

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Programa de Pós-Graduação

Tese

Protocolo de vacinação utilizando vírus recombinantes expressando as
proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *Toxoplasma gondii*

Aluna: Érica Araújo Mendes

Orientador: Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli (Departamento de Bioquímica e
Imunologia/ICB/UFMG, Brasil)

Co-orientadores:

Dra. Bráulia Costa Caetano (Departamento de Medicina, Escola de Medicina da
Universidade de Massachusetts, EUA)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG, Brasil)

Belo Horizonte – MG

2011

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Bioquímica e Imunologia

Protocolo de vacinação utilizando vírus recombinantes expressando as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *Toxoplasma gondii*

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia

Área de concentração: Imunoparasitologia

Aluna: Érica Araújo Mendes

Orientador: Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli

Co-orientadora: Dra. Bráulia Costa Caetano

Co-orientador: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte – MG

Janeiro/2011

À minha família pelo carinho, dedicação e torcida

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Ricardo Tostes Gazzinelli por ter me acolhido em seu laboratório.

À Dra. Bráulia Costa Caetano por todo o auxílio para o desenvolvimento deste trabalho. Mesmo à distância seu apoio foi essencial para a conclusão desta tese.

Ao prof. Flávio Guimarães da Fonseca pelo auxílio com a construção, manutenção e suporte científico para com os MVA recombinantes.

Ao prof. Oscar Bruña-Romero pela disposição em nos ajudar com os adenovírus recombinantes.

Ao Dr. Marcos Penido por sintetizar os peptídeos usados nesse trabalho.

Aos pesquisadores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia/ICB por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos demais pesquisadores do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, os quais contribuíram pra minha formação acadêmica.

Aos demais funcionários do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG pelo suporte dado para o bom andamento de nossa comunidade.

Aos alunos, ex-alunos e funcionários do Laboratório de Imunoparasitologia/ICB pelos bons momentos de descontração, essenciais para o bom andamento de nossa equipe.

Aos alunos de iniciação científica Caroline Araújo, Rodrigo Henrique, Bárbara Casério e Janaína Colina, por todo auxílio e torcida.

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório de Imunopatologia/CPqRR pelo companheirismo durante essa jornada.

Aos funcionários do CPqRR pelo auxílio prestado à realização deste trabalho.

Aos diversos amigos que fiz durante essa jornada, obrigada pela presença e por todo apoio. Sei que todos vocês torceram por mim.

Ao vento, à chuva, à lua, aos anéis de Saturno, às nuvens cor-de-rosa, ao pôr-do-sol, à Anatomia da Dança, ao banquinho verde e seu par de ouvidos atentos...

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad: adenovírus

CEF: cultura primária de fibroblastos de embrião de galinha

CTL: linfócitos T citotóxicos

CDs: células dendríticas

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

GRA2/4: proteínas dos grânulos densos de *T. gondii*

HEK 293A: *Human Embryonic Kidney 293 tipo A*

HIV: vírus da síndrome da imunodeficiência humana adquirida

IFN- γ : interferon gama

IL-1/2/4/6/10/12/15/18: interleucinas 1/2/4/6/10/12/15/18

IP-10: *interferon-inducible protein 10*

MCP-1/2: *monocyte chemotactic protein*

MIC: proteína das micronemas de *T. gondii*

MIP: *macrophage inflammatory protein*

m.o.i: multiplicidade de infecção

MVA: *modified vaccinia virus Ankara*

NK: células *Natural Killer*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

p.f.u.: unidades formadoras de placas de lise

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SAGs: antígenos de superfície de *T. gondii*

T CD4⁺: linfócitos TCD4⁺

T CD8⁺: linfócitos TCD8⁺

TGF- β : fator de crescimento tumoral β

Th1: linfócitos T auxiliares produtores de citocinas pró-inflamatórias

Th2: linfócitos T auxiliares produtores de citocinas anti-inflamatórias

TLA: extrato total de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

TLR: Receptor do Tipo Toll (*Toll like receptor*)

TNF: Fator de Necrose Tumoral

ÍNDICE

ABSTRACT.....	8
RESUMO	9
1. Introdução.....	10
1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose.....	11
1.2. Toxoplasmose congênita	12
1.3. Ciclo de vida <i>T. gondii</i> , prevenção e controle da toxoplasmose.....	13
1.4 Linhagens de <i>T. gondii</i>	16
1.5. Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	16
1.6. Antígenos de superfície e vacinas contra <i>T. gondii</i>	19
1.7. Biologia dos Adenovírus	23
1.8. Adenovírus recombinantes.....	26
1.9. Biologia dos poxvírus.....	28
1.10. Poxvírus como vetores vacinais	31
2. Objetivos.....	33
2.1. Objetivo geral.....	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. Material e métodos	34
3.1. Animais	34
3.2. Cepas de <i>T. gondii</i>	34
3.3. Linhagens celulares	34
3.4. Adenovírus recombinantes.....	35
3.4.1. Purificação e titulação dos adenovírus recombinantes.....	36
3.5. Geração dos MVAs recombinantes com genes SAG1 e SAG2.....	36
3.5.1. Vetores empregados na geração dos MVA recombinantes.....	36
3.5.2. Clonagem dos genes SAG1 e SAG2 no vetor de transferência	37
3.5.3. Protocolo de geração de MVAs recombinantes	40
3.5.4. Seleção dos MVAs recombinantes.....	40
3.5.5. Purificação e titulação dos MVA recombinantes.....	41
3.6. Experimentos de vacinação e desafio	42
3.7. Western-Blot.....	44
3.8. ELISA	45
3.9. Peptídeos Sintéticos	46
3.10. ELISPOT	46

3.11. Ensaio de estimulação de esplenócitos <i>in vitro</i> para dosagem de citocinas.....	47
3.12. Análise estatística.....	47
4. Resultados.....	48
4.1. Protocolo de vacinação homólogo com AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3	48
4.1.1. Resposta imune humoral após vacinação: produção de IgGs anti-SAG.....	48
4.1.2. Resposta imune celular após a vacinação: produção de citocinas Th1 x Th2.....	51
4.1.3. Mapeamento de epítomos restritos a MHCI nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3	53
4.1.4. Resposta imune celular após vacinação: identificação de linfócitos T CD8 ⁺ específicos.....	53
4.1.5. Avaliação da proteção de animais vacinados: proteção contra desafio com <i>T. gondii</i>	54
4.1.6. Avaliação do papel dos linfócitos T CD8 ⁺ e do IFN- γ na proteção de camundongos imunizados com AdSAG1	57
4.1.7. Avaliação dos mecanismos de resposta imune inata envolvidos na ativação dos linfócitos TCD8 ⁺ e na produção de IFN- γ na vacinação com AdSAG1	59
4.2. Protocolo de vacinação heterólogo.....	60
4.2.1. Geração dos MVAs recombinantes com genes SAG1 e SAG2 de <i>T. gondii</i>	60
4.2.2. Protocolo de vacinação heterólogo: resposta imune humoral dos animais imunizados	64
4.2.3. Protocolo de vacinação heterólogo: resposta imune celular dos animais imunizados.....	64
4.2.4. Protocolo de vacinação heterólogo: ensaio de proteção de camundongos imunizados	66
4.2.5. Protocolo de vacinação heterólogo: vacinação com vetores virais recombinantes contendo o gene SAG2.....	66
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	81
7. Referências bibliográficas.....	82
8. ANEXOS.....	99

ABSTRACT

In this study we evaluated the ability of recombinant adenoviruses (rAd) encoding the antigens SAG1, SAG2 and SAG3 from *Toxoplasma gondii* (AdSAG1, AdSAG2 and AdSAG3, respectively) to induce immune responses and protection against the parasite. C57BL/6 mice received two doses of AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 or a control adenovirus (AdCTRL). The production of anti-SAG specific antibodies, as well as activation of T cells able to recognize those antigens were evaluated after vaccination. Each rAd elicited production of IgG antibodies specific against the SAG that they encode. On the other hand, only AdSAG1 led to significant activation of IFN- γ producing T cells, which responded *in vitro* to a *T. gondii* antigen extract and to a T CD8⁺ epitope (TPTENFTL) identified in the sequence of SAG1 protein. Vaccinated animals were challenged with a cystogenic strain of *T. gondii* for evaluation of survival and parasite load in brains. Only AdSAG1-immunized groups showed significant survival and reduction in brain cyst numbers. In vaccination experiments performed with T CD8⁺ cell-deficient mice, it was demonstrated that activation of IFN- γ producing T CD8⁺ cells specific to SAG1 is one of the protection mechanisms induced by AdSAG1. In a similar approach, by vaccinating MyD88 and IL-12 deficient mice with AdSAG1, we identified innate immune mechanisms activated *in vivo* by that rAd, which are involved in the differentiation of anti-SAG1 specific T lymphocytes into IFN- γ secreting cells and that contribute to the immunogenicity and protective properties of AdSAG1. To enhance the level of protection obtained with the homologous vaccination protocol (two doses of rAd), we constructed recombinant modified vaccinia virus Ankara (rMVA) encoding SAG1 and SAG2 to be used as boost dose after prime immunization with rAds, in a heterologous vaccination protocol. Again, protection was observed only after vaccination with viral vectors encoding SAG1, with a tendency to enhanced survival levels in groups of animals vaccinated according to the heterologous protocol (AdSAG1 + MVASAG1) in comparison to those groups that received homologous vaccination (two AdSAG1 doses). As for the parasite load, it was observed a significant difference between the two vaccination protocols, with the heterologous protocol providing a higher amount of reduction in brain cyst numbers. Altogether, the results indicate that the use of recombinant viral vectors is a useful approach for the development of immunization protocols against *T. gondii*.

RESUMO

No presente estudo, avaliamos a capacidade de adenovírus recombinantes (rAd) codificando os antígenos SAG1, SAG2 e SAG3 de *Toxoplasma gondii* (AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3, respectivamente) em induzir resposta imune e proteção contra o parasita. Camundongos C57BL/6 receberam duas doses de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou de um adenovírus controle (AdCTRL). A produção de anticorpos específicos anti-SAG, bem como a ativação de linfócitos T capazes de reconhecer esses antígenos foram avaliadas após a vacinação. Cada rAd induziu a produção de IgG específica contra a SAG que codifica. Por outro lado, apenas o AdSAG1 levou a ativação significativa de linfócitos T produtores de IFN- γ , os quais responderam *in vitro* a um extrato de antígenos de *T. gondii* e a um epítipo de células T CD8⁺ (TPTENFTL) identificado na seqüência da proteína SAG1. Os animais vacinados foram desafiados com uma cepa cistogênica de *T. gondii*, para avaliação da mortalidade e da carga parasitária cerebral. Apenas grupos imunizados com AdSAG1 apresentaram sobrevivência e redução no número de cistos cerebrais em níveis significativos. Em experimentos de vacinação de animais deficientes em células T CD8⁺ com AdSAG1 ficou demonstrado que a ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ específicas contra SAG1 é um dos mecanismos de proteção induzidos por aquele rAd. Da mesma forma, por meio da vacinação de animais deficientes em MyD88 e IL-12, identificamos mecanismos de resposta imune inata ativados por AdSAG1 *in vivo*, os quais estão envolvidos na diferenciação de linfócitos T anti-SAG1 em células produtoras de IFN- γ e contribuem para a imunogenicidade e capacidade protetora do AdSAG1. Para melhorar o nível de proteção obtido com o protocolo de imunização homólogo (duas doses de rAd), foram construídos vírus vaccinia Ankara modificados recombinantes (rMVA) codificando os antígenos SAG1 ou SAG2 para serem utilizados como dose de reforço após primoinmunização com rAd, num protocolo heterólogo de imunização. Novamente, foi observada proteção apenas na imunização com vetores virais codificando SAG1, sendo que houve tendência no aumento da sobrevivência dos animais vacinados de acordo com o protocolo heterólogo (AdSAG1 + MVASAG1) em comparação com aqueles que receberam a imunização homóloga (duas doses de AdSAG1). Quanto à carga de parasitas, foi observada diferença significativa entre os protocolos de imunização, com o heterólogo proporcionando maior redução no número de cistos cerebrais. Esses resultados indicam que a utilização de vetores virais recombinantes é uma abordagem viável para o desenvolvimento de protocolos de imunização contra o parasita *T. gondii*.

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa que foi identificado pela primeira vez em um pequeno roedor norte-africano, popularmente chamado de gondi (*Ctenodactylus gundii*). A identificação, feita por Nicolle e Manceaux em 1908, teve lugar no Instituto Pasteur da Tunísia e, no mesmo ano, o parasita foi isolado de coelhos mantidos no Instituto Biológico de São Paulo, Brasil (Kim and Weiss, 2008).

