHING, X. T.; FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Evaluation of the protective effect of deoxyribonucleic acid vaccines encoding granule antigen 2 and 5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1441–1447, jun. 2017.

CHU, J.-Q. et al. Evaluation of Protective Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding GRA8 against Acute Toxoplasmosis in a Murine Model. **The Korean journal of parasitology**, v. 56, n. 4, p. 325–334, 31 ago. 2018.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 216–221, 2012.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Protection against *Toxoplasma gondii* cysts in pigs immunized with rROP2 plus Iscomatrix. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. e012620, 2020.

CZARNEWSKI, P. et al. Recombinant TgHSP70 Immunization Protects against *Toxoplasma gondii* Brain Cyst Formation by Enhancing Inducible Nitric Oxide Expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 142, 2017.

DE SOUZA-E-SILVA, C. H. et al. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 1, p. 13–16, 2013.

DODANGEH, S. et al. A systematic review on efficiency of microneme proteins to induce protective immunity against *Toxoplasma gondii*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 617–629, abr. 2019.

DODANGEH, S. et al. Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, 1 abr. 2021.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DZIADEK, B.; BRZOSTEK, A. Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-

cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis: what's next? **Bioengineered**, v. 3, n. 6, p. 358–364, 2012.

FARIDNIA, R. et al. Vaccination against *Toxoplasma gondii* using rhoptry antigens: a systematic review. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 59, p. 32–40, ago. 2018.

FERGUSON, D. J. P. et al. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 259–265, 1999.

FIEGE, J. K. et al. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 12, p. 1815–1827.e6, dez. 2021.

FOROUTAN, M. et al. Rhomboid antigens are promising targets in the vaccine development against *Toxoplasma gondii*. **EXCLI journal**, v. 18, p. 259–272, 2019a.

FOROUTAN, M. et al. Rhoptry antigens as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 8, n. 1, p. 4–26, jan. 2019b.

FREYRE, A. et al. Immunization of Cats with Tissue Cysts, Bradyzoites, and Tachyzoites of the T-263 Strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 5, p. 716, 1993.

GARCIA, J. L. et al. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 197–206, 2007.

GARCIA, J. L. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 215–225, 9 fev. 2009.

GARCIA, J. L. et al. **The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis in experimentally infected pigs** *Research in Veterinary Science*, 2017.

GARCIA, J. L.; INNES, E. A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy**, p. 23, abr. 2014.

GATKOWSKA, J. et al. Assessment of the antigenic and neuroprotective activity of the subunit anti-*Toxoplasma* vaccine in *T. gondii* experimentally infected mice. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 82–94, abr. 2018.

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today**, v. 54, n. 5, p. 315, maio 2018.

GRZYBOWSKI, M. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 1–6, mar. 2015.

HAJISSA, K. et al. Immunogenicity of Multiepitope Vaccine Candidate against *Toxoplasma gondii* Infection in BALB/c Mice. **Iranian journal of parasitology**, v. 13,

n. 2, p. 215–224, 2018.

HAISSA, K. et al. Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, n. 2, p. 174, jun. 2019.

HAMILTON, C. M. et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 104, mar. 2019.

HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E. et al. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 281–289, 2011.

IGARASHI, M. et al. *Toxoplasma gondii*: Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 305–313, 2008.

IGARASHI, M. et al. *Toxoplasma gondii*: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 210–216, dez. 2010.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a029132, 2 abr. 2018.

JONES, J. L. et al. Recently acquired *Toxoplasma gondii* infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 582–587, 2006.

KANG, H.-J. et al. Influenza Virus-Like Particles Presenting both *Toxoplasma gondii* ROP4 and ROP13 Enhance Protection against *T. gondii* Infection. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 342, 16 jul. 2019.

KANG, H.-J. et al. Passive Immunity and Antibody Response Induced by *Toxoplasma gondii* VLP Immunization. **Vaccines**, v. 9, n. 5, abr. 2021.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184–188, 1994.

KHODADADI, M. et al. Immunogenicity of in-silico designed multi-epitope DNA vaccine encoding SAG1, SAG3 and SAG5 of *Toxoplasma gondii* adjuvanted with CpG-ODN against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 216, p. 105836, 1 abr. 2021.

KHOSROSHAHI, K. H. et al. Comparing the effect of IL-12 genetic adjuvant and alum non-genetic adjuvant on the efficiency of the cocktail DNA vaccine containing plasmids encoding SAG-1 and ROP-2 of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 403–411, 21 jul. 2012.

LIU, Q. et al. *Toxoplasma gondii*: Immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multicomponent DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 2860–2867, 2014.

LU, G. et al. DNA vaccine ROP29 from *Toxoplasma gondii* containing R848 enhances protective immunity in mice. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 10, p. e12578, out. 2018.

MACHADO, A. V. et al. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3247–3256, 2010.

MÉVÉLEC, M.-N.; LAKHRIF, Z.; DIMIER-POISSON, I. Key Limitations and New Insights Into the *Toxoplasma gondii* Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 607198, 2020.

MISHIMA, M. et al. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. **Parasitology Research**, v. 88, n. 2, p. 144–149, 6 fev. 2002.

MONTAZERI, M. et al. The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.

PAGHEH, A. S. et al. *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) as a potential candidate to develop vaccine against toxoplasmosis: A systematic review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 101414, abr. 2020.

PICCHIO, M. S. et al. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 62–70, fev. 2018.

RAHIMI, M. T. et al. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Plasmid Encoding Rhomboid 4 (ROM4) of Tachyzoite of *Toxoplasma gondii* RH Strain. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 498–505, 2017a.

RAHIMI, M. T. et al. 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. **Parasitology research**, v. 116, n. 2, p. 609–616, fev. 2017b.

REZAEI, F. et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 172–184, jan. 2019.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F. et al. Plant Hsp90 is a novel adjuvant that elicits a strong humoral and cellular immune response against B- and T-cell epitopes of a *Toxoplasma gondii* SAG1 peptide. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 140, 25 dez. 2019.

SUN, X. et al. The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 429, 4 dez. 2014.

SUPPLY, P. et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 17, n. 7–8, p. 705–714, 1999.

VELGE-ROUSSEL, F. et al. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969–972, 2000.

VERCAMMEN, M. et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38–45, 2000.

WANG, L.-J. et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. **Vaccine**, v. 36, n. 27, p. 3943–3948, jun. 2018.

WASMUTH, J. et al. The origins of apicomplexan sequence innovation. **Genome Research**, v. 19, n. 7, p. 1202–1213, jul. 2009.

WILKINS, M. F.; O'CONNEL, E.; TE PUNGA, W. A. Toxoplasmosis in sheep further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p. 86–89, 1988.

WU, L. et al. A Novel Combined DNA Vaccine Encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP18 Provokes Protective Immunity Against a Lethal Challenge in Mice. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 4, p. 1387–1395, 1 dez. 2021.

ZHOU, J. et al. Antigenic Epitope Analysis and Efficacy Evaluation of GRA41 DNA Vaccine Against *T. gondii* Infection. **Acta parasitologica**, v. 64, n. 3, p. 471–478, set. 2019.

ZULPO, D. L. et al. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223–230, jun. 2012.

ZULPO, D. L. et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 67–73, mar. 2017.

TILLEY, M.; FICHERA, M. E.; JEROME, M. E.; ROSS, D. S.; WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infection and Immunity*, Nov., p. 4598 – 4605, 1997.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral:

Avaliar a resposta imune e proteção contra *Toxoplasma gondii* em camundongos vacinados com proteína recombinante ROP18 e vacina pcDNAROP18 e pcDNASAG1

3.2 Objetivos Específicos:

- Clonar o gene ROP18 em vetores de expressão de proteína;
- Clonar os genes ROP18 e SAG1 para a vacina de DNA;
- Padronizar um ELISA indireto com rROP18;
- Avaliar a proteção contra a mortalidade e formação de cistos teciduais em camundongos.

4 ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM PROTEÍNA RECOMBINANTE ROP18

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário que causa infecção subclínica e pode causar diversas sequelas nos indivíduos que tiveram toxoplasmose. Com isso demonstra-se a necessidade de se desenvolver ferramentas para diminuir a ocorrência desta doença. Uma dessas ferramentas é o desenvolvimento de vacinas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a resposta imune humoral e a proteção contra taquizoítos no desafio dos camundongos imunizados com a vacina rROP18. A proteína foi clonada e posteriormente purificada, quantificada por kit comercial e preparada para o teste em camundongos. Foram realizadas três doses da vacina, sendo elas nos dias 0, 21 e 42 e posteriormente no dia 72 realizou-se o desafio destes animais com a cepa RH (1×10^4 /ml taquizoítos) e os camundongos foram observados quanto a evolução da doença. Realizou-se a coleta de sangue/soro em cada dose da vacina para realizar o teste ELISA. Após o desafio com a Cepa RH, foi realizada a observação diária destes animais e obtivemos uma taxa de sobrevivência de 60% dos camundongos vacinados, sendo que as mortes ocorreram nos primeiros oito dias ($p=0.5$). No teste de ELISA observou-se um aumento na resposta imune com relação a produção de anticorpos, que pode ser observado pelo aumento na Densidade Óptica (DO) do teste ELISA, entre a segunda e terceira dose. Com estes resultados podemos concluir que a proteína rROP18 demonstrou uma proteção parcial quanto ao desafio com taquizoítos, podendo esta ser considerada uma candidata a vacina.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, vacina, camundongos.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan that causes subclinical infection and can cause several sequelae in individuals who have had toxoplasmosis. This demonstrates the need to develop tools to reduce the occurrence of this disease. One such tool is vaccine development. The present study aimed to evaluate the humoral immune response and protection against tachyzoites in the challenge of mice immunized with the rROP18 vaccine. The protein was cloned and subsequently purified, quantified using a commercial kit and prepared for testing in mice. Three doses of the vaccine were given, on days 0, 21 and 42 and later on day 72, these animals were challenged with the RH strain (1×10^4 /ml tachyzoites) and the mice were observed for disease progression. Blood/serum collection was performed at each vaccine dose to perform the ELISA test. After the challenge with the RH strain, these animals were observed daily and we obtained a survival rate of 60% of the vaccinated mice, with deaths occurring in the first eight days ($p=0.5$). In the ELISA test, an increase in the immune response was observed in relation to the production of mortality, which can be observed by the increase in the Optical Density (OD) of the ELISA test, between the second and third dose. With these results, we can conclude that the rROP18 protein showed partial protection against the challenge with tachyzoites, which can be considered a candidate vaccine.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, vaccine, mice.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório que causa infecção subclínica, entretanto a primo-infecção durante a gestação pode causar doenças ou má formação fetal e abortamentos (DE SOUZA-E-SILVA et al., 2013).