A toxoplasmose causada pelo parasita *Toxoplasma gondii* é uma das infestações parasíticas mais comuns em humanos e em animais de sangue quente. Esse protozoário encontra-se distribuído mundialmente, existindo estimativas de que aproximadamente um terço da população global esteja cronicamente infectada pelo mesmo (Darde, 2004). Apesar da alta taxa de infecção dentro da população humana, a manifestação de sinais clínicos da doença é um fato raro em indivíduos saudáveis. A forma severa da doença aparece em indivíduos imunossuprimidos e também em recém-nascidos que são infectados por via congênita ou durante a fase pré-natal (Elmore et al., 2010). Um grande espectro de manifestações clínicas ocorre nos indivíduos desse último grupo, incluindo calcificações intracranianas, encefalomielite, convulsões, hidrocefalia e retinocoroidite (Dubey, 2004). Devido ao fato do tratamento dos pacientes com toxoplasmose ser difícil, levando em consideração que as drogas disponíveis são tóxicas, e já que a reativação da infecção latente ocorre rapidamente em caso de imunossupressão, o desenvolvimento de novas drogas ou de uma vacina é uma alternativa bastante atraente para o combate da doença.

Além do aspecto médico, a doença também se destaca como uma parasitose veterinária importante. Anualmente, rebanhos de suínos e ovinos sofrem perdas significativas devido a mortes neonatais e abortos (Dubey, 2009). Ainda mais, quando ingeridas cruas ou mal passadas, vísceras e carne de animais domésticos contaminadas pelo parasita são importantes fontes de infecção, tanto para humanos quanto para outros carnívoros. Já foi demonstrada, por exemplo, estreita relação entre infecções nos rebanhos e a ocorrência de casos isolados ou surtos de toxoplasmose humana (Innes, 2010; Innes et al., 2009).

As medidas para prevenção da infecção pelo *T. gondii* não têm sido suficientes para evitar a ocorrência da toxoplasmose. Além do mais, não existe um medicamento eficaz contra a fase crônica da doença, já que as drogas disponíveis são capazes de atuar

somente contra as formas proliferativas do parasita. Outros fatores também têm restringido a quantidade de drogas disponíveis para o tratamento, como o fato delas apresentarem-se tóxicas com o uso prolongado. Dessa forma, a utilização de vacinas antitoxoplasmose se constitui em uma alternativa importante para o controle da doença (Jenkins, 2001). O desenvolvimento de imunidade prévia à infecção com o *T. gondii* impediria a liberação dos oocistos pelos felinos, preveniria a formação de cistos teciduais na carne dos animais de abate e sua transmissão por via oral, evitando assim, o desenvolvimento de um estado de portador assintomático passível de reagudização nos humanos. Uma vacina também poderia impedir a toxoplasmose aguda em mulheres gestantes e em fêmeas prenhes de rebanhos de produção, impedindo a transmissão transplacentária do parasita e suas sérias conseqüências (Innes, 2010). Nesse contexto, levando-se em consideração a eficiência dos vetores virais adenovírus humano do tipo 5 e do vírus vaccínia Ankara modificado (MVA) recombinantes, assim como as propriedades dos antígenos de superfície de parasita *T. gondii*, acreditamos ser relevante a avaliação de protocolos de imunização dose-reforço utilizando esses vetores codificando antígenos de superfície do parasita em modelo animal. Com isso, esperamos contribuir para o futuro desenvolvimento de uma vacina para ser usada em humanos e que seja capaz de combater eficientemente à infecção pelo *T. gondii*.

1.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da toxoplasmose

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns em várias regiões do mundo. A soroprevalência da doença dentre humanos varia muito entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas dentro do mesmo país e entre diversos grupos étnicos da mesma área (Tenter et al., 2000). No Brasil, a prevalência de infecção por *T. gondii* varia de 40 a 80%, com as taxas mais altas ocorrendo em alguns estados do Norte e do Sul, e os valores mais baixos em estados do Sudeste (Orefice and Bonfioli, 2000). Um estudo epidemiológico realizado em Recife demonstrou um percentual de soropositivos de 79,0% para os homens e 63,4% para as mulheres. Esse estudo também demonstrou que a soropositividade aumentou com a idade, variando de 18,2% para os indivíduos menores de 20 anos até 92,6% para aqueles entre 40 e 50 anos de idade. Para as mulheres na idade fértil (18-40 anos) foi encontrada prevalência de 51,6% (Coelho et al., 2003). Em outro estudo conduzido no Rio Grande do Sul com 2.126 mulheres com idade entre 12 e 48 anos observou-se uma prevalência de 74,5% de soropositividade dentre as gestantes (Spalding et al., 2005). Já no Paraná, a soropositividade dentre as mulheres analisadas foi de 49,2%, sendo 1,2% desse percentual de mulheres grávidas (Lopes et al., 2009).

Apesar da alta frequência de infecção dentro das populações humanas, a ocorrência de sinais clínicos de toxoplasmose é baixa, já que a infecção adquirida (pós-natal) em indivíduos imunologicamente competentes leva ao desenvolvimento de uma forte resposta imune celular, a qual resulta no controle eficaz do parasita, no entanto o parasita permanece alojado no organismo do indivíduo sob a forma de cistos sem ocasionar sinais clínicos da doença. Infecções sintomáticas usualmente se caracterizam por linfadenite, a qual pode estar associada com febre, fadiga, fraqueza, dor de cabeça (Dubey, 2004). No entanto, a doença também pode se manifestar sob a forma ocular como resultado de infecção aguda ou reativação da infecção crônica (Mets et al., 1996). A toxoplasmose adquirida tem maior impacto para indivíduos com comprometimento do sistema imune. Nesses indivíduos, quadros de imunossupressão e imunodeficiência moderadas ou extremas podem levar a reativação da infecção latente. Casos de reativação da infecção em pacientes transplantados têm se tornado cada vez mais frequentes, sendo a fonte de re-infecção tecidos do doador ou tecidos do próprio paciente, nos quais se encontram cistos dormentes (de Medeiros et al., 2001). A toxoplasmose também tem emergido nas duas últimas décadas como uma das mais comuns infecções oportunistas associadas com a AIDS, sendo a causa mais comum de morte dentre esses pacientes devido ao quadro de encefalite gerado pela doença (Dubey, 2004). Estima-se que 40% dos pacientes aidsícos desenvolvem encefalite por toxoplasma, sendo que 10 a 30% morrem em decorrência desta patologia (Ferreira and Borges, 2002; Luft and Remington, 1992).

1.2. Toxoplasmose congênita

As maiores complicações da toxoplasmose decorrem da infecção congênita ou pré-natal. A transmissão transplacentária ocorre normalmente em casos de primo-infecção ou toxoplasmose aguda durante a gestação. Se a infecção primária se der antes da gravidez, a imunidade adquirida impede a transmissão do parasita ao feto em exposições subseqüentes. No entanto, se a gestante sofre um comprometimento da função imune e reativação da toxoplasmose crônica, também pode infectar o feto (Tenter et al., 2000). Os sintomas da infecção do feto variam conforme a virulência da cepa e o período da gestação no qual a transmissão ocorre. Infecções no primeiro trimestre de gestação podem levar a abortamento ou anormalidades fetais que reduzem significativamente a qualidade de vida da criança que sobrevive (Montoya and Liesenfeld, 2004), tais como encefalite, retinocoroidite, calcificações intracranianas, hepatoesplenomegalia e hidrocefalia (Kravetz and Federman, 2005). Essa última é uma lesão menos comum, mas é a mais dramática lesão causada pela

toxoplasmose, sendo essa condição exclusiva de humanos (Dubey, 2004). Quando a infecção do feto ocorre nos estágios finais da gravidez, os efeitos da doença são menos graves, com a maioria dos neonatos sendo assintomáticos. Entretanto, essas crianças podem desenvolver problemas como estrabismo, cegueira, surdez, deficiências psicomotoras, convulsões e retardamento no desenvolvimento mental (Ferguson, 2009; Kravetz and Federman, 2005).

Como as infecções de pacientes imunocompetentes geralmente são assintomáticas, o diagnóstico de infecção materna normalmente é feito por meio de detecção de IgA, IgG ou IgM anti-*T. gondii* em testes de imunofluorescência, ELISA ou reação de aglutinação - ISAGA-IgM (Araujo and Ferreira, 2008). No caso de diagnóstico positivo de infecção materna aguda, deve-se proceder a detecção de infecção fetal. A avaliação ultra-sonográfica do feto, apesar de ser o ponto de partida, indica apenas infecções avançadas. O ideal é proceder-se à detecção do DNA do parasita no líquido amniótico, por meio de reações de amplificação em cadeia de polimerase (PCR) (Montoya and Liesenfeld, 2004; Mussi-Pinhata and Yamamoto, 1999). O tratamento da gestante é realizado com espiramicina ou, se a transmissão para o feto for confirmada, com pirimetamina e sulfadiazina (Couvreur et al., 1993).

1.3. Ciclo de vida *T. gondii*, prevenção e controle da toxoplasmose

O ciclo biológico do *T. gondii* (figura 1) caracteriza-se por ser heteroxeno facultativo. Apesar da ampla diversidade de hospedeiros do *T. gondii*, apenas os felídeos desenvolvem a fase sexuada do ciclo, o que leva à descrição desses mamíferos como hospedeiros definitivos do agente. O homem e outros mamíferos, juntamente com as aves, são considerados hospedeiros intermediários, pois nesses ocorre somente desenvolvimento do ciclo assexuado do parasita (Dubey, 2004; Innes, 2010).

Nos hospedeiros, tanto intermediários quanto definitivos, a infecção pelo *T. gondii* é seguida de uma rápida multiplicação de taquizoítos (forma assexuada de multiplicação rápida), os quais são liberados após a ruptura da célula infectada. Esses podem infectar qualquer célula nucleada e são altamente patogênicos disseminando-se, preferencialmente, para as células do sistema nervoso central, olho, músculos esqueléticos e músculo cardíaco, levando a lesões teciduais e desenvolvimento da toxoplasmose aguda. A multiplicação dos taquizoítos é controlada pelo desenvolvimento de uma resposta imune protetora eficaz, e é seguida pela diferenciação do parasita em bradizoíto, formas de multiplicação lenta de *T. gondii*, o que resulta na formação de cistos teciduais e estabelecimento da fase crônica da

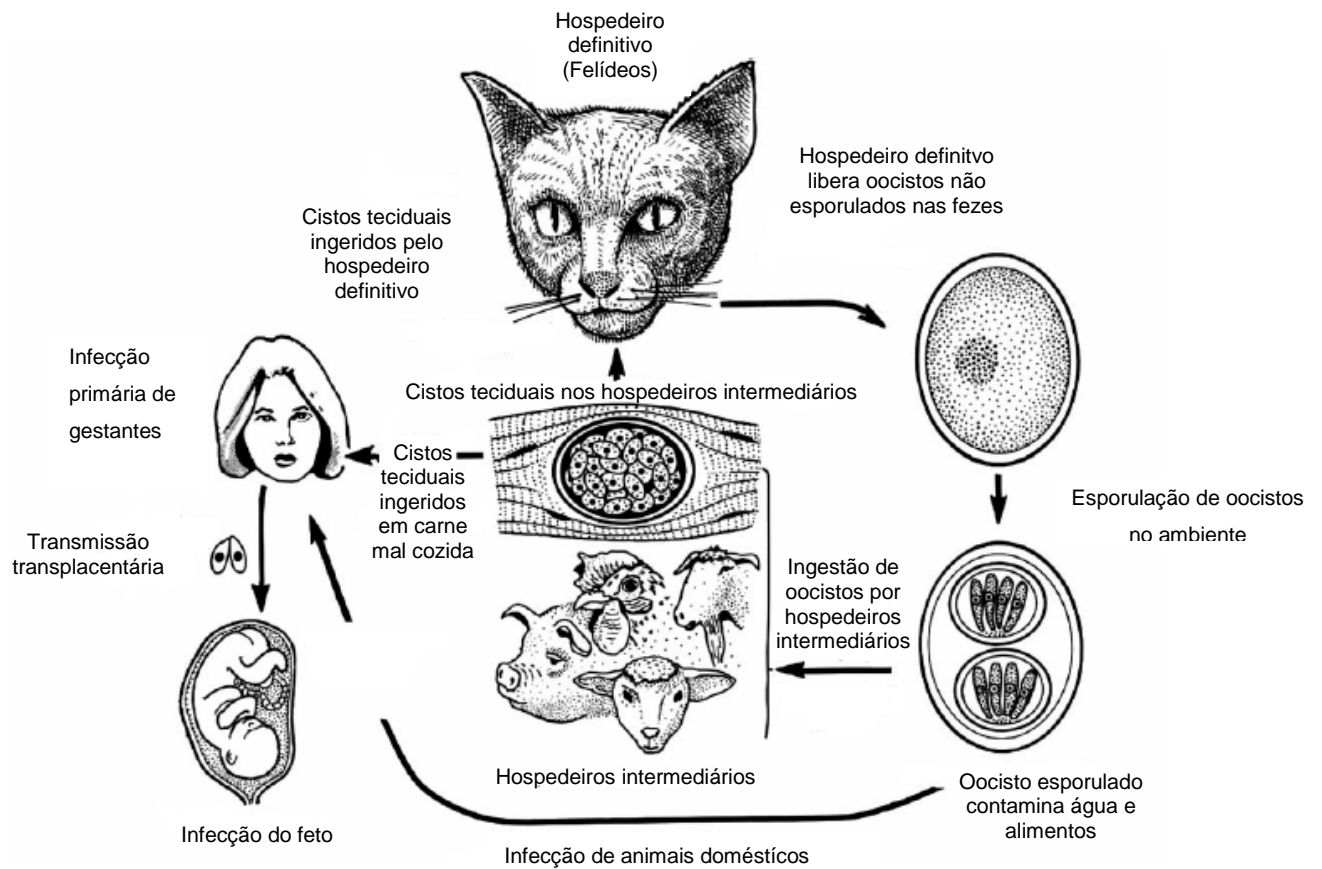


Figura 1 – Ciclo do *Toxoplasma gondii* (adaptado de Dubey, 2004).

doença (Dubey et al., 1998; Tenter et al., 2000).

Nos hospedeiros definitivos, especialmente nos jovens não imunes ao parasita, ocorre o desenvolvimento da fase sexuada do ciclo. Ela começa com a infecção de células epiteliais do intestino delgado por taquizoítos, esporozoítos ou bradizoítos. A multiplicação desses estágios origina os merozoítos que ficam contidos dentro de estruturas chamadas de esquizontes. Após alguns ciclos de replicação, os merozoítos se diferenciam em gametas masculinos (microgametas) e gametas femininos (macrogametas). A fertilização, a formação do zigoto e a organização da parede do oocisto ocorrem no epitélio intestinal. Os oocistos são liberados no meio ambiente juntamente com as fezes dos animais e, sob condições apropriadas de temperatura e umidade, sofrem o processo de esporulação, quando se tornam infectantes. Uma vez esporulado, o oocisto permanece no ambiente como fonte de infecção para outros indivíduos (Dubey et al., 1998).

A infecção pós-natal em humanos ocorre essencialmente de três maneiras: pela ingestão acidental de oocistos liberados nas fezes de felinos domésticos e selvagens, os quais podem contaminar água e alimentos; através da ingestão de cistos presentes em carne mal cozida - o cozimento em temperaturas superiores a 67°C ou o congelamento em temperaturas inferiores a -13°C mata os bradizoítos presentes nos cistos e elimina o risco desse modo de contaminação – e, mais raramente, através de transplantes ou transfusões sanguíneas (Hide et al., 2009; Kravetz and Federman, 2005).

Atualmente, a prevenção e o controle da toxoplasmose adquirida dependem de medidas de vigilância epidemiológica e manejo sanitário voltadas para identificação e eliminação das fontes de infecção, tais como controle da população de gatos de rua. As recomendações para controle da transmissão dentro do ambiente doméstico incluem: prevenção do consumo de carne mal passada; limpeza freqüente das caixas de areia de gatos domésticos (usando proteção para as mãos e detergentes apropriados e/ou água fervente); descarte das fezes e das camas de areia dos felinos de maneira adequada; uso de ração industrializada e água tratada na alimentação dos animais; prevenção do hábito da caça por parte de gatos domésticos, para evitar que os mesmos se alimentem com presas infectadas com cistos. Finalmente, a prevenção de toxoplasmose congênita depende de exame pré-natal e tratamento das gestantes que apresentam soroconversão (Dabritz and Conrad, 2010). Essas ações visam principalmente diminuir a exposição dos grupos de risco, como o das mulheres em idade fértil e o dos pacientes imunocomprometidos (Bojar and Szymanska, 2010; Lago et al., 2009).

1.4. Linhagens de *T. gondii*

Estudos realizados na América do Norte e Europa demonstraram que *T. gondii* apresenta uma estrutura populacional altamente clonal. Com base em análises de perfil de isoenzimas e de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), nessas regiões as linhagens do parasita foram classificadas em três populações clonais designadas como tipo I, II e III, que apresentam alta similaridade, mas que diferem geneticamente em uma taxa de aproximadamente 1% genes (Howe et al., 1997; Howe and Sibley, 1995). Estudos recentes realizados na África sugerem a mesma distribuição clonal nessa região (Velmurugan et al., 2008). Já no Brasil, os isolados de *T. gondii* apresentam alta variabilidade genética, sendo a distribuição da população de parasitas denominada não clonal (Ferreira Ade et al., 2006; Pena et al., 2007).

As três linhagens clonais de *T. gondii* diferem na virulência em modelos animais e nos padrões epidemiológicos de ocorrência. Linhagens do tipo I (RH) são altamente virulentas para camundongos e humanos, enquanto as linhagens do tipo II (ME49) e do tipo III (CEP e VEG) são consideradas moderadamente virulentas (Howe and Sibley, 1995). Em geral, as linhagens do tipo II e III são cistogênicas, enquanto as linhagens tipo I têm uma capacidade bem reduzida de formar cistos em cultura de células ou em animais infectados (Saeij et al., 2005; Switaj et al., 2005).

Das linhagens isoladas de pacientes infectados cronicamente, linhagens do tipo II são encontradas comumente em pacientes norte-americanos e europeus, enquanto que linhagens do tipo I parecem ser mais freqüentes entre os pacientes da América do Sul, sendo associadas a quadros de toxoplasmose congênita ou ocular (Resende et al., 2008b). Estudos em gatos (Pena et al., 2006) e galinhas caipiras (Dubey et al., 2005; Dubey et al., 2002) da América do Sul mostrando a predominância dos tipos I e III e ausência do tipo II, em contraste à grande predominância de linhagens do tipo II em países da América do Norte.

1.5. Resposta imune contra *T. gondii*

Tipicamente, infecções pelo parasita *T. gondii* induzem uma rápida resposta imune com perfil pró-inflamatório, a qual é necessária para sobrevivência do hospedeiro, mas que também garante a persistência do parasita. Essa resposta recruta uma ampla gama de células, tais como linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos, células dendríticas (CDs) e células *natural killer* (NK) (Miller et al., 2009). Uma característica marcante da resposta anti-

T. gondii é que praticamente não existe imunopatologia associada à mesma em indivíduos imunocompetentes, sendo os sintomas mais comuns febre e linfadenopatia (Denkers and Gazzinelli, 1998).

Os linfócitos T CD8⁺ são considerados os efetores mais importantes na proteção contra *T. gondii* (Bhadra et al., 2010; Jordan and Hunter, 2010). Essas células contribuem para a produção de interferon gama (IFN- γ) e atuam prevenindo a reativação da infecção crônica eliminando cistos teciduais através de sua atividade citotóxica mediada por perforina (Suzuki et al., 2010). As células T CD4⁺ também assumem um importante papel contra essa parasitose (Johnson and Sayles, 2002). Essas cooperam na produção de IFN- γ e auxiliam na proliferação e ativação de células T CD8⁺ através da produção de Interleucina (IL) 2, um mitógeno importante para células T, e indução da expressão de moléculas co-estimuladoras (Tait and Hunter, 2009). Reações pró-inflamatórias dependentes de IFN- γ são essenciais para a resistência contra taquizoítos durante a fase aguda da infecção (Lykens et al., 2010), além de impedirem a reativação dos cistos teciduais durante a fase crônica (Miller et al., 2009). IFN- γ produzido em resposta ao parasita atua em macrófagos e CDs, aumentando a capacidade microbicida e de síntese de IL-12 dessas células (Gazzinelli et al., 1994). Ainda, IFN- γ ativa a síntese de quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T; atua como um co-fator da IL-12 na diferenciação de células Th0 em células efetoras Th1 (Gazzinelli et al., 1996); induz a expressão de receptores de IL-12 em células T (Seder et al., 1993) e aumenta a expressão de moléculas de classe I do Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC) em células infectadas, favorecendo o reconhecimento pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) (Denkers and Gazzinelli, 1998). Além disso, IFN- γ também ativa a síntese de TNF por macrófagos. TNF atua sinergisticamente com IFN- γ induzindo a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, linfócitos, células NK e neutrófilos. Esse é gerado durante o metabolismo da L-arginina pela ação da óxido nítrico sintase do tipo 2. NO pode matar diretamente o parasita, inibindo enzimas mitocondriais e nucleares, atuando tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção pelo *T. gondii* (Miller et al., 2009).

Na medida em que a resposta imune se desenvolve, ocorre a eliminação dos taquizoítos, aparecimento de bradizoítos e formação de cistos teciduais. Alguns trabalhos preconizam que, na transição da fase aguda para a fase crônica da toxoplasmose, a resposta imune induz ativamente a transformação do taquizoíto em bradizoíto. Uma segunda hipótese sugere que a resposta imune controla a multiplicação do taquizoíto, mas não tem efeito sobre o bradizoíto, que é essencialmente inócuo ao hospedeiro. De qualquer forma,

na fase crônica, os níveis de citocinas inflamatórias caem e a manutenção do controle da infecção passa a depender do desenvolvimento de imunidade adquirida, com ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas, as quais exercem importante papel no controle dos cistos teciduais (Miller et al., 2009). A evidência mais marcante da importância das células T para controle da infecção crônica é o fato que, nos pacientes imunossuprimidos, cujo número de linfócitos T se encontra reduzido, ocorre reativação de cistos teciduais e infecção aguda (Montoya and Liesenfeld, 2004).

Além da resposta imune celular é importante ressaltar a resposta imune inata inespecífica contra o parasita, que é ativada principalmente durante as fases iniciais da infecção. Isso é evidenciado pelo fato de que a infecção pelo *T. gondii* limita a co-infecção com outros patógenos, tais como *Schistosoma mansoni* (Mahmoud et al., 1976) e *Leishmania major* (Santiago et al., 1999). A resposta inata é caracterizada pela produção de IL-12, Fator de Necrose Tumoral (TNF), IL-15 e IL-18 por CDs e macrófagos, e pela produção de IFN- γ dependente de IL-12 por células NK, embora as CDs, incluindo as convencionais CD8⁺ e as CDs plasmocitóides sejam as maiores fontes dessa citocina (Tait and Hunter, 2009). A produção de IL-12 pelas células dendríticas é uma etapa crucial para desencadeamento da resposta adquirida, pois ela é acompanhada da ativação da capacidade de apresentação de antígenos e moléculas co-estimuladoras pelas próprias CDs, que conduzem a diferenciação dos linfócitos T específicos a um perfil Th1 produtor de IL-2 e IFN- γ , citocinas essas críticas para a sobrevivência do hospedeiro (Yarovinsky and Sher, 2006). Estudos realizados *in vitro* com células de camundongo indicam o que o Receptor do Tipo Toll (TLR, do inglês *Toll Like Receptor*) 11, que se liga a profilina de *T. gondii*, seja um dos principais receptores inatos responsáveis pela ativação das CDs. No entanto, outros receptores como o TLR2, cujos ligantes na superfície do *T. gondii* seriam as âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), parecem exercer papel coadjuvante na produção de IL-12 (Debierre-Grockiego et al., 2007; Yarovinsky and Sher, 2006; Yarovinsky et al., 2005). O papel da precoce ativação dessa resposta relaciona-se com a necessidade do organismo de limitar a replicação de taquizoítos, além de direcionar o adequado desenvolvimento da resposta adquirida, levando a diferenciação de células precursoras Th0 em células Th1 efetoras (Combe et al., 2005).

Enquanto a produção de citocinas pró-inflamatórias e de NO é requerida para o controle da toxoplasmose, a excessiva produção dessas moléculas microbidas pode gerar danos imunopatológicos graves e até mesmo levar o indivíduo a morte. Dessa maneira, ao

mesmo tempo em que o contato do organismo com o parasita leva a uma alta produção de citocinas pró-inflamatórias tipo 1, desenvolve-se também uma resposta do tipo 2, caracterizada pela produção de IL-4, além da produção de citocinas regulatórias como IL-10 e TGF- β , as quais regulam a expressão e função das citocinas pró-inflamatórias do tipo 1 (Gazzinelli et al., 1996). Porém, ao mesmo tempo em que citocinas com perfil 2 evitam danos ao organismo, elas também beneficiam o parasita, permitindo a persistência do mesmo e o estabelecimento de uma infecção crônica. Com isso, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de se entender melhor os circuitos das citocinas produzidas durante a infecção pelo *T. gondii*, assim como suas populações celulares alvo, visando ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle do parasita. IL-10 é uma citocina que atua inibindo a síntese de IL-12 e TNF por células apresentadoras de antígenos e a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos Th1 (Butcher et al., 2005; O'Garra and Vieira, 2007). Foi demonstrado, por exemplo, que ela é requerida para a prevenção da mortalidade e necrose no intestino delgado de camundongos, tanto de BALB/c resistentes quanto de camundongos C57BL/6 susceptíveis, após infecção oral com a cepa ME49 (Suzuki et al., 2000). O papel da citocina IL-4 em modelos murinos de infecção pelo *T. gondii* é o de potencializar os efeitos da IL-10 sobre macrófagos e induzir a diferenciação de precursores Th0 em células efetoras com perfil Th2, já o TGF- β potencializa os efeitos da IL-10 em macrófagos, inibe a síntese do IFN- γ em células NK e interfere na diferenciação dos linfócitos precursores (Denkers, 1999; Denkers and Gazzinelli, 1998; Swain et al., 1990).