Com isso há necessidade de instrumentos para diminuir a ocorrência desta doença sendo uma dessas ferramentas o desenvolvimento de vacinas, com o objetivo de diminuir a contaminação de oocistos no ambiente (ZULPO et al., 2012, 2017), ou na diminuição de cistos teciduais (CUNHA et al., 2012; GARCIA et al., 2017).

A imunidade para *T. gondii* é mediada principalmente pela imunidade celular, sendo a melhor resposta de imunização obtido de vacinas vivas de agentes com replicação intracelular (SUPPLY et al., 1999). No entanto, a imunidade humoral é importante na resistência da célula do hospedeiro, sendo os epítomos envolvidos na fixação e invasão da célula importantes candidatos a vacina (HAJISSA et al., 2019; KASPER; MINEO, 1994).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta imune humoral e avaliar a proteção contra taquizoítos da Cepa RH do *T. gondii* em camundongos imunizados com proteína rROP18.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS DE *Toxoplasma gondii* E CAMUNDONGOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com o número 6911.2015.87. Foi utilizada a cepa RH do *T. gondii*, para extração do DNA, PCR, incorporação em vetor plasmidial e desafio dos camundongos vacinados. Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem swiss (camundongos albinos), com cerca de 30 dias (pesando entre 25 e 40g). Estes animais foram utilizados para o repique da cepa RH pela via intraperitoneal, e para a obtenção de taquizoítos no experimento na forma de inóculo.

PREPARO DA SUSPENSÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *T. GONDII*

Para a obtenção dos taquizoítos puros da amostra da Cepa RH, cinco camundongos foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítos vivos (1×10^5 /ml) em solução fisiológica estéril, obtidos através de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. As amostras foram padronizadas em 1×10^7 /ml, por contagem em câmara de Neubauer, para proceder a extração de DNA do *T. gondii* e 1×10^3 para o desafio dos camundongos vacinados.

EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

A extração de DNA dos taquizoítos de *T. gondii* foi efetuada pelo Kit Qiagen QIAmp® DSP DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha) segundo as orientações do fabricante. O material então foi hidratado em Tris-EDTA (TE) e refrigerado durante a noite. O segmento de DNA, da proteína ROP18 foi obtido pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, desenhados especificamente para este estudo, do gene ROP18 FW (5'- CACC ATG GGG ACC GGA ATC ACA CTT CG -3') e ROP18 RW (5'- GAA TCC TAG CGC TTG AGG CTG CCT GAT-3'). Para a realização da PCR foi utilizado 25 mM MgCl₂, 200 μM dNTP (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 μM de cada primer, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4) 1.25U de Taq-DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, EUA), 50ng de DNA de *T. gondii* e H₂O ultrapura estéril em quantidade suficiente para o volume total de 25μl. A amplificação do DNA foi submetida no termociclador TC-512 (Techne, EUA) de acordo com o programa: 94°C/5 minutos, 30 ciclos de anelamento (94°C/30 segundos, 59°C/1 minuto, 72°C/30 segundos), 72°C/7 minutos para extensão final e mantido a 4°C até retirada do termociclador. Para a reação de amplificação do DNA em moldes de clonagem, foi utilizada a enzima Pfx polimerase Platinum® (Invitrogen) que amplifica os DNA moldes em extremidades abruptas, sendo importante na ligação com o vetor. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, USA), e visualizado em foto-documentador sobre luz UV (L – PIX EX

TRANSILLUMINATOR, Loccus Biotechnology, Brazil).

COMPETÊNCIA DE CÉLULAS *E. coli* TOP10®

Realizou-se o crescimento de *E. coli* TOP10® em caldo Luria Bertani (LB) durante 12 horas a 37°C sobre agitação. Após o crescimento foi diluído na proporção de 1:100 e deixado em crescimento até que a densidade óptica (DO) 550nm no espectrofotômetro fosse atingida. Após a DO alcançada os tubos foram centrifugados a 2000xg durante 5 minutos a temperatura de 4°C. Após a centrifugação o “sedimento” foi ressuscitado em caldo Tampão de Transformação com Mess (TT com Mess), na proporção de um terço do volume centrifugado. Foi incubado em gelo por 20 minutos e centrifugado a 2000xg durante 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, foi ressuscitado lentamente em 2,4mL de TT com MESS. Após ressuspensão foi mantido no gelo por quinze minutos e distribuído em microtubos (contendo 100µL em cada) e adicionado 15% de glicerol no volume final para armazenamento em freezer -80°C.

CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO – *E. coli* TOP10®

Os plasmídeos ptrcHIS Topo® TA Expression Kit (Invitrogen®, EUA) foram inseridos, de acordo com as recomendações do fabricante. Nas células *E. coli* TOP10® (Invitrogen®, EUA) quimicamente competente foi realizado a reação de transformação. Após a ligação do produto da PCR, cerca de 100µL foi semeado em uma placa de petri com meio LB com ágar e ampicilina (50µg/mL) e incubado a 37°C por 12 horas. Observou-se no dia seguinte se houve o crescimento de colônias. Das colônias crescidas, se procedeu a confirmação da presença do inserto em fase de quadro de leitura para transcrição no vetor, através do sequenciamento pelo método de Sanger. Após a verificação do quadro de leitura e inserto dos genes, realizou-se o cultivo em grande escala em *E. coli* TOP10® clonadas.

PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Realizou-se o crescimento da cultura de ptrcHISROP18 durante 12 horas a 37°C em 100mL de caldo Luria Bertani (LB) com ampicilina e após foi adicionado 100µL de isopropil β-d-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e mantidos sob agitação durante quatro horas aproximadamente. Após a expressão com o IPTG o caldo foi centrifugado a 2000xg por 15 minutos. O sedimento foi então ressuspenso em 10mL de tampão de ligação nativo. Foi adicionado 10uL de 1M fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF) e 10uL da enzima lisozima (100µg/mL). A solução foi mantida em gelo por 15 minutos. Logo após, realizou-se o processo de sonicação, sendo feito 3 ciclos de 10 segundos no ajuste de potência 8 e congelamento em freezer -80°C por 15 minutos, sendo no último ciclo o tubo permanecia no freezer -80°C durante 12 horas. No dia seguinte foi realizada a centrifugação a 2800xg por 15 minutos e descartado o sobrenadante. O sedimento foi então dissolvido em 7mL de tampão 6M de cloreto de guanidina (GuHCL). Em seguida foi preparado a coluna de níquel, para a purificação da proteína clonada. Para o preparo da coluna com a resina Ni²⁺ (Qiagen®) foi seguido as recomendações do fabricante. Foi realizada então a ligação da proteína do lisado à resina da coluna ressuspendendo a resina com solução GuHCl contendo o sedimento dissolvido e mantida sob agitação na temperatura ambiente por 15 minutos. Após a agitação deixou-se o líquido escorrer na coluna. Após o líquido com GuHCl ser retirado do níquel, foi realizado a lavagem da coluna de 2-3 vezes com o tampão de desnaturação da ligação da proteína (DBB). Foi realizada outra lavagem com o tampão de lavagem 2-3 vezes (DWB). Ao final foi realizada a eluição da proteína com o tampão de eluição (DEB) adicionando 1000uL de alíquota e coletado o volume todo, em cada etapa foi coletado frações de 0,5mL em microtubos para posterior verificação da qualidade da purificação da proteína em gel de poliacrilamida 12%.

GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a formação do primeiro gel a 12%, foi utilizado água ultrapura, acrilamida (30%), Tris (pH 8,8), SDS (10%), Persulfato de amônio (PA) e Tetrametiletenodiamina (TEMED). Após o gel se tornar polimerizado procedeu-se para a formação do gel a 5%, utilizando água ultrapura, acrilamida (30%), Tris pH 6,8, SDS (10%), P.A. e TEMED. Para o preparo das amostras, foi utilizado 20uL de amostra e 10uL de tampão da amostra e colocado no termociclador TC-512

(Techne, USA) por 5 min à 99°C para desnaturação da proteína. No gel, foi utilizado o volume total da amostra com o tampão e feita a eletroforese do gel por duas horas. Posteriormente, foi utilizado solução fixadora por 15 min, depois utilizou-se uma solução corante Comassie Blue por 30 minutos, realizou-se lavagem com água destilada, e posteriormente uma solução descorante até que seja possível visualizar as bandas e por fim, foi utilizado a solução conservante.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 10 Camundongos albinos (linhagem Swiss) com 25g cada divididos em 2 grupos com 5 animais em cada. Os animais do Grupo 1 (G1) receberam rRop18+Quil-A 1%, o Grupo 2 (G2) Quil-A 1%, sendo todas as doses aplicadas com aproximadamente 35µg de proteína recombinante, a quantificação da proteína foi realizada com o kit Pierce™ BCA (Thermo Fisher Scientific, EUA). As aplicações foram realizadas pela via intramuscular (IM) nos dias 0, 21, 42 (Fig. 1.). Os animais vacinados foram monitorados para avaliar a imunidade humoral, antes e após o desafio através da coleta de sangue para obtenção de soro. As amostras de sangue foram obtidas nos dias de aplicação das doses das vacinas por venopunção da veia submandibular. Os camundongos foram desafiados no dia 72 com 1×10^3 taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH através da via intraperitoneal. Após a eutanásia, no dia 100, foram analisados os cérebros para quantificação dos cistos cerebrais. Do sangue colhido o soro foi armazenado em freezer a -20°C até a realização do teste de ELISA.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)

O ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para IgG foi realizado conforme metodologia descrita previamente com algumas modificações (IGARASHI et al., 2010). A proteína rROP18 que foi purificada e utilizada nas doses dos camundongos foi a mesma utilizada no ELISA. A quantificação da proteína foi realizada com o kit comercial (Pierce™ BCA, Thermo Fisher Scientific, USA). Em cada placa foram adicionados controles positivos e negativos. O ponto de corte foi calculado pela análise da DO média dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão do

controle negativo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Teste Qui-Quadrado Gehan-Breslow-Wilcoxon, foi utilizado para verificarmos a significância estatística entre os dados, correlacionado com a sobrevivência dos camundongos entre os grupos. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.01, sendo a diferença significativa estatisticamente foi considerado o p-valor menor ou igual a 0.05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada a clonagem e a purificação da proteína recombinante ROP18 e com isso realizamos os testes nos camundongos para avaliação da vacina, sendo mensuradas e feitas as aplicações de cada dose com cerca de 35µg de proteína.

Neste estudo observou-se, no teste de ELISA, que houve uma resposta imune dos camundongos em relação ao grupo controle do adjuvante nas doses administradas, sendo a resposta mais expressiva referente a segunda dose. Observamos também uma queda no dia do desafio em relação a 3 dose, onde nos dois grupos a média ficou abaixo do esperado em relação as doses (Fig. 4).

Estes mesmo efeitos foram observados por Lu et al., (2018) e Wang et al., (2018) onde obtiveram maiores DO's nos grupos vacinados em relação aos grupos controles. GRZYBOWSKI et al., (2015) observaram em seu estudo com camundongos vacinados com ROP5 e ROP18 que ocorreu uma diferença não significativa entre os grupos vacinados durante uma infecção tardia.

Semelhante ao nosso estudo, onde obteve-se uma diminuição na produção de anticorpos durante as doses e o dia do desafio dos camundongos também não apresentando uma diferença significativa entre os grupos.

No presente trabalho observou-se uma taxa de sobrevivência de 60% que demonstra uma proteção parcial da nossa vacina em relação a cepa RH utilizada no desafio, resultado semelhante ao encontrado por Khosroshahi et al. (2012) onde obtiveram taxa de sobrevivência de 54,5% dos animais vacinados.

Enquanto outros estudos demonstraram que os camundongos desafiados com a cepa RH do *T. gondii* não obtiveram sucesso de proteção da vacina e os animais não sobreviveram a doença aguda (KHODADADI et al., 2021; WANG et al., 2018; WU et al., 2021; ZHOU et al., 2019).

CONCLUSÃO

Conclui-se que neste estudo a proteína rROP18 apresentou uma proteção parcial contra a toxoplasmose aguda com uma sobrevivência de 60%. Desta forma, estudos para avaliação da proteína rROP18 contra uma doença crônica ou outras cepas, devem ser desenvolvidos para avaliar sua proteção contra o *T. gondii*.

Referências bibliográficas

BONENFANT, C. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605–1612, 2001.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 6, p. 505–515, dez. 2009.

CHING, X. T.; FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Evaluation of the protective effect of deoxyribonucleic acid vaccines encoding granule antigen 2 and 5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1441–1447, jun. 2017.

CHU, J.-Q. et al. Evaluation of Protective Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding GRA8 against Acute Toxoplasmosis in a Murine Model. **The Korean journal of parasitology**, v. 56, n. 4, p. 325–334, 31 ago. 2018.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 216–221, 2012.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Protection against *Toxoplasma gondii* cysts in pigs immunized with rROP2 plus Iscomatrix. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. e012620, 2020.

CZARNEWSKI, P. et al. Recombinant TgHSP70 Immunization Protects against *Toxoplasma gondii* Brain Cyst Formation by Enhancing Inducible Nitric Oxide Expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 142, 2017.

DE SOUZA-E-SILVA, C. H. et al. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 1, p. 13–16, 2013.

DODANGEH, S. et al. A systematic review on efficiency of microneme proteins to induce protective immunity against *Toxoplasma gondii*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 617–629, abr. 2019.

DODANGEH, S. et al. Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, 1 abr. 2021.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DZIADEK, B.; BRZOSTEK, A. Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis: what's next? **Bioengineered**, v. 3, n. 6, p. 358–364, 2012.

FARIDNIA, R. et al. Vaccination against *Toxoplasma gondii* using rhoptry antigens: a systematic review. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 59, p. 32–40, ago. 2018.

FERGUSON, D. J. P. et al. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 259–265, 1999.

FIEGE, J. K. et al. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 12, p. 1815–1827.e6, dez. 2021.

FOROUTAN, M. et al. Rhomboid antigens are promising targets in the vaccine development against *Toxoplasma gondii*. **EXCLI journal**, v. 18, p. 259–272, 2019a.

FOROUTAN, M. et al. Rhoptry antigens as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 8, n. 1, p. 4–26, jan. 2019b.

FREYRE, A. et al. Immunization of Cats with Tissue Cysts, Bradyzoites, and Tachyzoites of the T-263 Strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 5, p. 716, 1993.

GARCIA, J. L. et al. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 197–206, 2007.

GARCIA, J. L. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 215–225, 9 fev. 2009.

GARCIA, J. L. et al. **The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis in experimentally infected pigs** *Research in Veterinary Science*, 2017.

GARCIA, J. L.; INNES, E. A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy**, p. 23, abr. 2014.

GATKOWSKA, J. et al. Assessment of the antigenic and neuroprotective activity of the subunit anti-*Toxoplasma* vaccine in *T. gondii* experimentally infected mice. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 82–94, abr. 2018.

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today**, v. 54, n. 5, p. 315, maio 2018.

GRZYBOWSKI, M. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 1–6, mar. 2015.

HAISSA, K. et al. Immunogenicity of Multiepitope Vaccine Candidate against

Toxoplasma gondii Infection in BALB/c Mice. **Iranian journal of parasitology**, v. 13, n. 2, p. 215–224, 2018.

HAJISSA, K. et al. Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against Toxoplasma gondii infection: A mini-review. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, n. 2, p. 174, jun. 2019.

HAMILTON, C. M. et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of Toxoplasma gondii. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 104, mar. 2019.

HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E. et al. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of Toxoplasma gondii. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 281–289, 2011.

IGARASHI, M. et al. Toxoplasma gondii: Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 305–313, 2008.

IGARASHI, M. et al. Toxoplasma gondii: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 210–216, dez. 2010.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a029132, 2 abr. 2018.

JONES, J. L. et al. Recently acquired Toxoplasma gondii infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 582–587, 2006.

KANG, H.-J. et al. Influenza Virus-Like Particles Presenting both Toxoplasma gondii ROP4 and ROP13 Enhance Protection against T. gondii Infection. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 342, 16 jul. 2019.

KANG, H.-J. et al. Passive Immunity and Antibody Response Induced by Toxoplasma gondii VLP Immunization. **Vaccines**, v. 9, n. 5, abr. 2021.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by Toxoplasma gondii. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184–188, 1994.

KHODADADI, M. et al. Immunogenicity of in-silico designed multi-epitope DNA vaccine encoding SAG1, SAG3 and SAG5 of Toxoplasma gondii adjuvanted with CpG-ODN against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 216, p. 105836, 1 abr. 2021.

KHOSROSHAHI, K. H. et al. Comparing the effect of IL-12 genetic adjuvant and alum non-genetic adjuvant on the efficiency of the cocktail DNA vaccine containing plasmids encoding SAG-1 and ROP-2 of Toxoplasma gondii. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 403–411, 21 jul. 2012.

LIU, Q. et al. Toxoplasma gondii: Immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multicomponent DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2. **Human**

Vaccines and Immunotherapeutics, v. 10, n. 1, p. 2860–2867, 2014.

LU, G. et al. DNA vaccine ROP29 from *Toxoplasma gondii* containing R848 enhances protective immunity in mice. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 10, p. e12578, out. 2018.

MACHADO, A. V. et al. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3247–3256, 2010.

MÉVÉLEC, M.-N.; LAKHRIF, Z.; DIMIER-POISSON, I. Key Limitations and New Insights Into the *Toxoplasma gondii* Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 607198, 2020.

MISHIMA, M. et al. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. **Parasitology Research**, v. 88, n. 2, p. 144–149, 6 fev. 2002.

MONTAZERI, M. et al. The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.

PAGHEH, A. S. et al. *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) as a potential candidate to develop vaccine against toxoplasmosis: A systematic review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 101414, abr. 2020.

PICCHIO, M. S. et al. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 62–70, fev. 2018.

RAHIMI, M. T. et al. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Plasmid Encoding Rhomboid 4 (ROM4) of Tachyzoite of *Toxoplasma gondii* RH Strain. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 498–505, 2017a.

RAHIMI, M. T. et al. 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. **Parasitology research**, v. 116, n. 2, p. 609–616, fev. 2017b.

REZAEI, F. et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 172–184, jan. 2019.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F. et al. Plant Hsp90 is a novel adjuvant that elicits a strong humoral and cellular immune response against B- and T-cell epitopes of a *Toxoplasma gondii* SAG1 peptide. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 140, 25 dez. 2019.

SUN, X. et al. The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits

stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 429, 4 dez. 2014.

SUPPLY, P. et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 17, n. 7–8, p. 705–714, 1999.

VELGE-ROUSSEL, F. et al. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969–972, 2000.

VERCAMMEN, M. et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38–45, 2000.

WANG, L.-J. et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. **Vaccine**, v. 36, n. 27, p. 3943–3948, jun. 2018.

WASMUTH, J. et al. The origins of apicomplexan sequence innovation. **Genome Research**, v. 19, n. 7, p. 1202–1213, jul. 2009.

WILKINS, M. F.; O'CONNEL, E.; TE PUNGA, W. A. Toxoplasmosis in sheep further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p. 86–89, 1988.

WU, L. et al. A Novel Combined DNA Vaccine Encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP18 Provokes Protective Immunity Against a Lethal Challenge in Mice. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 4, p. 1387–1395, 1 dez. 2021.

ZHOU, J. et al. Antigenic Epitope Analysis and Efficacy Evaluation of GRA41 DNA Vaccine Against *T. gondii* Infection. **Acta parasitologica**, v. 64, n. 3, p. 471–478, set. 2019.

ZULPO, D. L. et al. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223–230, jun. 2012.

ZULPO, D. L. et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 67–73, mar. 2017.

TILLEY, M.; FICHERA, M. E.; JEROME, M. E.; ROSS, D. S.; WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. **Infection and Immunity**, Nov., p. 4598 – 4605, 1997.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. **Proc. Natl. Academic Science**. v.76, n.9, p. 4350 – 4354, 1979.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Linha do tempo contendo os respectivos dias das doses da vacina, desafio e eutanásia dos camundongos.

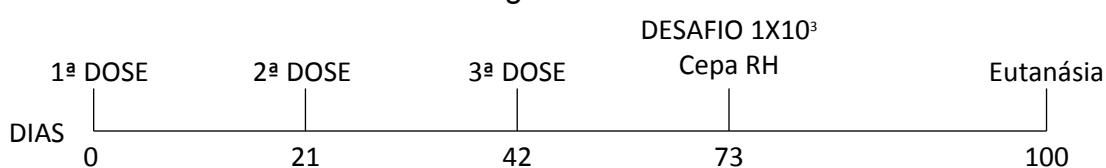


Gráfico 1. Gráfico demonstrando a Densidade Óptica (DO) da resposta imune de cada grupo de acordo com a vacina administrada sendo o dia 72 (dia do desafio) e o dia 85 com menor resposta de anticorpos em relação as doses anteriores.