1.6. Antígenos de superfície e vacinas contra *T. gondii*

O fato de que indivíduos naturalmente infectados com *T. gondii* desenvolvem uma resposta imune longa e duradoura, que mantém o parasita sob controle e impede reinfecções, é o melhor indicativo de que o desenvolvimento de uma vacina para controle da toxoplasmose é viável (Kur et al., 2009). Muitas formas de imunização contra toxoplasmose têm sido testadas e algumas vacinas baseadas em cepas atenuadas chegaram a ser licenciadas para uso veterinário. Esse é o caso da “Toxovax”, uma vacina comercial desenvolvida na Nova Zelândia contendo taquizoítos da cepa S48 de *T. gondii*, os quais são incapazes de gerar cistos teciduais. Essa vacina confere imunidade que, a despeito de ter curta durabilidade, é capaz de evitar a transmissão congênita do parasita e conseqüente abortamento em ovinos (Buxton and Innes, 1995). O uso de vacinas baseadas em cepas atenuadas, tais como a “Toxovax”, em humanos é improvável, dado o fato de que os

taquizoítos presentes em sua composição estão vivos e podem estabelecer infecções crônicas ou reverter a um estado patogênico e causar doença aguda (Kur et al., 2009). Devido a esse fato, as pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose concentram-se na identificação de componentes do parasita com propriedades imunogênicas e delineamento de protocolos de imunização que utilizem esses componentes em vacinas denominadas de subunidades (Frickel et al., 2008; Mishima et al., 2001).

Nos últimos anos tem havido progresso considerável na tentativa de se identificar antígenos candidatos, capazes de gerar resposta imune protetora, para o desenvolvimento de uma vacina. Muitos desses trabalhos têm como foco antígenos de superfície dos taquizoítos, denominados SAGs (Jongert et al., 2009). Estas proteínas, juntamente com as SRSs (do inglês *SAG-Related Sequences*) compõem uma família de antígenos, dentre os quais SAG1, SAG2 e SAG3 se destacam como os mais abundantemente expressos na superfície de taquizoítos (Lekutis et al., 2001; Manger et al., 1998). As SAGs 1, 2 e 3 são reconhecidas por soros humanos e animais, sendo amplamente utilizadas em ensaios de imunodiagnóstico da doença e para caracterização das cepas de *T. gondii* (Howe et al., 1997). Além disso, diversas proteínas secretórias associadas ao processo de invasão da célula hospedeira têm sido identificadas e relacionadas com a estimulação da resposta imune do hospedeiro, tais como proteínas de micronemas (MIC), roptrias (ROP) e grânulos densos (GRA) (Desolme et al., 2000; Lourenco et al., 2006; Martin et al., 2004). Alguns antígenos associados aos bradizoítos também têm sido identificados, tais como o antígeno BAG e o antígeno MAG1, que é secretado pela matriz do cisto e é reconhecido por soros imunes do hospedeiro (Kur et al., 2009).

As SAGs possuem um peptídeo N-terminal de endereçamento para o retículo endoplasmático, além de uma extremidade C terminal hidrofóbica com um motivo de adição de âncora de GPI para ligação à membrana celular (Boothroyd et al., 1998). A proteína SAG1, o antígeno de membrana imunodominante em taquizoítos, apresenta peso molecular de aproximadamente 30kD; SAG3, a terceira proteína de membrana mais abundante do parasita, apresenta peso molecular de 43Kd. SAG1 e SAG3 possuem homologia em 24% de seus aminoácidos, inclusive na conservação de todos os resíduos de cisteína nas proteínas maduras e uma similaridade nas estruturas secundárias e terciárias (Boothroyd et al., 1998). Acredita-se que essas proteínas atuem interagindo com a superfície da célula hospedeira, servindo como mediadora do processo de adesão e/ou invasão (Kasper and Mineo, 1994). Anticorpos monoclonais dirigidos contra SAG1 inibem a infecção de fibroblastos humanos e

enterócitos murinos em cultura (Mineo and Kasper, 1994). A deleção do gene SAG3 reduz a capacidade de adesão e invasão celular de taquizoítos da cepa RH, sendo esse fenômeno revertido através de complementação gênica. Além disso, os taquizoítos com gene SAG3 deletado são marcadamente menos virulentos para camundongos que os parasitas do tipo selvagem, ou aqueles complementados com SAG3 (Dzierszinski et al., 2000). A proteína SAG2, com cerca de 22Kd, é a segunda mais abundante na superfície dos taquizoítos de *T. gondii*, sendo observado somente nessa fase do ciclo de vida do parasita. A função de SAG2 ainda não foi descrita, mas especula-se que ela esteja envolvida com o processo de adesão/penetração na célula hospedeira, agindo sinergicamente com as SAG1/3 (Parmley et al., 1994).

O potencial imunogênico das SAGs, especialmente da SAG1, foi previamente demonstrado em diversos modelos de vacinação contra *T. gondii*. Em um estudo, a imunização com a proteína SAG1 recombinante (SAG1r) pura ou em combinação com alumínio induziu resposta do tipo Th2, com produção de anticorpos IgG1. Essa formulação foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos camundongos após desafio com a cepa RH (Petersen et al., 1998). Letscher-Bru e colaboradores (Letscher-Bru et al., 1998) mostraram que a associação da SAG1r com IL-12 recombinante (IL-12r) alterou o perfil da resposta imune para um tipo Th1, o que proporcionou proteção contra a formação de cistos cerebrais. A SAG1r também foi testada em associação com a toxina da cólera (CT), enterotoxina lábil (LT) e dois de seus derivados não tóxicos (LTR72 e LTK63) em esquemas de imunização intranasal em camundongos. Nesses experimentos foram observadas ativação de resposta celular local (linfonodos mesentéricos) e sistêmica (baço), com produção de IFN- γ , IL-5, IL-2, IgG2a, IgG2b (soro) e IgA (lavado nasal, pulmonar e intestinal) e redução significativa na carga de cistos cerebrais nos animais vacinados (Bonenfant et al., 2001; Debard et al., 1996).

Proteção contra o desafio letal com a cepa RH em camundongos C3H e BALB/c, bem como prevenção da formação de cistos cerebrais em BALB/c desafiados com a cepa Beverley foram demonstradas com a imunização com plasmídeo contendo o gene SAG1 (Couper et al., 2003; Nielsen et al., 1999). SAG1 clonada em plasmídeo em associação com ROP2 foi capaz de prolongar a sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio com a cepa RH. A co-administração de IL-12r murina como adjuvante aumentou mais ainda os níveis de resposta imune celular e humoral (Zhang et al., 2007). Resultados semelhantes foram obtidos por Wang e colaboradores em 2009 (Wang et al., 2009), os quais imunizaram

camundongos BALB/c por via intranasal com um plasmídeo codificando SAG1 e MIC4 em associação ou não com toxina da cólera A2/B. Nesse trabalho, os melhores níveis de resposta imune e sobrevivência pós-desafio também foram obtidos com as formulações contendo o adjuvante.

Jongert e colaboradores (2008) testaram um protocolo de imunização em camundongos Swiss com uma proteína quimérica contendo fragmentos de MIC2, MIC3 e SAG1 (denominada EC2) em associação a proteína GRA7 recombinante ou com plasmídeo codificando GRA7 (Jongert et al., 2008). Resultados demonstraram que houve produção de altos níveis de anticorpos para todas as proteínas em ambas as formulações e que o protocolo proteína-proteína reduziu em 79% a formação de cistos teciduais após desafio com a cepa 76K, contra 24% de redução com protocolo heterólogo proteína-DNA. A SAG1 clonada em vetores virais também já foi testada. Fang e colaboradores, por exemplo, testaram um pseudo-baculovírus codificando o gene SAG1 em camundongos BALB/c (Fang et al., 2010). O desafio com a cepa RH resultou em aumento de cerca de duas semanas na sobrevivência dos animais em relação ao grupo controle.

Yang-Ha e colaboradores (2007) mostraram que a imunização de camundongos BALB/c com SAG3 recombinante juntamente com QuilA resultou em aumento da sobrevivência após dose letal da cepa ME49 e redução parcial da carga de cistos após desafio com doses sub-letais da mesma cepa (Lee et al., 2007). Em outro estudo, imunização de camundongos ICR com SAG2r resultou em proteção contra mortalidade causada pela cepa RH, porém esse efeito perdurou por pouco tempo e os grupos vacinados sucumbiram cerca de sete dias após os grupos controles (Lau and Fong, 2008). Finalmente, num modelo desenvolvido por Mishima e colaboradores (2001), as proteínas recombinantes SAG1, SAG2, SAG3, P54, SRS1, ou uma mistura destas cinco, foram empregadas em associação com o Adjuvante Completo de Freund (CFA) numa tentativa de proteger BALB/c contra desafio com uma dose letal da cepa ME49 de *T. gondii* (Mishima et al., 2001). Este protocolo de imunização proporcionou uma baixa taxa de sobrevivência (17 - 25%), a qual foi observada apenas nos grupos vacinados com SAG2r, SRS1r ou com a mistura dos cinco antígenos. Estes resultados contrastam com estudos prévios que mostram a SAG1r como sendo uma proteína capaz de proteger, pelo menos parcialmente, contra cepas cistogênicas. Em contrapartida, o trabalho mostra a inibição total na formação de cistos com SAG2r e SRS1r, já que os animais sobreviventes destes grupos vacinais se apresentaram resistentes ao desenvolvimento de cistos cerebrais, enquanto que os animais sobreviventes do grupo

controle vacinado com Extrato Total de Lisado de Taquizoítos de *T. gondii* (TLA) apresentavam uma alta carga parasitária no cérebro.

Os estudos relacionados a vacinas contra toxoplasmose apresentados anteriormente possuem resultados animadores, na medida em que demonstram a possibilidade de se obter uma proteção significativa contra a doença em modelos animais. Entretanto, as maiores limitações daqueles modelos de vacinação têm sido a manutenção de níveis ótimos de imunógenos no organismo hospedeiro e a ativação de uma resposta protetora desviada para Th1 (resposta inflamatória), que é dependente da associação com adjuvantes apropriados, especialmente no caso das vacinas baseadas em proteínas recombinantes (Lee et al., 2007; Letscher-Bru et al., 1998). Como uma extensão dessas pesquisas, o presente trabalho introduz o desenvolvimento de vacinas anti-toxoplasma baseadas em vírus recombinantes. O uso de vetores virais recombinantes, como o adenovírus e o vírus vaccínia Ankara modificado, é extremamente adequado para o desenvolvimento de vacinas contra *T. gondii*, tendo em vista a alta capacidade de expressão de proteínas daqueles vetores e a sua capacidade de induzir produção de citocinas pró-inflamatórias.

1.7. Biologia dos Adenovírus

Adenovírus são vírus não envelopados pertencentes à família *Adenoviridae*, a qual é dividida em dois gêneros: *Aviadenovírus* que engloba adenovírus de aves, e *Mastadenovírus*, que abriga aqueles capazes de infectar mamíferos (Rocha et al., 2004). Além da classificação em dois gêneros, os adenovírus são divididos em grupos, de acordo com as espécies afetadas (adenovírus humanos, símios, murinos, bovinos, suínos), em subgrupos, de acordo com suas propriedades de hemaglutinação e oncogenicidade em roedores (ex. subgrupos A-F de adenovírus humanos) (Lukashok and Horwitz, 1998) e em sorotipos, de acordo com a reatividade com anticorpos (Norrby et al., 1976).

Os adenovírus caracterizam-se por apresentarem DNA fita dupla linear com cerca de 36Kb, que se encontra empacotado em um core envolvido por um capsídio protéico icosaédrico com vinte faces triangulares (figura 2A) (Imler, 1995). Esse é constituído de três estruturas protéicas principais: hexon, penton e fibras (figura 2B). Os hexons constituem as faces triangulares do capsídeo. Os pentons formam os vértices da partícula, a partir dos quais se projetam as fibras, responsáveis pela interação com os receptores celulares (Nicklin et al., 2005). O genoma de todos os adenovírus humanos conhecidos apresentam o mesmo esquema de organização geral. Em cada extremidade da molécula de DNA existe uma Repetição Invertida Terminal (ITR), cada uma contendo uma origem de replicação do

genoma. O cromossomo viral contém quatro unidades de transcrição precoces ou imediatas chamadas E1, E2, E3 e E4 (*early unit*), cujos genes são expressos imediatamente após a infecção; duas unidades de transcrição precoces de expressão não-imediata denominadas IX e IVa2; e uma unidade de transcrição tardia designada L (*late unit*), a qual é expressa após a replicação do genoma viral (Russell, 2000).