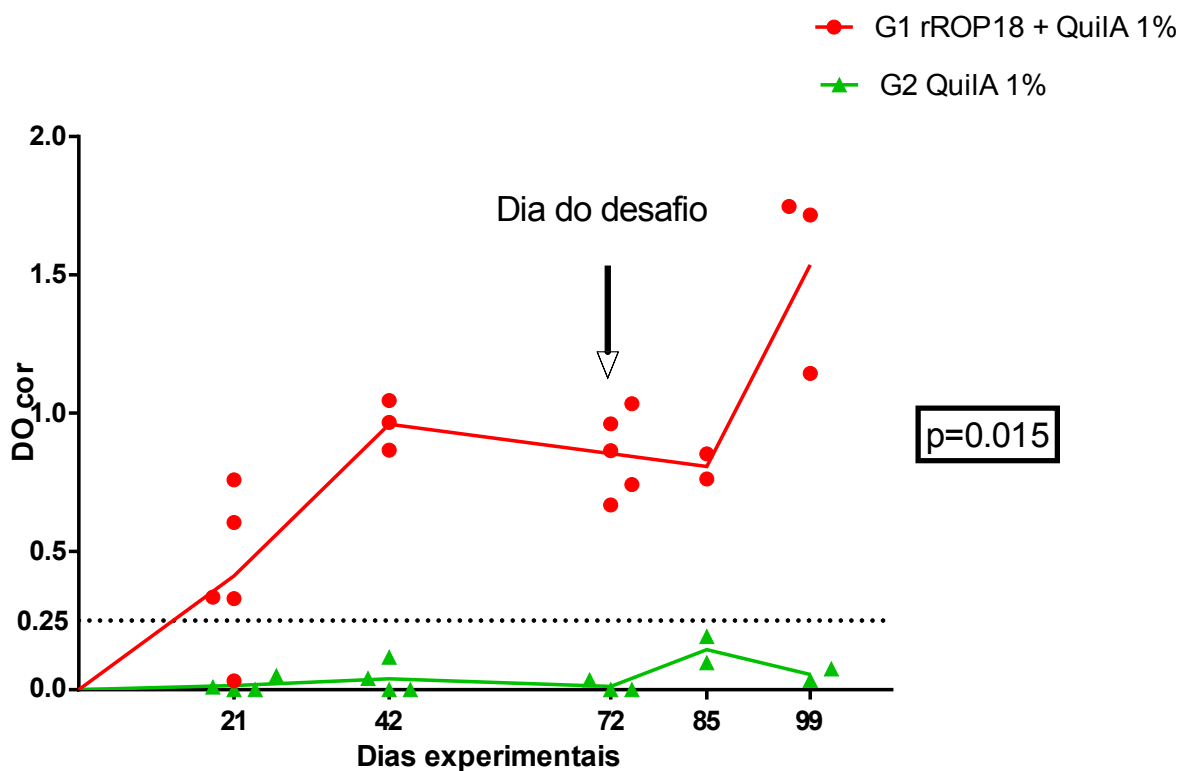
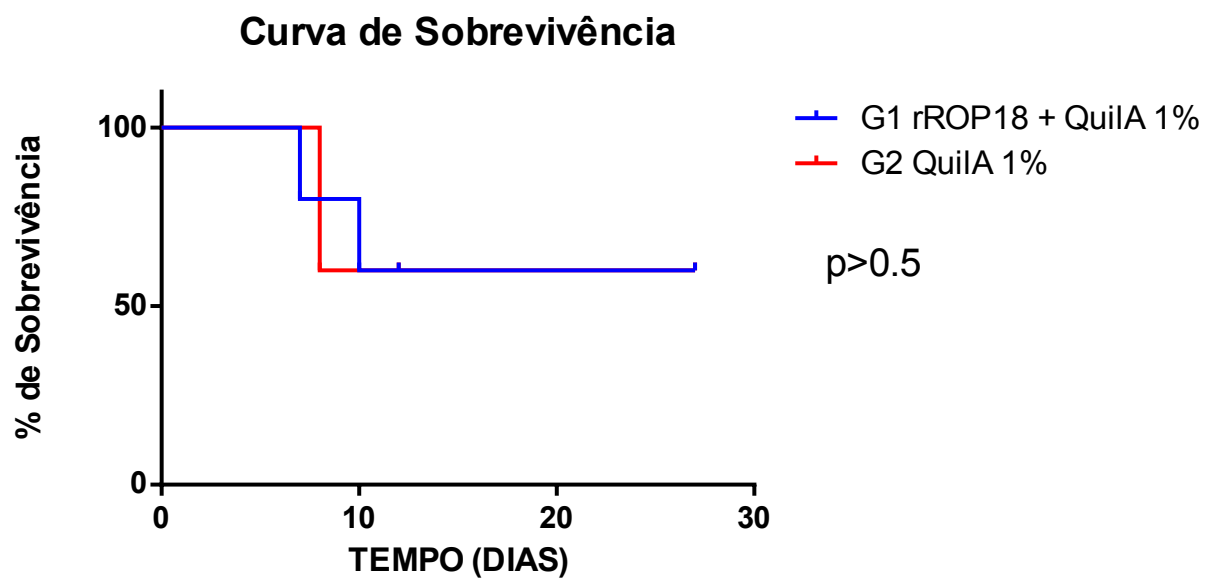


Fig. 3 Gráfico demonstrando a curva de sobrevivência dos camundongos imunizados com a proteína recombinante rROP18 e adjuvante QuilA 1% após o desafio com 1×10^4 taquizoítos da Cepa RH de *T. gondii*.



5 ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E PROTEÇÃO CONTRA *Toxoplasma gondii* EM CAMUNDONGOS VACINADOS COM VACINA pcDNAROP18 e pcDNASAG1

RESUMO

Toxoplasma gondii é um protozoário que causa infecção subclínica, porém, a primo infecção durante a gestação pode causar patologias fetais, bem como, abortamentos em algumas espécies de animais e seres humanos. Com isso demonstra-se a necessidade de se desenvolver ferramentas para controle da toxoplasmose. Uma dessas ferramentas é o desenvolvimento de vacinas. O presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta imune humoral e avaliar a proteção contra cistos teciduais em camundongos imunizados com vacina de DNA (ROP18 e SAG1). As proteínas foram clonadas e foi realizada a transfecção em células VERO para testarmos a transformação em células que pode ser observado através da PCR feita com o lizado das células e os primers da proteína e do vetor. Após a transfecção realizamos experimento com camundongos e observamos que obtivemos um aumento na produção de anticorpos observado pela Densidade Óptica (DO) do teste ELISA. A cepa utilizada no desafio foi a cepa ME49. Após o desafio podemos observar uma taxa de sobrevivência entre 44% e 88% dos camundongos vacinados. Dentre os grupos a menor taxa de sobrevivência (44%) foi observada no grupo vacinado com a mistura das proteínas. Em relação a quantificação de cistos cerebrais os animais dos grupos vacinados apresentaram diminuição na contagem dos cistos em relação aos grupos controles, sendo destaque que não ocorreu significância estatística entre os grupos ($p=0.1$). Com isso podemos concluir que as nossas proteínas apresentaram proteção parcial contra a infecção do *T. gondii* e podemos considerar como boas candidatas a vacina.

Palavras chaves: *Toxoplasma gondii*, vacina de DNA, camundongos, proteínas.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is a protozoan that causes subclinical infection, however, a primary infection during pregnancy can cause fetal pathologies, as well as abortions in some species of animals and humans. This demonstrates the need to develop tools to control toxoplasmosis. One such tool is vaccine development. The present study aimed to evaluate the humoral immune response and evaluate the protection against tissue cysts in mice immunized with DNA vaccine (ROP18 and SAG1). The proteins were cloned and transfection was performed in VERO cells to test the transformation in cells that can be observed through PCR performed with the cell lysate and the protein and vector primers. After the transfection, we performed an experiment with mice and observed that we obtained an increase in the production of the effect observed by the Optical Density (OD) of the ELISA test. The strain used in the challenge was the ME49 strain. After the challenge we can observe a survival rate between 44% and 88% of the vaccinated mice. Among the groups, the lowest survival rate (44%) was observed in the group vaccinated with the mixture of proteins and the control group with PBS (62%). Regarding the quantification of tolerated cysts, the animals in the vaccinated groups showed a decrease in the count of cysts in relation to the controlled groups, with emphasis on the group vaccinated with the SAG1 protein, which showed statistical significance ($p < 0.05$). With that, we can conclude that our proteins tested partial protection against *T. gondii* infection, and we can consider them as good vaccine candidates.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, DNA vaccine, mice, proteins.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário que causa infecção subclínica, porém, a infecção primária durante a gestação pode causar patologias fetais, como abortamentos em algumas espécies de animais e seres humanos (DE SOUZA-E-SILVA et al., 2013). Sabendo-se da importância da toxoplasmose em humanos e das perdas econômicas nos animais de fazenda, estes dados demonstram a necessidade de ferramentas para diminuir a ocorrência desta doença uma dessas ferramentas é o desenvolvimento de vacinas,

As proteínas mais utilizadas para a confecção das vacinas de DNA são as GRA2, GRA5 (CHING et al., 2017), GRA8 (CHU et al., 2018), ROP4 e ROP13 (KANG et al., 2019). Podemos encontrar algumas proteínas nos três estágios do parasita (ocisto, taquizoítos e cistos teciduais), dentre todas as proteínas temos a ROP2 (VERCAMMEN et al., 2000), GRA5 (TILLEY et al., 1997) e GRA7 (FERGUSON et al., 1999) associadas à virulência do parasita.