O ciclo dos adenovírus (figura 2C) tem início com a adesão das partículas virais na superfície da célula hospedeira, por meio de ligação da fibra do capsídeo ao receptor celular CAR (Receptor de Coxsackievirus e Adenovírus) (Tomko et al., 1997). Uma vez ligado à superfície celular, motivos RGD presentes nos pentons interagem com integrinas celulares, o que ativa a internalização do vírus via endocitose em vesículas cobertas por clatrina (Varga et al., 1991). Após internalização, as partículas virais escapam para o citoplasma por meio da ruptura do endossomo primário, sendo ativamente transportadas para o núcleo via microtúbulos. À medida que são movidas pelo citoplasma, as partículas vão sendo desmontadas de maneira organizada e seqüencial, de forma que somente o genoma viral alcança o núcleo celular, onde ocorre ativação transcricional do mesmo. A replicação do genoma viral e a produção de grandes quantidades de moléculas estruturais do capsídeo propiciam a montagem de novas partículas virais. Hexons, pentons e fibras são montadas separadamente no citoplasma e transportados para o núcleo onde serão reunidos para formar o vírion. Uma vez que novas partículas virais são montadas, ocorre a liberação da progênie através da ruptura da célula infectada (Shenk, 2001).

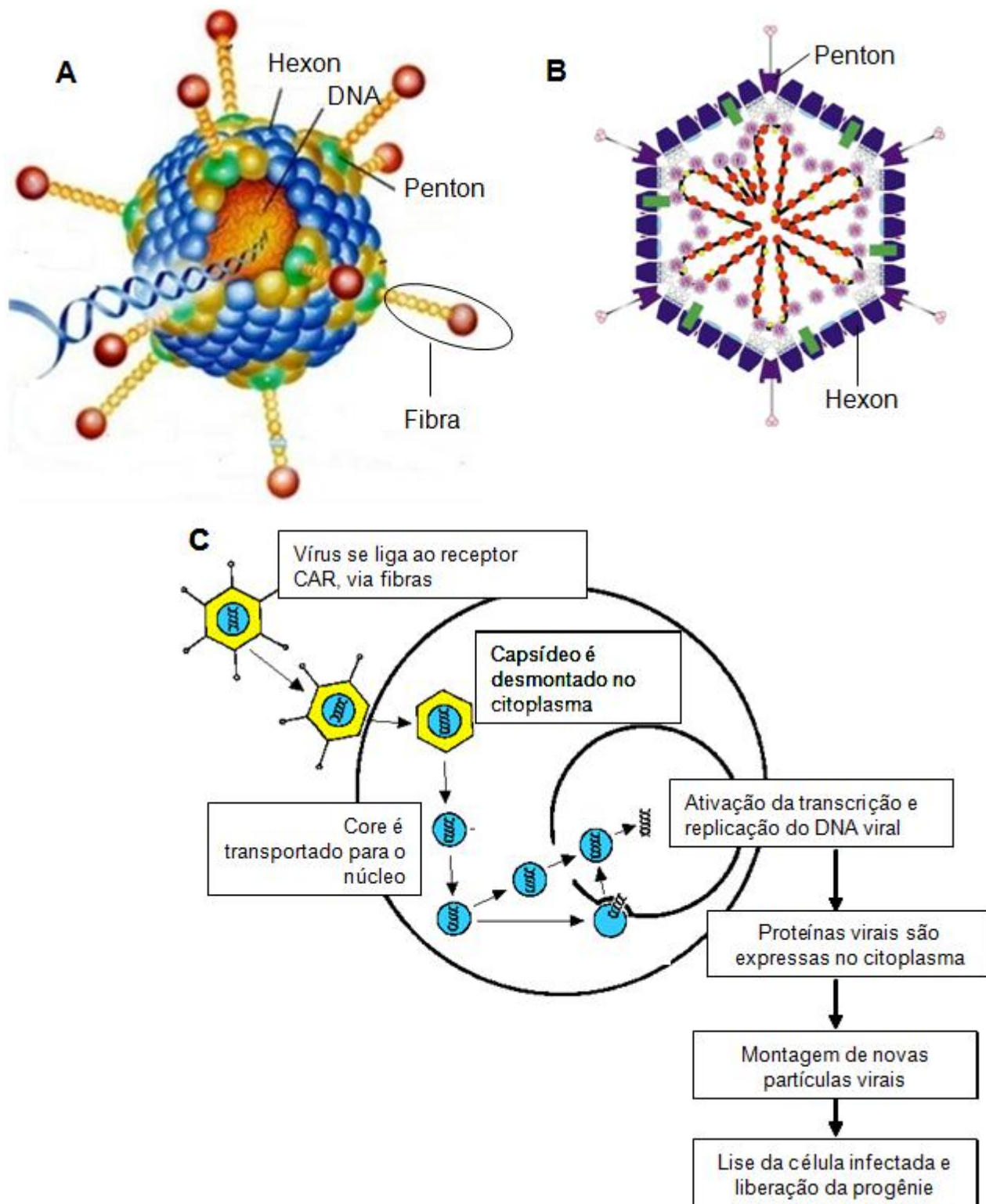


Figura 2 – Biologia dos adenovírus. A, representação tridimensional de uma partícula viral. B, representação de um corte transversal de uma partícula viral, mostrando a posição dos pentons e hexons e o DNA dentro do core, associado a proteínas semelhantes a histonas. Adaptado de Russell, 2000. C, ciclo de replicação dos adenovírus.

1.8. Adenovírus recombinantes

Os primeiros relatos de adenovírus humanos ocorreram há mais de quatro décadas e desde então, cerca de 50 sorotipos, que afetam diretamente o homem, já foram identificados. Esses vírus têm sido descritos como agentes etiológicos de patologias do trato respiratório superior, que se manifestam clinicamente em crianças com menos de 5 anos de idade na forma de congestão nasal, coriza, tonsilite e tosse. Ainda, esse vírus é o responsável por síndromes gastrointestinais como diarreias, além de conjuntivites (Zhang and Bergelson, 2005). Em geral, as infecções manifestam-se na forma de doenças benignas e autolimitantes, com os indivíduos infectados desenvolvendo uma resposta imune eficiente no controle da replicação viral e re-infecção (Russell, 2000).

A popularidade do uso dos adenovírus como vetores vacinais deveu-se ao sucesso da imunização de milhares de militares do exército americano com os sorotipos Ad4 e Ad7, com o objetivo de prevenir a síndrome respiratória aguda (Howell et al., 1998). Desde então, os adenovírus passaram por diversas modificações que permitiram seu uso como uma poderosa ferramenta de expressão de genes heterólogos. Os adenovírus recombinantes são amplamente empregados para expressão, apresentação de antígenos e indução de resposta imune contra vários patógenos. Diversas construções codificando genes de agentes infecciosos importantes, tais como o vírus Ebola (Richardson et al., 2009; Sullivan et al., 2003; Sullivan et al., 2000), HIV (Asmuth et al., 2010; Casimiro et al., 2003; Hidajat et al., 2010), *Plasmodium* (Bruna-Romero et al., 2004; Rodriguez et al., 2009), *Trypanosoma cruzi* (de Alencar et al., 2009), CMV (de Andrade et al., 2007) e vírus da raiva (Henderson et al., 2009), têm sido utilizadas com grande sucesso na indução de imunidade em modelos experimentais.

Os adenovírus humanos do sorotipo 2 e 5 (Ad2 e Ad5) do subgrupo C são os mais comumente usados para criação dos vetores recombinantes. No presente trabalho, foi utilizado um vetor não-replicativo de primeira geração baseado no adenovírus humano do sorotipo 5 (Imler, 1995). Os adenovírus deficientes em replicação podem levar a expressão do transgene e induzir resposta imune em um organismo hospedeiro, mas não podem ser transmitidos de um indivíduo a outro. Isso torna a utilização do vetor segura, eliminando o risco de propagação ambiental de um organismo geneticamente modificado (Babiuk and Tikoo, 2000).

Os adenovírus recombinantes de primeira geração são obtidos através de uma técnica desenvolvida pelo grupo de Frank L. Graham (McGrory et al., 1988). Essa técnica consiste da recombinação homóloga entre o genoma adenoviral e um plasmídeo bacteriano,

o qual contém o gene exógeno de interesse clonado num cassete de expressão flanqueado por sequências de adenovírus. A recombinação induz a substituição de um fragmento do genoma do adenovírus pelo cassete de expressão contendo o transgene. Essa troca de segmentos permite a inserção de genes sem aumento excessivo do tamanho do genoma viral, mantendo-o dentro do limite de empacotamento do capsídeo. O processo de recombinação leva a deleção das regiões E1 e/ou E3 do genoma, o que permite inserções transgênicas de até 7 kilobases. Como os produtos dos genes E1 são essenciais para a expressão das proteínas responsáveis pela replicação do genoma viral, a deleção resulta em um adenovírus deficiente em replicação (Russell, 2000). A propagação dos vírus recombinantes é realizada *in vitro*, em linhagens celulares que foram permanentemente transformadas com segmentos da região E1 do genoma adenoviral e exercem efeito complementar aos vírus não replicativos (Graham et al., 1977; Shaw et al., 2002).

Além da baixa patogenicidade natural das cepas adenovirais selvagens usadas como base para a construção dos vetores recombinantes e das deleções que tornam os adenovírus deficientes em replicação, ainda há um terceiro fator de segurança que é o fato do genoma dos adenovírus não se integrar ao DNA celular, sendo expresso primariamente como DNA epissomal. Essa característica é vantajosa, se forem levados em consideração os efeitos deletérios que a integração pode causar sobre a célula, como a ruptura de antioncogenes (Shenk, 2001).

Os adenovírus recombinantes são capazes de induzir uma intensa expressão do transgene tanto *in vitro* como *in vivo*. Normalmente, os níveis de expressão de um antígeno e a resposta imune obtidos com adenovírus superam aqueles obtidos com métodos de vacinação com plasmídeos. Isso deriva do fato de que o DNA, quando injetado em determinados tecidos, não é eficientemente captado por uma grande proporção de células. Ainda mais, os adenovírus podem infectar uma grande variedade de células quando inseridos em um tecido, mesmo células pós-mitóticas ou altamente diferenciadas (Mittal et al., 2001). Além disso, eles são relativamente estáveis e fáceis de manipular, dispensando refrigeração quando liofilizados; eles também são de fácil propagação, podendo ser obtidos em altos títulos ($>10^9$ unidades formadoras de placas/ml), o que permite sua produção em larga escala (Babiuk and Tikoo, 2000; Souza et al., 2005).

Os adenovírus ativam o desenvolvimento de intensa resposta imune inata e adaptativa, tanto para o transgene quanto para as proteínas estruturais e regulatórias do próprio vetor (Jooss and Chirmule, 2003). Infecções por adenovírus induzem uma resposta inflamatória caracterizada por infiltrado inflamatório rico em células, com a liberação local de

Interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), IL-12, TNF, IL-1 e IL-6. (Di Paolo et al., 2009; Holst et al., 2010; Muruve, 2004; Yang et al., 1995b). Além disso, já foi demonstrado que a infecção de alguns tipos celulares com adenovírus (células endoteliais, por exemplo) provoca liberação de quimiocinas como MIP-1, MCP-1 e 2 e IP-10, as quais mediam a infiltração de macrófagos, neutrófilos, células NK e linfócitos nos tecidos infectados, iniciando uma resposta inflamatória local (Muruve et al., 1999; Muruve et al., 2008). A inflamação tem importância crucial na resposta contra os adenovírus, pois influencia diretamente na ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, especialmente as células dendríticas (CDs) que são fundamentais para o desenvolvimento subsequente da resposta imune adaptativa. As citocinas liberadas pelas células infectadas, associadas aos componentes do capsídeo viral, especialmente fibras e hexons, são capazes de ativar a maturação das CDs (Hartman et al., 2008; Molinier-Frenkel et al., 2002). O resultado desta estimulação é o aumento da expressão superficial de MHC e de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86, bem como produção da citocina IL-12. A importância dessa via de estimulação pode ser comprovada por experimentos nos quais CDs murinas ativadas experimentalmente *in vitro* com vírions ou amostras de fibras virais purificadas se mostraram plenamente competentes para iniciarem respostas adaptativas protetoras *in vivo*, com ativação de CTLs, quando re-inoculadas (Molinier-Frenkel et al., 2003).

Diferentes estudos têm avaliado a habilidade dos adenovírus em ativarem Receptores de Padrões Moleculares (PRRs), dentre esses, os TLRs e receptores do tipo NOD (NLRs, *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*), bem como tentado identificar quais padrões moleculares presentes nos vírus seriam responsáveis pela ativação de PRRs. Zhu e colaboradores (Zhu et al., 2007) demonstraram que a ativação da produção de IFN do tipo I por DNA de adenovírus em células dendríticas plasmocitóides (pDC) é mediada por TLR9, em uma via de sinalização dependente de MyD88. Por outro lado, foi demonstrado que adenovírus são capazes de induzir a liberação de IL-1 β através da ativação do inflamossoma NLRP3 (Hartman et al., 2007; Muruve et al., 2008).