A imunidade para *T. gondii* é mediada pela imunidade celular e as vacinas vivas apresentam melhor resposta imune em agentes com replicação intracelular (SUPPLY et al., 1999). Os epítomos envolvidos na invasão e fixação do parasita são importantes como candidato a vacina e a imunidade humoral é responsável pela resistência da célula do hospedeiro (HAJISSA et al., 2019; KASPER; MINEO, 1994).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a resposta imune humoral e avaliar a proteção contra cistos teciduais em camundongos imunizados com vacina de DNA+ROP18 e vacina de DNA+SAG1.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS DE *Toxoplasma gondii* E CAMUNDONGOS

Este trabalho foi aprovado pelo Conselho de Ética e Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com o número 6911.2015.87. Foram utilizadas as cepas RH e ME49 do *T. gondii*, a cepa RH foi utilizada para extração do DNA e incorporação em vetor plasmidial. Camundongos fêmeas da linhagem swiss

(camundongos albinos), com cerca de 30 dias (pesando entre 25 e 40g), foram utilizados para replicar a cepa RH pela via intraperitoneal, para obtenção de cistos cerebrais da Cepa ME49 utilizada no desafio e para a imunização com as proteínas.

PREPARO DA SUSPENSÃO DE TAQUIZOÍTOS DE *T. gondii*

Para a obtenção dos taquizoítos puros da amostra RH, cinco camundongos foram inoculados pela via intraperitoneal com uma suspensão de taquizoítos vivos (1×10^5 /ml) em solução fisiológica estéril, obtidos através de lavagem peritoneal de camundongos previamente infectados. As amostras foram padronizadas em 1×10^7 /ml, por contagem em câmara de Neubauer, para preparo e extração de DNA do *T. gondii*.

EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

A extração de DNA dos taquizoítos de *T. gondii* foi efetuada pelo Kit Qiagen QIAmp® DSP DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha) segundo as orientações do fabricante. O material então foi hidratado em Tris-EDTA (TE) e refrigerado durante a noite. O segmento de DNA, da proteína ROP18 e SAG 1 foram obtidos pela técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, desenhados para este estudo, para o gene ROP18 FW (5'- CACC ATG GGG ACC GGA ATC ACA CTT CG -3') e ROP18 RW (5'- GAA TCC TAG CGC TTG AGG CTG CCT GAT-3') e SAG1 FW (5' – CACC ATG GCA GTG AGA CGC GCC GTC AC - 3) e SAG1 RW (5' – GAA TTC CCA GCT ATC TTC TGC TTC AGG - 3'). Para a realização da PCR foi utilizado 25 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 µM de cada primer, 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.4) 1.25U de Taq-DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA), 50ng de DNA de *T. gondii* e H₂O ultrapura estéril em quantidade suficiente para o volume total de 25µl. A amplificação do DNA foi submetida no termociclador TC-512 (Techne, USA) de acordo com o programa: 94°C/5 minutos, 30 ciclos de anelamento (94°C/30 segundos, 59°C/1 minuto, 72°C/30 segundos), 72°C/7 minutos para extensão final e mantido a 4°C até retirada

do termociclador. Para a reação de amplificação do DNA em moldes de clonagem, foi utilizada a enzima Pfx polimerase Platinum® (Invitrogen - EUA) que amplifica os DNA moldes em extremidades abruptas, sendo importante na ligação com o vetor. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose 1.5% corado com Sybr® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, EUA), e visualizado em foto-documentador sobre luz UV (L – PIX EX TRANSLUMINANTOR, Loccus Biotechnology, Brasil).

COMPETÊNCIA DE CÉLULAS *E. coli* TOP10

Realizou-se o crescimento de *E. coli* TOP10® em caldo Luria Bertani (LB) durante 12 horas a 37°C sobre agitação. Após o crescimento foi diluído na proporção de 1:100 e deixado em crescimento até que a densidade óptica (DO) 550nm no espectrofotômetro fosse atingida. Após a DO alcançada os tubos foram centrifugados a 2000xg durante 5 minutos a temperatura de 4°C. Após a centrifugação o sedimento foi ressuscitado em caldo tampão de transformação com Mess (TT com Mess), na proporção de um terço do volume centrifugado. Incubado no gelo por 20 minutos e centrifugado a 2000xg durante 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, foi ressuscitado lentamente em 2,4mL de TT com MESS. Após ressuspensão manteve-se no gelo por quinze minutos e distribuído em microtubos (contendo 100µL em cada) e adicionado 15% de glicerol no volume final para armazenamento em freezer -80°C.

CLONAGEM E TRANSFORMAÇÃO – *E. coli* TOP10®

Os plasmídeos pcDNA®3.1V5-HIS TOPO® TA Expression Kit (Invitrogen®, EUA) foram inseridos, de acordo com as recomendações do fabricante, pela reação de transformação em *E. coli* TOP10® (Invitrogen®, EUA) quimicamente competente. Após a ligação do produto da PCR, seguindo a recomendação do fabricante, cerca de 100µL foi semeado em uma placa com meio LB com ágar e ampicilina (50µg/mL) e incubado a 37°C por 12 horas. Observou-se no dia seguinte se houve crescimento de colônias. Das colônias crescidas, se procedeu a confirmação da presença do inserto em fase de quadro de leitura para transcrição no vetor, onde foi feita através

do sequenciamento pelo método de Sanger. Após a verificação do quadro de leitura e inserto dos genes, realizou-se o cultivo em grande escala em *E. coli* TOP10® clonadas.

EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO pcDNA3.1® V5-His® TOPO TA

A extração de plasmídeo foi realizada utilizando Kit comercial PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen®, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Após os plasmídeos extraídos foram armazenados em freezer -20°C até o preparo da vacina nos camundongos.

TRANSFEÇÃO EM CÉLULA VERO

A transfecção em células VERO foi realizada utilizando o X-tremeGENE™ HP DNA TRANSFECTION REAGENT (Rohe® Life Science, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Foram realizadas diluições em triplicata do X-tremeGENE™ HP DNA TRANSFECTION REAGENT (Rohe® Life Science, Alemanha), dos controles e das amostras. Adicionamos 20 µg de plasmídeo em cada triplicata. Nos controles positivos utilizamos a pcDNA LacZ e nos controles negativos células VERO, ambos com meio DMEM 10% SFB e sem ATB e foram transferidos para estufa 37°C/5% de CO₂. Observou-se o crescimento celular e procedeu-se a lise destas células para confirmação através da PCR utilizando os primers do vetor e da proteína.

PREPARO DE INÓCULOS

Foram utilizados cistos cerebrais da cepa do *T. gondii* ME49 no desafio dos camundongos vacinados. Seis camundongos foram inoculados pela via oral com 20 cistos da cepa e observados durante 45 dias. Após a eutanásia foram coletados os cérebros e diluídos em 1mL de salina (0,85%) estéril para a contagem dos cistos em 25 µL em lâmina e lamínula. Após a contagem, foi realizada a diluição do inóculo para ser administrado pela via oral 25 cistos para cada animal do experimento.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

No experimento foram utilizados 36 camundongos (Swiss) fêmeas divididas em 4 grupos, sendo Grupo 1 (G1) pcDNASAG1+Levamisole 1,5%, Grupo 2 (G2) pcDNAROP18+Levamisole 1,5%, Grupo 3 (G3) pcDNA+Levamisole 1,5% e Grupo 4 (G4) pdDNASAG1+pcDNAROP18+Levamisole 1,5%. Os animais foram divididos em 9 animais cada grupo. Os camundongos receberam 35µg de plasmídeos em cada dose realizada entre os dias 0, 21, 42 através da via intramuscular (IM) e o desafio foi realizado no dia 87 com 25 cistos cerebrais da cepa ME49 do *T. gondii* através da via oral (Fig. 2). Os animais foram eutanasiados no dia 140 e coletado os cérebros para posterior contagem de cistos cerebrais. Amostras de sangue foram obtidas nos dias de aplicação das doses das vacinas por venopunção da veia submandibular. Do sangue colhido o soro foi armazenado a -20°C até a realização da prova de ELISA.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO INDIRETO (ELISA)

O Ensaio Imunoenzimático Indireto (ELISA) foi realizado conforme metodologia descrita previamente com algumas modificações (IGARASHI et al., 2010). A proteína rROP18 que foi purificada através da coluna de níquel foi utilizada para adsorção da placa no ELISA. Em cada placa foram adicionados controles positivos e negativos. O ponto de corte foi calculado pela análise da DO média dos controles negativos mais duas vezes o desvio padrão do controle negativo.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O Teste ANOVA Kruskal-Wallis test , foi utilizado para verificarmos a significância estatística entre os dados, correlacionando a sobrevivência entre os grupos e as datas de vacina. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.01, sendo a diferença significativa estatisticamente do p-valor menor ou igual a 0.05.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os clones positivos de *E. coli* TOP10® para ROP18 e SAG1 foram submetidos a PCR com os primers do vetor e ao sequenciamento; verificou-se que estes se encontravam em fase de leitura da proteína para ambas. Podemos confirmar a presença dos vetores plasmidiais clonados através da PCR utilizando o lisado das células transfectadas com os primers ROP18 e do Vetor pcDNA 3.1 V5-HIS Topo (Fig. 1).

Entre as doses aplicadas com 21 e 42 dias foi observado um aumento na resposta imune, demonstrado pelo aumento da DO observado no ELISA tendo significância estatística entre os grupos nas datas vacinadas ($p < 0.05$).

Resultado semelhante observado por KHODADADI et al., (2021) em que observaram altos níveis de IgG nos camundongos vacinados com 28 dias pós dose e significância estatística entre os grupos vacinados e controle.

Neste estudo com os camundongos vacinados obtivemos uma taxa de sobrevivência variando de 44% a 88% (Fig. 4). Entretanto a curva de sobrevivência não apresentou significância estatística ($p < 0,05$).

Dentre os grupos vacinados, observamos que a proteína da SAG1 se apresentou como uma candidata a vacina, sendo ela mais eficiente que a ROP18 devido a sua taxa de sobrevivência ser de 88% contra 77%, respectivamente.

A mistura de ambas as proteínas demonstrou uma baixa proteção contra a doença aguda, devido a sua taxa de sobrevivência ter sido de 44%, porém apresentou uma diminuição na quantificação de cistos cerebrais. BONENFANT et al. (2001) apresentaram resultado diferente do presente estudo, onde imunizaram camundongos com duas toxinas mutantes e a proteína SAG1 do *T. gondii* (LTR72 + SAG1 e LTK63 + SAG1) através da via nasal; observaram altos níveis de proteção através da quantificação dos cistos teciduais onde observaram uma redução na contagem após o desafio com a cepa 76K do *T. gondii*.

Entretanto o grupo com a mistura de proteínas pode-se notar uma redução na contagem de cistos cerebrais em relação ao grupo controle que só foi administrado o plasmídeo (Fig. 3). Foi observado significância estatística apenas entre o Grupo vacinado com SAG1 + Levamisole 1,5% e os grupos controles.