1.9. Biologia dos poxvírus

Poxvírus são vírus de genoma complexo, cujo tamanho varia entre 130-300 Kb. Pertencem à família *Poxviridae*, a qual é dividida em duas subfamílias: *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*. A subfamília *Chordopoxvirinae*, que abriga os vírus que infectam vertebrados, compreende nove gêneros, sendo que os membros dos gêneros *Orthopoxvirus*

e *Avipoxvirus* são amplamente utilizados como vetores recombinantes com fins vacinais (Sutter and Moss, 1992). Os dois mais bem conhecidos poxvírus são os *Variola* (VARV) e *Vaccinia* (VACV) virus, ambos pertencentes ao gênero *Orthopoxvirus*. O VARV é o agente etiológico da varíola, já o VACV é o agente etiológico da varíola bovina (Moss, 2011).

As partículas infecciosas do vírus vaccinia são visualizadas em criomicroscopia eletrônica como retângulos de superfície lisa e extremidades arredondadas. Apresentam de 300-400nm de diâmetro, sendo envolvidas por uma membrana lipoprotéica a qual abriga o cerne viral que encerra uma fita dupla linear de DNA. Sequências repetidas terminais (ITRs) estão presentes no genoma de todos os Poxvírus. Essas são idênticas, sendo encontradas nas extremidades, e abrigam uma região rica em A+T e uma alça em grampo (*hairpin loop*) que conecta as duas fitas de DNA (Earl et al., 2001).

Numerosas enzimas codificadas pelo virion, dentre elas, o complexo da RNA-polimerase dependente de DNA, metilases, uma enzima responsável pela adição do cap, a polimerase poli (A), além dos fatores de transcrição imediatos, são empacotados no interior do cerne viral. A existência dessas enzimas proporciona a esses vírus a capacidade de replicação no interior do citoplasma da célula hospedeiro, permitindo que os mesmos dispensem o maquinário nuclear para esse processo (Moss, 1996).

O ciclo infeccioso dos Poxvírus (figura 3) inicia-se após a ligação das partículas virais à superfície celular e liberação do cerne viral no interior do citoplasma (1). Inicialmente, somente os genes precoces são transcritos pelo complexo da RNA polimerase viral (2). Esses codificam proteínas envolvidas com a replicação do genoma viral, com a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro, fatores de crescimento parácrinos, fatores de transcrição intermediários e tardios (3). Tipicamente, as moléculas de DNA da progênie viral servem como moldes para a expressão das classes de genes intermediários e tardios (4 e 5). As proteínas codificadas pelos RNA's mensageiros intermediários incluem aquelas necessárias para a expressão dos genes da fase tardia. Após a síntese das proteínas estruturais tardias, as partículas virais infecciosas são montadas, sendo que algumas são liberadas com uma membrana adicional derivada do Complexo de Golgi (6). Após a montagem, as partículas virais são transportadas para a periferia da célula (7), podendo ser liberadas para o meio extracelular ou permanecer ligadas à superfície (Harrison et al., 2004).

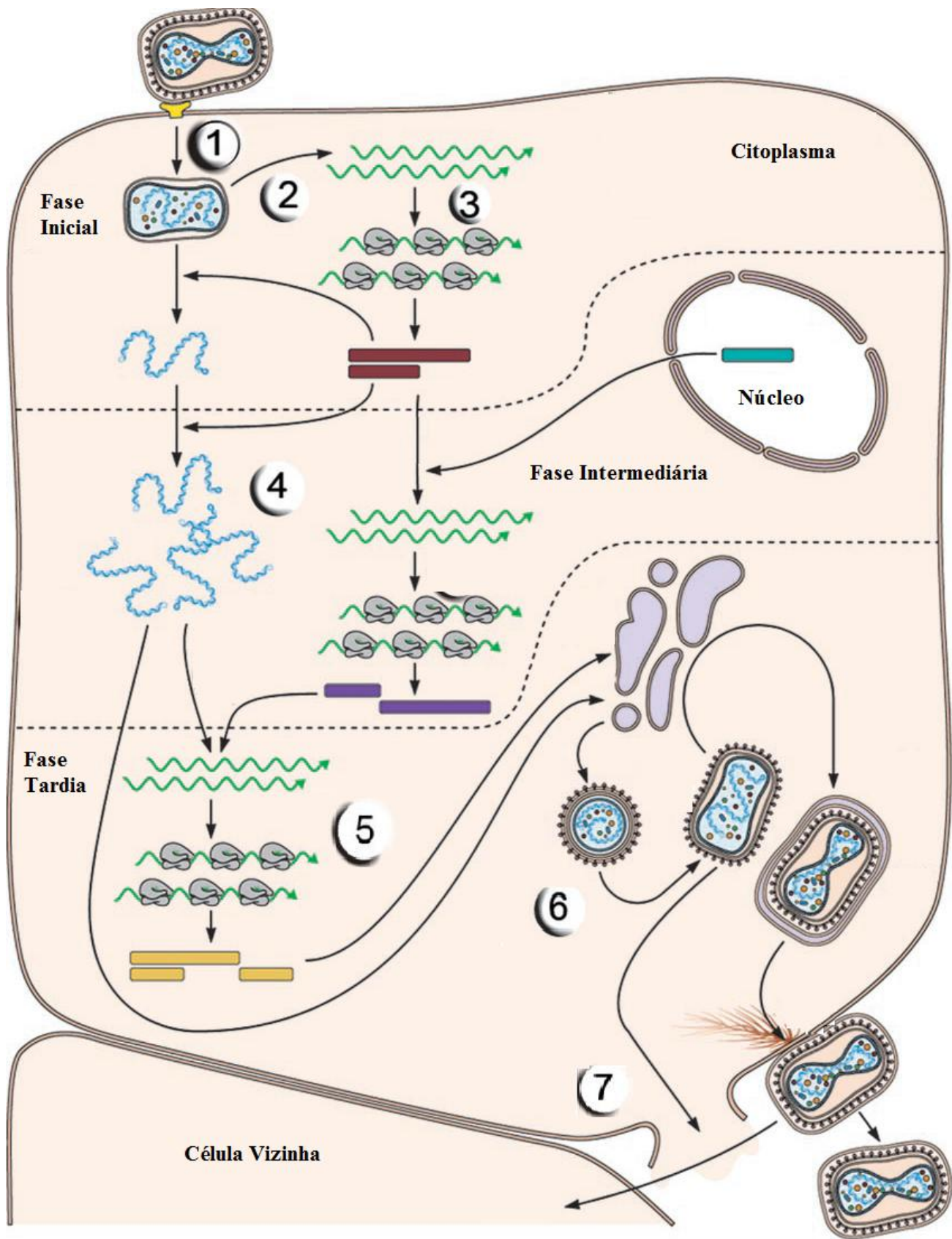


Figura 3 – Representação simplificada dos principais eventos do ciclo de replicação dos Poxvírus. Adaptado de Harrison et al., 2004.

1.10. Poxvírus como vetores vacinais

O vírus vaccínia, amplamente empregado em campanhas de imunização contra a varíola, confere imunidade cruzada contra o vírus da varíola. Como o último caso notificado de varíola humana ocorreu na Somália, em 1977, a doença foi considerada erradicada pela Organização Mundial de Saúde em 1980. Como resultado, a imunização em massa com o vírus vaccínia foi descontinuada. Esta vacinação, a qual havia sido realizada por aproximadamente dois séculos, consistia na inoculação intradérmica do vírus vaccínia (Schatzmayr, 2001). No entanto, a incidência de reações vacinais adversas mais sérias em 1 a cada 500.000 indivíduos imunocompetentes vacinados e incidências muito maiores em indivíduos imunocomprometidos levaram ao desenvolvimento de amostras vacinais atenuadas (Moss, 1996). De maneira interessante, o período de descontinuidade da vacinação coincidiu com os primeiros relatos da aplicação da tecnologia do DNA recombinante para a geração de vírus vaccínia recombinante (Paoletti et al., 1984).

Numerosas abordagens foram utilizadas para aumentar a segurança dos vírus vaccínia. Dentre elas, a identificação e deleção de seqüências gênicas relacionadas com a virulência do vírus e a atenuação através da passagem seriada em cultivos celulares. Historicamente, o MVA (do inglês *modified vaccinia virus Ankara*) foi obtido por Stickl e colaboradores (Stickl et al., 1974), em 1974, a partir de um vírus vaccínia isolado na cidade de Ankara (vírus Ankara), através da atenuação por passagem seriada em cultura primária de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) com a finalidade de servir como uma vacina segura contra a varíola (Sutter and Staib, 2003).

Análises genéticas comparando o vírus selvagem e o MVA mostraram que durante o processo de atenuação, genes virais abrangendo aproximadamente 15% do genoma parental foram perdidos (cerca de 31Kb), incluindo regiões responsáveis pela imunomodulação do sistema imune do hospedeiro e os determinantes da gama de hospedeiros do vírus, o que os incapacitou de gerarem infecções produtivas em células de mamíferos (Antoine et al., 1998). Mesmo em experimentos utilizando animais imunossuprimidos e em humanos constituintes de grupos de risco, o MVA se mostrou avirulento e incapaz de produzir partículas virais infectivas (Parrino et al., 2007). Devido a todos esses aspectos e pelo fato de que a vacinação de mais de cem mil indivíduos, durante os estágios finais do programa de erradicação da varíola, ter sido realizada com alto grau de segurança e sem nenhum efeito colateral notificado, o MVA tem se estabelecido como um interessante candidato para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (Drexler et al., 2004; Kutscher et al., 2010). Além disso, já foi demonstrado que o defeito no programa

morfogenético que acontece nos últimos passos do ciclo replicativo desse vírus não altera a capacidade e o nível de expressão de antígenos recombinantes em células de mamíferos se comparado ao vírus vaccinia competente em replicação. A ausência de formação de partículas novas impede também que o vírus se espalhe para indivíduos não vacinados ou para o meio ambiente (Sutter and Moss, 1992). Ainda mais, como todo o ciclo replicativo desse vírus ocorre em nível citoplasmático, isso elimina a possibilidade de integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (Harrison et al., 2004).

Por sua segurança comprovada, o MVA é um dos vírus de escolha para ensaios de imunização pré-clínicos e clínicos, podendo ser utilizado tanto em animais previamente imunizados contra o vírus, quanto em animais que nunca entraram em contato com o agente. No primeiro caso, apenas uma dose vacinal pode ser administrada, uma vez que a resposta gerada contra o próprio vetor viral dificulta a geração da resposta imunológica contra o patógeno de interesse. No segundo caso, duas doses vacinais podem ser administradas (dose-reforço homólogo) sendo que, apenas a partir da terceira dose, seria observada queda significativa da resposta imune contra o patógeno (Hodge et al., 2003).

Assim sendo, faz-se necessário o uso de protocolos de imunização dose-reforço heterólogo, em que dois ou mais veículos diferentes carregam construções do mesmo antígeno ou de antígenos a ele relacionados (Gilbert et al., 2006). Nesse contexto, o estabelecimento de um protocolo de imunização utilizando diferentes vetores virais recombinantes é bastante atraente, já que ambos os vetores aqui utilizados já se encontram bem caracterizados em outros modelos experimentais de doenças infecciosas, como Malária (Bruder et al., 2010; Reyes-Sandoval et al., 2010), HIV (Aboud et al., 2010; Hidajat et al., 2010), tuberculose (Kolibab et al., 2010). Além disso, a proteção verificada nesses modelos se relacionou a uma eficiente indução de expressão protéica e apresentação de antígenos, assim como a ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺, as quais também são essenciais para controle da infecção pelo *T. gondii* (Miller et al., 2009).

Levando-se em consideração a eficiência dos Adenovírus e MVA recombinantes como vetores vacinais e as propriedades dos antígenos de superfície de *T. gondii*; acreditamos ser relevante a avaliação de protocolos de imunização dose-reforço utilizando os vetores recombinantes Adenovírus e MVA em modelo animal - camundongos. A partir da avaliação desse modelo, esperamos contribuir para o desenvolvimento de uma vacina capaz de combater eficientemente à infecção por *T. gondii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Empregar vírus recombinantes codificando os genes dos antígenos de superfície de SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii* na imunização de camundongos para indução de resposta imune e proteção contra desafio com o parasita.

2.2. Objetivos específicos

- I. Construir vírus vaccinia Ankara modificado (MVA) contendo seqüências dos genes codificadores dos antígenos de superfície de SAG1 e SAG2 de *T. gondii*.
- II. Empregar adenovírus recombinantes que contém seqüências dos genes codificadores de antígenos de superfície de SAG1, SAG2 e SAG3 separadamente ou em combinação com vírus vaccinia Ankara modificado (MVA) contendo os mesmos antígenos, como agentes de imunização de camundongos em protocolos do tipo iniciação/reforço homólogo e heterólogo.
- III. Caracterizar a resposta imune humoral e celular induzida nos camundongos C57BL/6 imunizados.
- IV. Avaliar a capacidade protetora da resposta imune gerada, mediante o desafio dos animais imunizados com cepas causadoras de infecção crônica (cistogênicas) de *T. gondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Para manutenção das cepas de *T. gondii* utilizadas nos experimentos, foram empregadas camundongos Swiss-Webster. Nos experimentos de imunização com vírus recombinantes e desafio com *T. gondii*, foram empregados camundongos do tipo selvagem C57BL/6, animais deficientes em IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$), animais deficientes em IL-12 (IL-12 $^{-/-}$), animais deficientes em células T CD8 $^{+}$ (CD8 $^{-/-}$) ou animais deficientes em MyD88 (MyD88 $^{-/-}$). Em todos os experimentos foram empregadas fêmeas com 6 – 8 semanas de idade. Os animais foram obtidos no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (BIOTEX-CPqRR), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ou no Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO). A manutenção dos animais foi realizada no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (BIOTEX-CPqRR) de acordo com as normas éticas da instituição e segundo o protocolo P-4/09-2.