Em seu estudo GATKOWSKA et al., (2018) testaram uma vacina tetravalente (ROP2+ROP4+SAG1+MAG1) e observaram uma redução de 58% na produção de

cistos cerebrais em camundongos fêmeas em relação ao grupo não vacinado, sendo estes valores próximo do presente trabalho onde no grupo com a proteína ROP18 observou-se uma proteção semelhante, com cerca de 50% menos cistos na média em relação ao grupo controle do vetor. Lu et al., (2018a) obtiveram resultado semelhante ao encontrado neste estudo, onde observaram poucos cistos cerebrais nos camundongos vacinados com roptrias (R848/ROP29).

CONCLUSÃO

Neste estudo conclui-se que a vacina de DNA desenvolvida com as proteínas ROP18 e SAG1 produziram anticorpos nos camundongos vacinados e diminuição na contagem de cistos cerebrais em relação ao grupo controle, sendo candidatas a vacina contra o *T. gondii*.

Quando as proteínas administradas de forma conjunta apresentaram baixa proteção em relação à doença aguda, entretanto na quantificação dos cistos cerebrais apresentaram menor quantidade de cistos em relação ao grupo controle.

Podemos concluir que quando administradas as proteínas de forma separada apresentam melhor proteção em relação a doença aguda e na formação de cistos cerebrais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONENFANT, C. et al. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1605–1612, 2001.

BRANDTZAEG, P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 6, p. 505–515, dez. 2009.

CHING, X. T.; FONG, M. Y.; LAU, Y. L. Evaluation of the protective effect of deoxyribonucleic acid vaccines encoding granule antigen 2 and 5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 1441–1447, jun. 2017.

CHU, J.-Q. et al. Evaluation of Protective Immune Response Induced by a DNA Vaccine Encoding GRA8 against Acute Toxoplasmosis in a Murine Model. **The Korean journal of parasitology**, v. 56, n. 4, p. 325–334, 31 ago. 2018.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Humoral and cellular immune responses in pigs immunized intranasally with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii* plus Quil-A. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 3–4, p. 216–221, 2012.

CUNHA, I. A. L. DA et al. Protection against *Toxoplasma gondii* cysts in pigs immunized with rROP2 plus Iscomatrix. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria**, v. 29, n. 4, p. e012620, 2020.

CZARNEWSKI, P. et al. Recombinant TgHSP70 Immunization Protects against *Toxoplasma gondii* Brain Cyst Formation by Enhancing Inducible Nitric Oxide Expression. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 142, 2017.

DE SOUZA-E-SILVA, C. H. et al. Association between IgG subclasses against *Toxoplasma gondii* and clinical signs in newborns with congenital toxoplasmosis. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 1, p. 13–16, 2013.

DODANGEH, S. et al. A systematic review on efficiency of microneme proteins to induce protective immunity against *Toxoplasma gondii*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 617–629, abr. 2019.

DODANGEH, S. et al. Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including

MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. **Microbial Pathogenesis**, v. 153, 1 abr. 2021.

DUBEY, J. P. The history of *Toxoplasma gondii* - The first 100 years. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 467–475, 2008.

DZIADEK, B.; BRZOSTEK, A. Recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 antigen-cocktails as possible tools for immunoprophylaxis of toxoplasmosis: what's next? **Bioengineered**, v. 3, n. 6, p. 358–364, 2012.

FARIDNIA, R. et al. Vaccination against *Toxoplasma gondii* using rhoptry antigens: a systematic review. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 59, p. 32–40, ago. 2018.

FERGUSON, D. J. P. et al. In vivo expression and distribution of dense granule protein 7 (GRA7) in the exoenteric (tachyzoite, bradyzoite) and enteric (coccidian) forms of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 259–265, 1999.

FIEGE, J. K. et al. Mice with diverse microbial exposure histories as a model for preclinical vaccine testing. **Cell Host & Microbe**, v. 29, n. 12, p. 1815- 1827.e6, dez. 2021.

FOROUTAN, M. et al. Rhomboid antigens are promising targets in the vaccine development against *Toxoplasma gondii*. **EXCLI journal**, v. 18, p. 259–272, 2019a.

FOROUTAN, M. et al. Rhoptry antigens as *Toxoplasma gondii* vaccine target. **Clinical and experimental vaccine research**, v. 8, n. 1, p. 4–26, jan. 2019b.

FREYRE, A. et al. Immunization of Cats with Tissue Cysts, Bradyzoites, and Tachyzoites of the T-263 Strain of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Parasitology**, v. 79, n. 5, p. 716, 1993.

GARCIA, J. L. et al. Protective activity against oocyst shedding in cats vaccinated with crude rhoptry proteins of the *Toxoplasma gondii* by the intranasal route. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 197–206, 2007.

GARCIA, J. L. Vaccination concepts against *Toxoplasma gondii*. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 2, p. 215–225, 9 fev. 2009.

GARCIA, J. L. et al. **The use of ELISA, nPCR and qPCR for diagnosis of ocular toxoplasmosis in experimentally infected pigs** *Research in Veterinary Science*, 2017.

GARCIA, J. L.; INNES, E. A.; KATZER, F. Current progress toward vaccines against *Toxoplasma gondii*. **Vaccine: Development and Therapy**, p. 23, abr. 2014.

GATKOWSKA, J. et al. Assessment of the antigenic and neuroprotective activity of the subunit anti-*Toxoplasma* vaccine in *T. gondii* experimentally infected mice. **Veterinary parasitology**, v. 254, p. 82–94, abr. 2018.

GHAFFARIFAR, F. Plasmid DNA vaccines: where are we now? **Drugs of Today**, v. 54, n. 5, p. 315, maio 2018.

GRZYBOWSKI, M. M. et al. *Toxoplasma gondii*: Cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. **Experimental Parasitology**, v. 150, p. 1–6, mar. 2015.

HAISSA, K. et al. Immunogenicity of Multiepitope Vaccine Candidate against *Toxoplasma gondii* Infection in BALB/c Mice. **Iranian journal of parasitology**, v. 13, n. 2, p. 215–224, 2018.

HAISSA, K. et al. Epitope-based vaccine as a universal vaccination strategy against *Toxoplasma gondii* infection: A mini-review. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 6, n. 2, p. 174, jun. 2019.

HAMILTON, C. M. et al. Comparative virulence of Caribbean, Brazilian and European isolates of *Toxoplasma gondii*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 104, mar. 2019.

HISZCZYŃSKA-SAWICKA, E. et al. Evaluation of immune responses in sheep induced by DNA immunization with genes encoding GRA1, GRA4, GRA6 and GRA7 antigens of *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 3–4, p. 281–289, 2011.

IGARASHI, M. et al. *Toxoplasma gondii*: Cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 305–313, 2008.

IGARASHI, M. et al. Toxoplasma gondii: humoral and cellular immune response of BALB/c mice immunized via intranasal route with rTgROP2. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 210–216, dez. 2010.

JAMESON, S. C.; MASOPUST, D. What Is the Predictive Value of Animal Models for Vaccine Efficacy in Humans? **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a029132, 2 abr. 2018.

JONES, J. L. et al. Recently acquired Toxoplasma gondii infection, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 582–587, 2006.

KANG, H.-J. et al. Influenza Virus-Like Particles Presenting both Toxoplasma gondii ROP4 and ROP13 Enhance Protection against T. gondii Infection. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 342, 16 jul. 2019.

KANG, H.-J. et al. Passive Immunity and Antibody Response Induced by Toxoplasma gondii VLP Immunization. **Vaccines**, v. 9, n. 5, abr. 2021.

KASPER, L. H.; MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by Toxoplasma gondii. **Parasitology Today**, v. 10, n. 5, p. 184–188, 1994.

KHODADADI, M. et al. Immunogenicity of in-silico designed multi-epitope DNA vaccine encoding SAG1, SAG3 and SAG5 of Toxoplasma gondii adjuvanted with CpG-ODN against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. **Acta Tropica**, v. 216, p. 105836, 1 abr. 2021.

KHOSROSHAHI, K. H. et al. Comparing the effect of IL-12 genetic adjuvant and alum non-genetic adjuvant on the efficiency of the cocktail DNA vaccine containing plasmids encoding SAG-1 and ROP-2 of Toxoplasma gondii. **Parasitology Research**, v. 111, n. 1, p. 403–411, 21 jul. 2012.

LIU, Q. et al. Toxoplasma gondii: Immune response and protective efficacy induced by ROP16/GRA7 multicomponent DNA vaccine with a genetic adjuvant B7-2. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 10, n. 1, p. 2860–2867, 2014.

LU, G. et al. DNA vaccine ROP29 from Toxoplasma gondii containing R848 enhances protective immunity in mice. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 10, p.

e12578, out. 2018.

MACHADO, A. V. et al. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. **Vaccine**, v. 28, n. 18, p. 3247–3256, 2010.

MÉVÉLEC, M.-N.; LAKHRIF, Z.; DIMIER-POISSON, I. Key Limitations and New Insights Into the *Toxoplasma gondii* Parasite Stage Switching for Future Vaccine Development in Human, Livestock, and Cats. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 607198, 2020.

MISHIMA, M. et al. Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats. **Parasitology Research**, v. 88, n. 2, p. 144–149, 6 fev. 2002.

MONTAZERI, M. et al. The global serological prevalence of *Toxoplasma gondii* in felids during the last five decades (1967-2017): A systematic review and meta-analysis. **Parasites and Vectors**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2020.

PAGHEH, A. S. et al. *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) as a potential candidate to develop vaccine against toxoplasmosis: A systematic review. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 69, p. 101414, abr. 2020.

PICCHIO, M. S. et al. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. **Experimental Parasitology**, v. 185, p. 62–70, fev. 2018.

RAHIMI, M. T. et al. Molecular Cloning, Expression and Characterization of Plasmid Encoding Rhomboid 4 (ROM4) of Tachyzoite of *Toxoplasma gondii* RH Strain. **Iranian journal of parasitology**, v. 12, n. 4, p. 498–505, 2017a.

RAHIMI, M. T. et al. 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. **Parasitology research**, v. 116, n. 2, p. 609–616, fev. 2017b.

REZAEI, F. et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. **Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 172–184, jan. 2019.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. F. et al. Plant Hsp90 is a novel adjuvant that elicits a strong humoral and cellular immune response against B- and T-cell epitopes of a *Toxoplasma gondii* SAG1 peptide. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 140, 25 dez. 2019.