3.2. Cepas de *T. gondii*

Nos experimentos de desafio dos camundongos imunizados, foi empregada a cepa ME49 de *T. gondii*. (Lunde and Jacobs, 1983). A sua manutenção foi realizada através da passagem oral sucessiva de cistos teciduais em camundongos Swiss-Webster. Os cistos obtidos através da maceração em PBS do cérebro de animais infectados foram empregados para desafio dos animais vacinados com vírus recombinantes. A cepa RH (Sabin, 1941) foi empregada para obtenção de antígeno total de lisado de taquizoítos (TLA) de acordo com protocolo descrito por Giraldo e colaboradores (Giraldo et al., 2000). Essa cepa foi mantida em camundongos Swiss-Webster por meio da inoculação intraperitoneal de taquizoítos obtidos de animais previamente infectados.

3.3. Linhagens celulares

Para amplificação dos adenovírus foram empregadas células HEK293A. Essa linhagem é composta de células de rim embrionário humano, as quais foram transformadas com fragmentos de DNA derivados da região E1 do genoma de adenovírus humano tipo 5 (Ad5). Essas células expressam fatores de transcrição E1 sendo permissivas à replicação de adenovírus E1 Δ de primeira geração (Shaw et al., 2002). As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, em *Dullbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Sigma) suplementado com 5%

de soro fetal bovino (SFB, Cultilab), 5mM de bicarbonato de sódio, 25mM de HEPES e 40mg/l de gentamicina (DMEM completo).

Para os experimentos de geração, seleção, amplificação e testes de expressão proteica dos MVAs recombinantes foram utilizados fibroblastos primários de embrião de galinha (CEF, do inglês *chicken embryo fibroblast*). As CEFs foram obtidas a partir de ovos embrionados de galinha com 9 - 11 dias de idade, como previamente descrito (Earl *et. al.* 1998). O cultivo foi realizado a 35°C e 5% de CO₂ em DMEM suplementado com 5% de SFB, 5mM de bicarbonato de sódio, 25mM de HEPES, 1mM de L-glutamina e 100U/ml de penicilina/estreptomicina (Sigma).

3.4. Adenovírus recombinantes

Os adenovírus recombinantes utilizados nesse trabalho foram gerados pela Dra. Bráulia Costa Caetano (Caetano *et al.*, 2006). Esses codificam três antígenos de superfície de *T. gondii*, denominados SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2) e SAG3 (AdSAG3). As seqüências dos genes inseridos nos adenovírus sofreram algumas modificações para promover adequada expressão em células de mamíferos. As modificações incluíram a remoção dos motivos de ancoramento em GPI, nos três genes, e no caso de SAG3, a mudança do peptídeo sinal nativo pela seqüência sinal da hemaglutinina do vírus influenza. A construção dos adenovírus recombinantes com os genes que codificam as SAGs foi realizada por meio da co-transfecção e recombinação homóloga intracelular entre o plasmídeo pJM17, que contém o genoma do adenovírus humano tipo 5, e os vetores de transferência pAd-SAG1/2ΔGPI ou pMV60-HASS-SAG3ΔGPI. Nesse processo, o cassete de expressão contendo o gene SAG foi transferido para o genoma do adenovírus.

O vetor pJM17, desenvolvido por (McGrory *et al.*, 1988), contém o genoma completo do Ad5 modificado por meio da inserção do plasmídeo pBRX, dentro de um sítio único para endonuclease de restrição *Xba*I localizado a 3.7 unidades de mapa (m.u.). Essa inserção torna o genoma do adenovírus deficiente em replicação, pois causa ruptura de genes que codificam fatores de transcrição essenciais para expressão das proteínas que dirigem o processo de replicação do DNA viral. Além disso, a inserção faz com que o tamanho do genoma exceda em 2,3 kilobases a capacidade máxima de empacotamento de material genético do capsídeo viral. Assim, mesmo que o pJM17 seja introduzido numa célula HEK293 permissiva, e ainda que ocorra sua replicação e expressão de todas as proteínas

estruturais por ele codificadas, a montagem de novas partículas virais não é possível devido ao excesso de tamanho do genoma.

3.4.1. Purificação e titulação dos adenovírus recombinantes

Para amplificação dos adenovírus recombinantes, cultivos de células HEK293A (somando um total de aproximadamente 12×10^7 células) foram infectados por 48 horas com adenovírus a uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 1 vírus por célula. As células infectadas foram coletadas, sedimentadas por centrifugação a 300xg por 10 minutos a 4°C, e suspensas em tampão Tris 100mM pH=8,0. As células foram, então, lisadas por meio de maceração na presença de 0,05% de deoxicolato de sódio. O lisado celular foi acrescido de uma solução saturada de cloreto de cézio (5,8ml de cloreto de cézio para cada 10ml de lisado celular) e centrifugado a 100.000xg por 16 horas a 4°C para bandeamento dos vírus. As bandas virais foram coletadas e as suspensões virais obtidas foram dializadas contra tampão Tris 10mM pH=8,0 por 4 horas a 4°C. Os vírus dializados foram mantidos em tampão Tris 10mM pH=8,0 acrescido de 10% de glicerol a -70°C.

Para titulação, células HEK293 foram semeadas em placas de 24 poços, numa densidade de 3×10^5 células por poço em DMEM completo, e cultivadas durante 24 horas. Os estoques de vírus foram diluídos em série, com fator de diluição 10, em DMEM completo. Cada diluição foi feita em quadruplicata, e 200µl das diluições 10^{-6} a 10^{-11} foram utilizadas para infectar as células. Os cultivos foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂, até o aparecimento de placas de lise isoladas na monocamada de células. O título foi calculado a partir da maior diluição de vírus que levou à formação de placas, de acordo com a fórmula $T = N \times 1/10^n \times 4000$. Onde, T é o título do estoque viral, N é o número médio de placas de lise obtido com a maior diluição do estoque viral, n é a ordem dessa diluição e 4000 é fator de diluição inicial do estoque viral. O valor T é expresso em número de unidades formadoras de placa de lise (p.f.u.) por mililitro de estoque viral.

3.5. Geração dos MVAs recombinantes com genes SAG1 e SAG2.

3.5.1. Vetores empregados na geração dos MVA recombinantes

Os MVAs recombinantes foram gerados através de recombinação homóloga intracelular entre um vetor de transferência clonado com o transgene que se deseja inserir no genoma do vírus e o vírus selvagem auxiliar (figura 4).

Nesse trabalho utilizamos como vetor de transferência o plasmídio pLW44. Esse plasmídeo apresenta o gene repórter GFP (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) sob controle do promotor p11 (*Vaccinia virus late promoter*) e um cassete de expressão controlado pelo promotor artificial mH5 do vírus *Vaccinia*, que permite a expressão constitutiva da proteína heteróloga (Figura 4B).

3.5.2. Clonagem dos genes SAG1 e SAG2 no vetor de transferência

Como os genes de interesse utilizados nesse trabalho já haviam sido anteriormente clonados em nosso laboratório (Caetano et al., 2006), a primeira etapa para a construção dos vetores de transferência para a geração dos MVAs foi a excisão daqueles genes dos plasmídios nos quais eles se encontravam. Os genes *SAG1ΔGPI* e *SAG2ΔGPI* foram retirados dos plasmídeos pAdSAG1 e pAdSAG2 (figura 5), previamente preparados para a construção dos adenovírus recombinantes com esses mesmos genes (Caetano et al., 2006), utilizando-se as enzimas de restrição *BglII* e *HindIII*.

Para as clonagens, os produtos obtidos a partir das digestões acima foram tratados com a enzima T4 DNA polimerase (Promega) durante 5 minutos a 37°C para o preenchimento de extremidades coesivas. A inativação da enzima foi realizada durante 10 minutos a 75°C. Subseqüente a esse passo, os insertos acima obtidos foram inseridos no vetor de transferência pLW-44 no sítio de *SmaI*, sob o controle do promotor mH5 (*Vaccinia virus early/late promoter*). As reações de ligação foram realizadas com a proporção molar 3:1 de inserto e plasmídeo e 1U de T4 ligase (Promega) em 20µl de volume final, a 16°C durante 3 horas. Os produtos obtidos foram utilizados para a transformação de *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes. As bactérias mantidas a -70°C foram descongeladas em banho de gelo e transformadas com os plasmídios contendo os insertos. As bactérias transformadas foram então semeadas em meio LB sólido contendo 100mg/mL de ampicilina e mantidas a 37°C por 18 horas. Os transformantes obtidos foram verificados quanto à presença dos insertos através de reações digestão com enzimas de restrição.

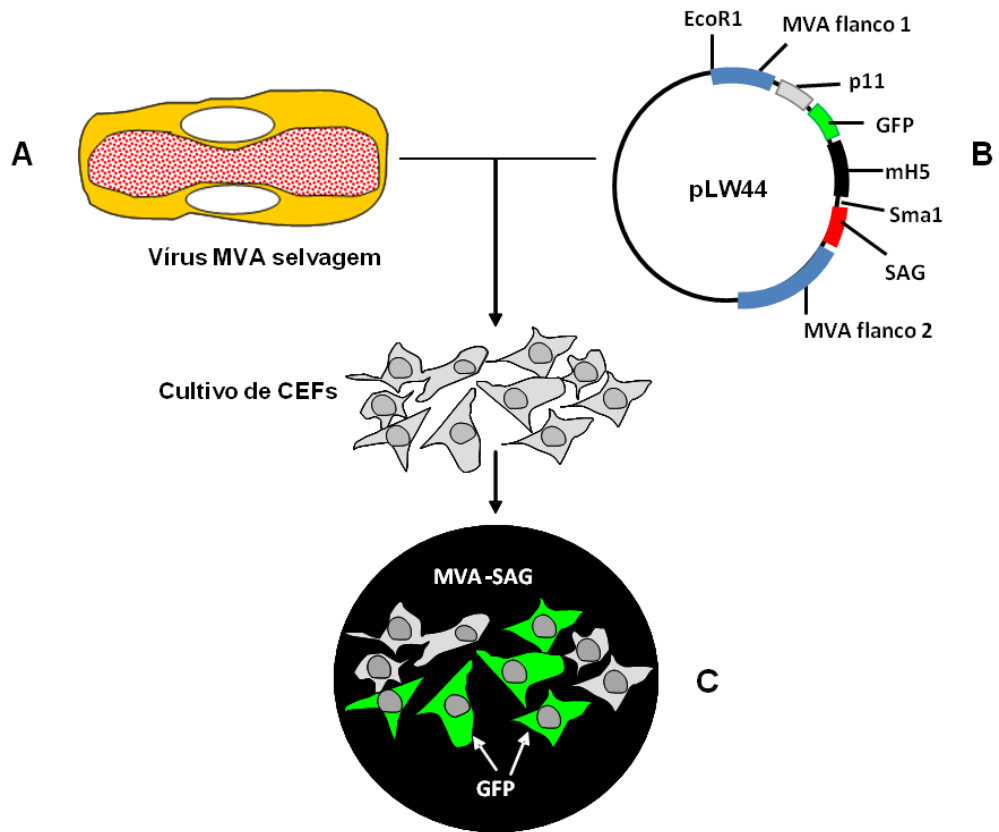


Figura 4 – Geração de MVAs recombinantes. Para geração dos MVAs recombinantes, um cultivo de CEFs (*chicken embryo fibroblast*) foi infectado com o MVA auxiliar (A) e posteriormente transfectado com plasmídeo contendo o transgene de interesse (B). A recombinação homóloga entre o genoma viral e o cassete de expressão contendo o transgene de interesse era verificada através do aparecimento de fluorescência devida à expressão do gene repórter GFP (C).