SUN, X. et al. The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 429, 4 dez. 2014.

SUPPLY, P. et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. **Vaccine**, v. 17, n. 7–8, p. 705–714, 1999.

VELGE-ROUSSEL, F. et al. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 969–972, 2000.

VERCAMMEN, M. et al. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 38–45, 2000.

WANG, L.-J. et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. **Vaccine**, v. 36, n. 27, p. 3943–3948, jun. 2018.

WASMUTH, J. et al. The origins of apicomplexan sequence innovation. **Genome Research**, v. 19, n. 7, p. 1202–1213, jul. 2009.

WILKINS, M. F.; O'CONNEL, E.; TE PUNGA, W. A. Toxoplasmosis in sheep further evaluation of the ability of a live *Toxoplasma gondii* vaccine to prevent lamb losses and reduce congenital infection following experimental oral challenge. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 36, n. 2, p. 86–89, 1988.

WU, L. et al. A Novel Combined DNA Vaccine Encoding *Toxoplasma gondii* SAG1

and ROP18 Provokes Protective Immunity Against a Lethal Challenge in Mice. **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 4, p. 1387–1395, 1 dez. 2021.

ZHOU, J. et al. Antigenic Epitope Analysis and Efficacy Evaluation of GRA41 DNA Vaccine Against *T. gondii* Infection. **Acta parasitologica**, v. 64, n. 3, p. 471–478, set. 2019.

ZULPO, D. L. et al. Oocyst shedding in cats vaccinated by the nasal and rectal routes with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 223–230, jun. 2012.

ZULPO, D. L. et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, p. 67–73, mar. 2017.

TILLEY, M.; FICHERA, M. E.; JEROME, M. E.; ROSS, D. S.; WHITE, M. W. *Toxoplasma gondii* sporozoites form a transient parasitophorous vacuole that is impermeable and contains only a subset of dense-granule proteins. *Infection and Immunity*, Nov., p. 4598 – 4605, 1997.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications. *Proc. Natl. Academic Science*. v.76, n.9, p. 4350 – 4354, 1979.

FIGURAS E TABELAS

Fig. 1 PCR com os primers do vetor pcDNA e do gene ROP18, testando as diluições do X-tremeGENE™ HP DNA TRANSFECTION REAGENT, verificando a inserção do plasmídeo pcDNA+ROP18 nas células VERO no cultivo celular.

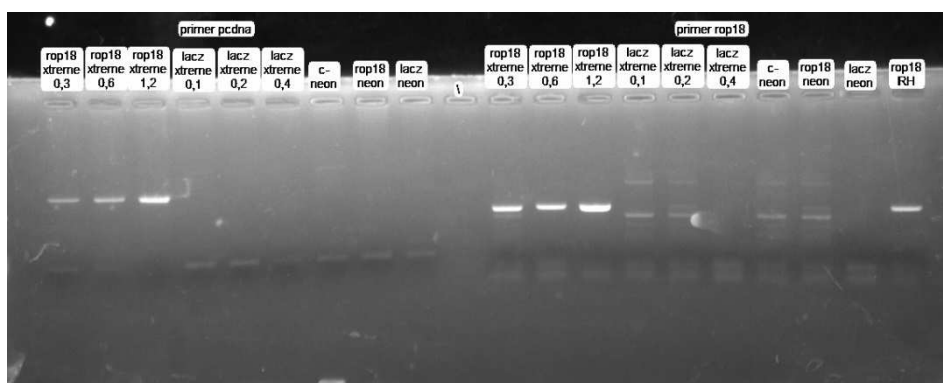


Fig. 2 Linha do tempo contendo os respectivos dias das doses da vacina, desafio e eutanásia dos camundongos.

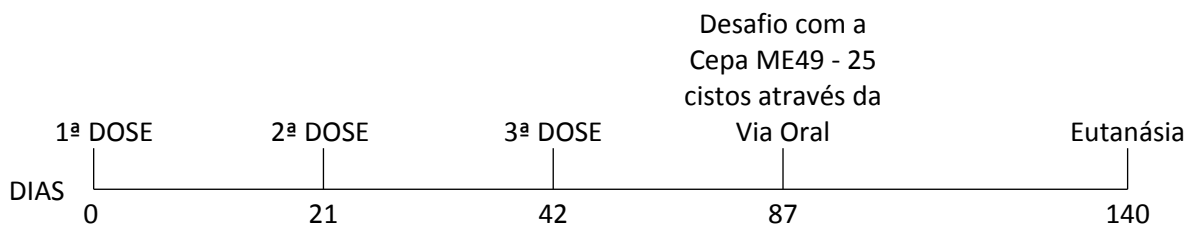


Fig. 3 Quantificação dos cistos cerebrais de *T. gondii* em camundongos eutanasiados no dia 140, desafiados com cistos da cepa ME49. No gráfico temos a quantificação de cistos demonstrada por cada camundongo e as médias dos grupos. Não houve significância estatística ($p=0.1$).

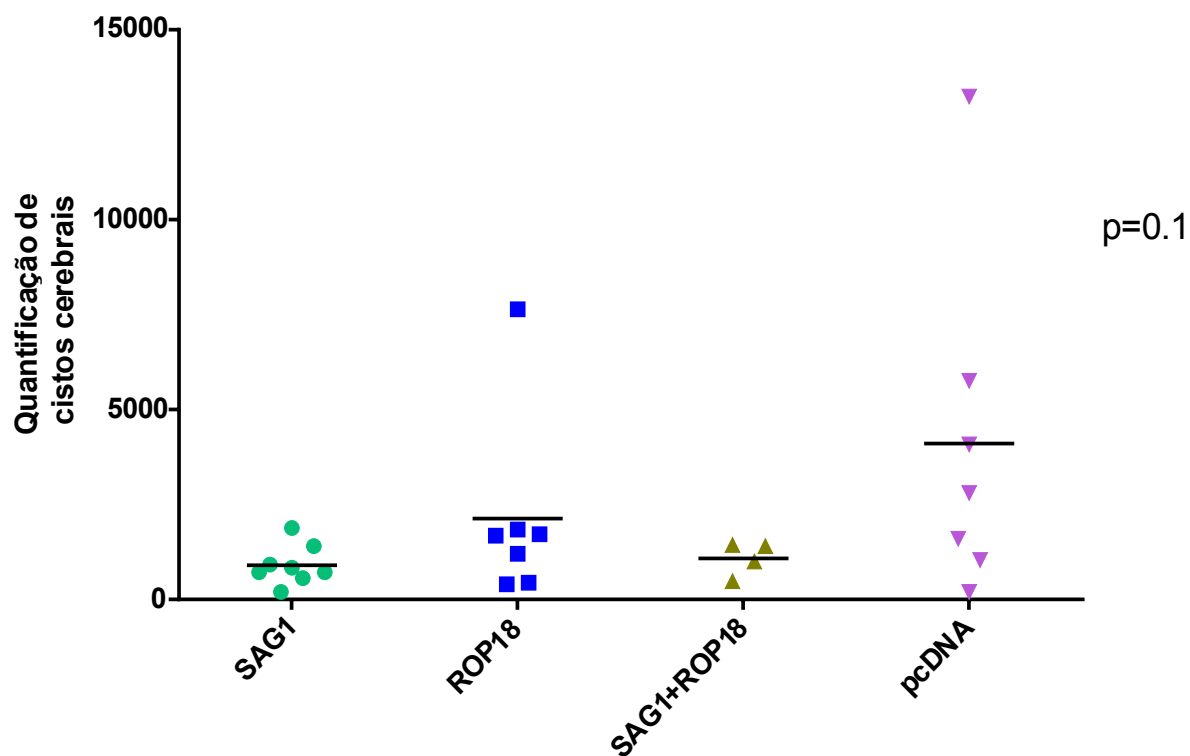


Fig. 4 Gráfico demonstrando a curva de sobrevivência de cada grupo de camundongos imunizados com as vacinas de DNA ROP18, SAG1, ROP18+SAG1 e grupo controle.

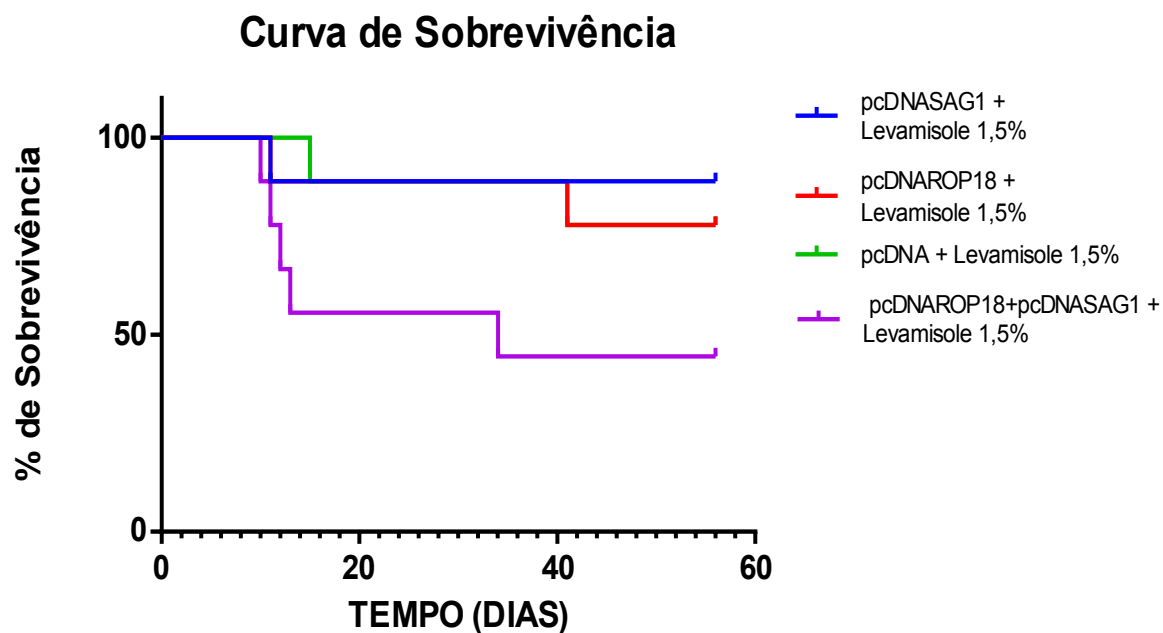
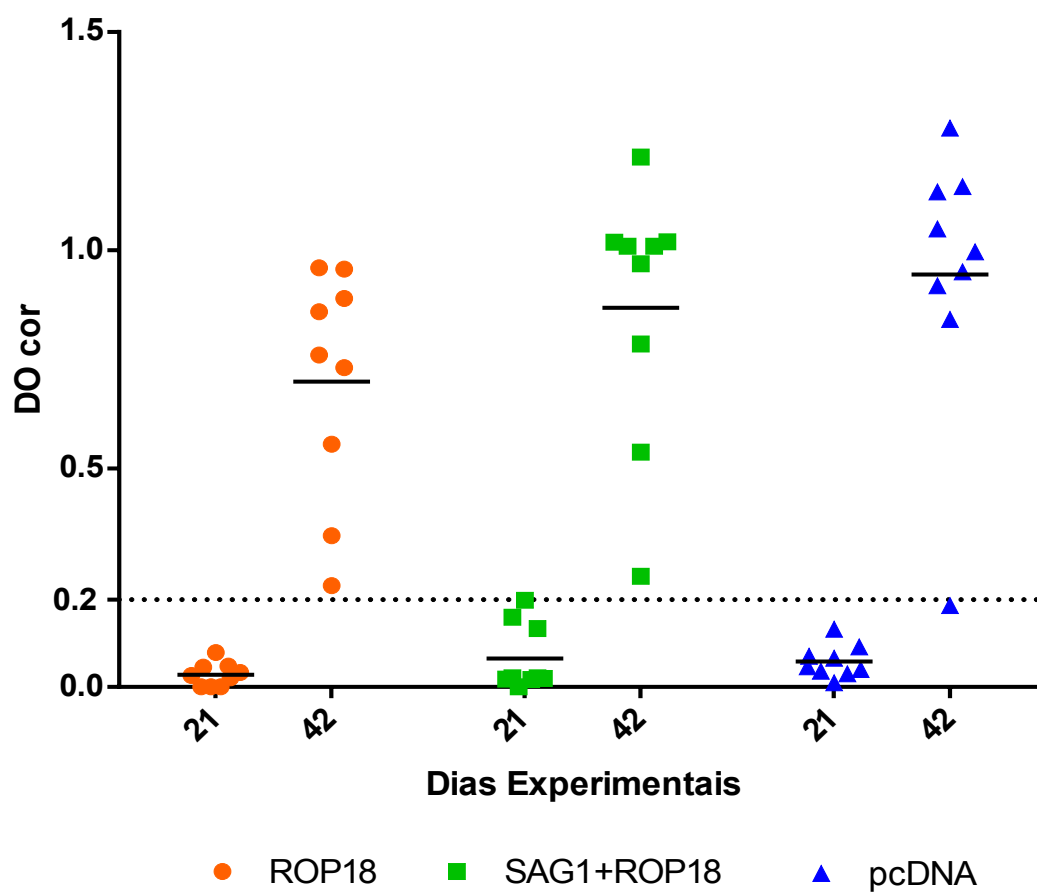


Fig. 5 Gráfico apresentando a Densidade Óptica (DO) das amostras de soro coletados dos camundongos vacinados nos dias 21 e 42. Na linha pontilhada refere-se ao ponto de corte utilizado. (DO cor - é a Densidade Óptica corrigida apresentada por cada animal).



6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo podemos observar que a produção de uma vacina contra o *Toxoplasma gondii* é um desafio, devido as suas inúmeras proteínas. Com tudo conseguimos inúmeros avanços no decorrer dos anos elucidando muitos pontos quanto a resposta imunológica contra o *T. gondii*.

Dentre as cepas utilizadas pode ser observado uma resposta satisfatória em relação a doença crônica, uma vez que os camundongos desafiados com cepa ME49, uma cepa cistogênica, apresentaram uma redução na contagem de cistos. Em relação a Cepa RH estes animais apresentaram uma proteção parcial quanto a sobrevivência a doença aguda destes camundongos.

Porém ainda é necessário mais estudo para elucidar esta proteção. Entretanto estudos futuros ainda são necessários para se elucidar qual a melhor proteína para se obter uma resposta imunológica rápida evitando a doença nos animais infectados e assim diminuir a transmissão para os humanos.

ANEXOS

ANEXO A

Protocolos e Soluções

1 – Competência das células *E. coli* TOP10®:

➤ Tampão de Transformação (TT)

KCl _____ 0,74g
CaCl₂ _____ 0,75g
H₂O Miliq _____ 80mL
Dissolver e autoclavar

➤ MES

MES _____ 0,20g
H₂O Miliq _____ 15mL
pH 6,3 -> qsp 20mL;
Filtre em filtro milipore;
Adicionar 80mL de TT autoclavado.

2 – Caldo Luria Bertani (LB):

Triptona _____ 10g
Extrato de Levedura _____ 5g
NaCl _____ 10g
H₂O Destilada q.s.p. _____ 1000mL
Autoclavar por 15 minutos a 127°C.

➤ Caldo Luria Bertani com Agar 1,5%

A cada 100mL de Caldo LB adicionar 1,5g de Agar Bacteriológico.
Autoclavar por 15 minutos a 127°C.
Em cada placa de petri adicionar 10µL de antibiótico e 10mL de caldo LB com Agar 1,5% e aguardar polimerizar.

3 - Solução de Purificação de Proteínas Recombinantes em Níquel:

➤ Solução A 10X []

200mM NaH₂PO₄ _____ 27,6g
 5M NaCl _____ 292,9g
 Água destilada _____ 1000mL

➤ Solução B 10X []

200mM Na₂HPO₄ _____ 28,4g
 5M NaCl _____ 292,9g
 Água destilada _____ 1000mL

➤ Tampão de Guanidina 6M (pH 7,8)

Solução A 10X [] _____ 0,58mL
 Solução B 10X [] _____ 9,42mL
 Guanidina HCl (GuHCl) _____ 57,3g
 Preparar a solução até 100mL e ajustar o pH com HCl.

➤ Tampão de Ligação Desnaturante (DBB – Denaturing Biding Buffer) (pH7,8)

Uréia (8M Uréia) _____ 48g
 Água Destilada _____ 40mL
 Solução A 10X [] _____ 0,58mL
 Solução B 10X [] _____ 9,42mL

Equilibrar a solução no pH em 7,8 até o volume de 100mL. Para aumentar o pH utilizar a solução B 1X [] e para diminuir o pH utilizar solução A 1X [].

➤ Tampão de Lavagem Desnaturante (DWB - Denaturing Wash Buffer) (pH6,0)

Solução A 10X [] _____ 7,38mL
 Solução B 10X [] _____ 2,62mL
 8M Uréia _____ 48,1g

Preparar a solução até 100mL e ajustar o pH com HCl quando necessário.

➤ Tampão de Eluição Desnaturante (DEB – Denaturing Elution Buffer) (pH 4,0)

Solução A 10X [] _____ 10mL
 8M Uréia _____ 48,1g

Preparar a solução até 100mL e ajustar o pH com HCl quando necessário.

4 – Gel de Poliacrilamida:

➤ Acrilamida 30%

H₂O Ultrapura _____ 100mL

Acilamida _____ 29,2g
 Bis-Acilamida _____ 0,8g

➤ SDS 10%

SDS _____ 10g
 H₂O Ultrapura _____ 90mL

- Tris HCl 15M (pH 8,8)

H₂O Ultrapura _____ 150mL
 Tris Base _____ 27,33g
 Homogeneizar e corrigir pH 8,8 com 6N HCl.

➤ Tris HCL 0,5M (pH 6,8)

H₂O Ultrapura _____ 100mL
 Tris Base _____ 6g
 Homogeneizar e corrigir pH com 6N HCl.

➤ APS PA 10%

Persulfato de Amônio _____ 0,1g
 H₂O Ultrapura _____ 1mL

➤ Tampão de Amostra 5x []

SDS 10% _____ 1,6mL
 Glicerol _____ 1,6mL
 Sol. Tris pH 6,8 _____ 1,0mL
 Azul de Bromofenol 5% _____ 0,4mL
 2-Mercaptoetanol _____ 0,4mL
 H₂O Ultrapura _____ 3,0mL

➤ Azul de Bromofenol 5% (Tampão de Corrida)

Bromofenol _____ 0,05g
 H₂O Ultrapura _____ 10mL

➤ Tampão de Corrida

	1x []	10x []
Tis Base _____	3,3g	33g
Glicina _____	14,4g	144g
SDS _____	1,0g	10g
H ₂ O Ultrapura _____	1000mL	1000mL

➤ Solução Fixadora

Ácido Acético Glacial (10% vol.) _____ 50mL
 H₂O Ultrapura _____ 450mL

➤ Cormassie Blue

Metanol (45%) _____ 45mL
 Ác. Acético (10%) _____ 10mL
 Cromassie Blue (0,25%) _____ 0,25g
 H₂O Ultrapura _____ 45mL

➤ Solução Descorante

Álcool Metílico _____ 30% _____ 300mL
 Ácido Acético _____ 10% _____ 100mL
 H₂O Ultrapura _____ 60% _____ 600mL

➤ Solução Conservante

Álcool Etílico PA _____ 10mL
 H₂O Ultrapura _____ 100mL

Programa para corrida do Gel de Poliacrilamida

V= 180v

I= 0,70mA

P= 110W

Corrida do gel por cerca de 120 minutos com o tampão de Glicina 1x [].

5- Gel de Agarose

➤ TEB 10x [] – pH 8,45

Triz Base _____ 107,78g
 Ácido Bórico _____ 55,03g
 EDTA _____ 7,45g
 H₂O Destilada q.s.p. _____ 1000mL

6 – Soluções para a técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunossorbant Assay)

➤ PBS Tween 20 pH 7,4

NaCl _____ 8g
 KH₂PO₄ _____ 0,2g
 Na₂HPO₄ Anidro _____ 1,15g

KCl _____ 0,2g
Tween 20 _____ 0,5mL
H₂O Destilada q.s.p. _____ 1000mL

- Tampão de Adsorção 0,05M – pH 9,6

Na₂CO₃ _____ 1,59g
NaHCO₃ _____ 2,93g
H₂O Destilada _____ 1000mL

- HCl 1M

HCl _____ 8,2mL
H₂O Destilada _____ 100mL

- Se for utilizar substância cromógena (DAB) utilizar estes para revelar:

Ácido Cítrico _____ 2,1g
H₂O Destilada _____ 100mL

- Fosfato

Na₂HPO₄ _____ 2,84g
H₂O Destilada _____ 100mL