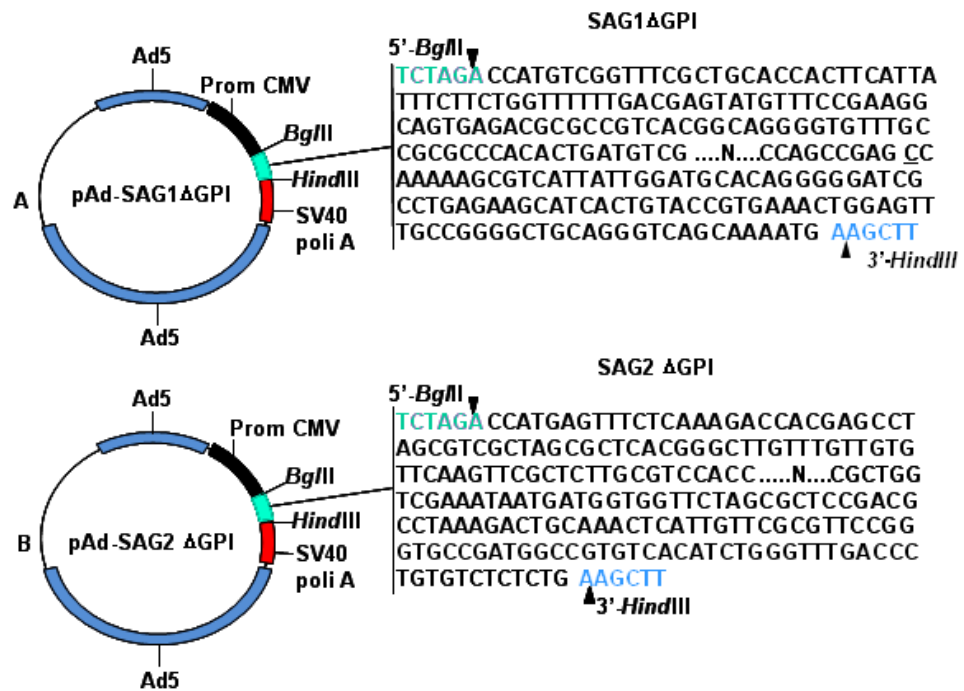


Figura 5 – Construções contendo genes *SAG1ΔGPI* (A) e *SAG2ΔGPI* (B) utilizadas para geração de adenovírus recombinantes. Ad, região de homologia a adenovírus humano do tipo 5; Prom CMV, promotor de citomegalovírus; SV40 poli A, seqüência de poliadenilação do vírus símio 40. Nas seqüências de *SAG1ΔGPI* e *SAG2ΔGPI*, verde indica a seqüência reconhecida pela enzima *Bgl*III, azul indica a seqüência reconhecida pela enzima *Hind*III e as cabeças de seta indicam sítios de clivagem das enzimas de restrição.

3.5.3. Protocolo de geração de MVAs recombinantes

A construção dos MVAs recombinantes com os genes que codificam as SAGs foi realizada por meio da infecção de células com o vírus MVA selvagem, seguida de transfecção do vetor de transferência pLW44 clonado com cada um dos genes de interesse. Empregamos células CEFs para a geração e seleção dos vírus recombinantes, já que as mesmas são permissivas a replicação viral. Os vírus transgênicos foram gerados pela recombinação homóloga intracelular entre o vírus auxiliar e os vetores de transferência. Nesse processo, o cassete de expressão contendo o gene SAG e o marcador fluorescente GFP foi transferido para o genoma do MVA. Os vírus recombinantes foram identificados por meio da expressão de GFP e formação de placas fluorescentes na monocamada de CEFs. Os vírus contidos nessas placas foram clonados sucessivamente por meio de diluição limitante para exclusão dos vírus auxiliares contaminantes (figura 4).

Para gerar os MVAs recombinantes empregamos o protocolo de transfecção de células CEF com lipossomas (LipofectAMINE 2000 Reagent®, Gibco). As células CEFs foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços, numa densidade de 5×10^5 células por poço e cultivadas até atingirem 90% de confluência. Antes dos ensaios, as células foram lavadas uma vez com meio de transfecção (Optimem®, Gibco). As células foram infectadas com 0,1 m.o.i do vírus auxiliar selvagem por 2 horas a 35°C e 5% de CO₂. Para transfecção, 2µg de plasmídeo pLW44-SAG e 3µl de reagente de transfecção foram diluídos, separadamente, em 50µl de meio de transfecção e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. As soluções de lipossomas e plasmídeo foram então misturadas, incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e adicionadas às células previamente infectadas com os vírus auxiliares. Seguiu-se incubação por 5 horas a 35°C e 5% de CO₂. As células foram então lavadas, acrescidas de EMEM suplementado com 2,5% de SFB e cultivadas por 48 horas a 35°C e 5% de CO₂.

3.5.4. Seleção dos MVAs recombinantes

Para eliminar os vírus auxiliares contaminantes das suspensões de MVA recombinantes, os vírus obtidos após a recombinação homóloga foram submetidos a um processo de clonagem, o qual foi realizado por meio de passagens consecutivas de clones dos vírus. A seleção dos clones de MVA recombinantes foi realizada em placas de cultivo de 6 poços com 5×10^5 CEFs por poço. Uma alíquota de vírus foi diluída em série, com fator 10, e as diluições foram utilizadas para infectar os cultivos de CEF, por 2 horas. Após a

incubação, foram adicionados em cada poço 2ml de EMEM 2 vezes concentrado, sem indicador de pH, acrescido de 1% de agarose fundida. Após a solidificação da agarose em temperatura ambiente, os cultivos foram mantidos a 35°C e 5% de CO₂ até o desenvolvimento de placas fluorescentes (aproximadamente 48 horas). Os cultivos que apresentavam poucas células fluorescentes, sem confluência de placas, foram utilizados para coleta dos clones de MVA, através de punção e aspiração da agarose. Os fragmentos de gel foram incubados em 500µl de EMEM com 2,5% SFB para difusão do vírus. As suspensões de vírus foram empregadas posteriormente para infecção de novos cultivos de CEFs. Esse processo de clonagem foi repetido 5 vezes para cada vírus. Os clones virais selecionados foram testados quanto à expressão de SAG1 ou SAG2 em *Western-blot*.

3.5.5. Purificação e titulação dos MVA recombinantes

A purificação dos MVA recombinantes foi realizada em gradiente de sacarose. Para propagação dos vírus, 30 garrafas de cultivo de 175 cm² contendo monocamadas de CEFs foram infectadas com MVA recombinantes durante 48h a 37°C e 5% de CO₂. As células infectadas foram sedimentadas por centrifugação e submetidas a três ciclos de sonicação de 1 minuto, em banho de gelo (*Ultrasonic processor, model GEX600*) para liberação dos vírus citoplasmáticos. O lisado foi centrifugado sobre colchão de sacarose a 36% por 2 horas a 4800xg. O precipitado contendo os MVAs recombinante foi ressuspenso em tampão Tris-HCl pH=8,0 e sonicado por um minuto em potência máxima.

Um gradiente de sacarose 24% a 40% foi preparado em tubo de ultracentrífuga através da adição cuidadosa de 6,8ml de cada uma das soluções de sacarose a diferentes concentrações: 40%, 36%, 32%, 28% e 24%. A suspensão viral obtida na etapa anterior foi então centrifugada nesse gradiente durante 90 minutos a 4200xg para bandeamento dos vírus. A suspensão viral foi coletada e centrifugada novamente por 1 hora a 4200xg. Após a centrifugação, o precipitado contendo o vírus foi ressuspenso em tampão Tris-HCl pH=8,0.

A titulação dos vírus foi realizada em placas de 6 poços contendo monocamadas de CEFs com confluência de 90%. Os estoques de vírus foram submetidos a diluição seriada limitante (10⁻³ a 10⁻¹⁰) e as diluições foram empregadas para infecção de monocamadas de CEFs. Os cultivos infectados foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂ até o aparecimento de placas fluorescentes. O título foi definido a partir da maior diluição de MVA que proporcionou aparecimento de placas fluorescentes, e foi calculado de acordo com a fórmula $T = 2 \times N \times 10^n \times 1000$. Onde, T é o título do estoque viral, N é o número médio de placas de lise obtido

com a maior diluição do estoque viral, n é a ordem dessa diluição e 1000 é fator de diluição inicial do estoque viral. O valor T é expresso em número de unidades formadoras de placa de lise (p.f.u.) por mililitro de estoque viral.

3.6. Experimentos de vacinação e desafio

No presente trabalho foram empregados protocolos de vacinação do tipo iniciação/reforço: um protocolo homólogo, com duas doses consecutivas de adenovírus ou duas doses consecutivas de MVA, e um protocolo heterólogo, no qual uma primoinunização com adenovírus foi seguida por uma imunização de reforço com MVA recombinante. Os protocolos de vacinação são resumidos na Tabela 1.

No protocolo homólogo com adenovírus recombinantes, camundongos receberam duas doses de 10^9 p.f.u. de adenovírus, com um intervalo de 6-8 semanas entre as imunizações. Esse protocolo foi previamente padronizado em experimentos de vacinação com esses mesmos adenovírus em BALB/c (Caetano et al., 2006) e também em experimentos com adenovírus recombinantes com genes de *Leishmania* (Resende et al., 2008a), *Plasmodium* (Bruna-Romero et al., 2001; Bruna-Romero et al., 2004), *Trypanosoma cruzi* (Machado et al., 2006) e CMV (de Andrade et al., 2007). Os grupos vacinais foram constituídos individualmente de 12-14 animais, os quais receberam AdSAG1, AdSAG2 ou AdSAG3. Os grupos de controle vacinal (AdCTRL) receberam um adenovírus que codifica a proteína β -galactosidase de *E. coli* (Bruna-Romero et al., 1997). A vacinação foi feita por via subcutânea (s.c.), na base da cauda, utilizando adenovírus diluídos em PBS estéril, num volume final de 100 a 300 μ l por animal, dependendo do título inicial do estoque viral.

No caso dos protocolos heterólogos, grupos de 10-12 camundongos receberam uma dose s.c. de 10^9 p.f.u. de AdSAG1 ou AdSAG2 e, quatro semanas depois, uma dose intramuscular (i.m.) de 10^7 p.f.u. de MVASAG1 ou MVASAG2, respectivamente. Os grupos de controle vacinal receberam uma dose do AdCTRL seguida de uma dose de MVA que codifica a proteína GFP (MVACTRL). No protocolo homólogo com MVA recombinante, grupos de 10 camundongos C57BL/6 foram imunizados por via intramuscular com 10^7 p.f.u. de MVASAG2 ou MVACTRL e receberam uma dose reforço, 4 semanas depois, de 10^7 p.f.u. do mesmo vírus.

Tabela 1 – Protocolos de vacinação homólogos e heterólogos

Protocolo	Dose de Iniciação			Intervalo (semanas)	Dose de Reforço		
	Vetor	Dose	Via		Vetor	Dose	Via
Homólogo	AdSAG	10 ⁹ p.f.u.	s.c.	6	AdSAG	10 ⁹ p.f.u.	s.c.
	AdCTRL	10 ⁹ p.f.u.	s.c.	6	AdCTRL	10 ⁹ p.f.u.	s.c.
	MVASAG	10 ⁷ p.f.u.	i.m.	4	MVASAG	10 ⁷ p.f.u.	i.m.
	MVACTRL	10 ⁷ p.f.u.	i.m.	4	MVACTRL	10 ⁷ p.f.u.	i.m.
Heterólogo	AdSAG	10 ⁹ p.f.u.	s.c.	4	MVASAG	10 ⁷ p.f.u.	i.m.
	AdCTRL	10 ⁹ p.f.u.	s.c.	4	MVACTRL	10 ⁷ p.f.u.	i.m.

O intervalo de quatro semanas entre as doses foi escolhido com base em experimentos de vacinação desenvolvidos por outros grupos de pesquisa com o vetor MVA. Dentre esses modelos citam-se: ensaios pré-clínicos de imunização contra HIV do tipo 1 em macacos Rhesus (Earl et al., 2007); imunização de camundongos C57BL/6 em terapias anti-tumorais (Hodge et al., 2003); imunização de camundongos BALB/c em protocolos do tipo iniciação/reforço heterólogo proteína/MVA e ensaios pré-clínicos humanos em modelos contra malária e tuberculose (Gilbert et al., 2006), os quais utilizaram intervalos entre 2 a 4 semanas entre as doses. A inoculação intramuscular foi realizada no quadríceps femural, utilizando-se MVA diluído em PBS estéril num volume final de 40µl/animal. Para isso, os animais foram previamente anestesiados via intraperitoneal com 60µl de uma solução de ketamina 20mg/ml e xilasina 1,3 mg/ml. Após o procedimento de vacinação, os animais foram acompanhados até recuperação da anestesia.

Amostras de soro foram obtidas um dia antes do início do protocolo de vacinação e duas semanas após cada imunização para serem empregadas na análise da resposta imune humoral dos animais. O sangue foi coletado com heparina, por meio de punção retro-orbital e o soro obtido foi estocado a -20°C até a realização dos ensaios de ELISA e *Western-blot*.

Para avaliar a resposta imune celular, esplenócitos totais dos animais vacinados foram obtidos entre 2 a 4 semanas após a administração da primeira ou segunda dose de vírus recombinantes. Dois-três animais de cada grupo foram separados e sacrificados para coleta dos baços e isolamento dos esplenócitos, os quais foram empregados em ensaios de

ELISPOT para detecção de células T produtoras de IFN- γ ou alternativamente para cultivo de esplenócitos e detecção de citocinas no sobrenadante das culturas.

Para analisar a capacidade protetora da imunização com vírus recombinantes, os animais vacinados foram submetidos ao desafio com cepas cistogênicas de *T. gondii*, 12 dias após o término do protocolo de imunização. Grupos de 6-8 camundongos foram desafiados com 10 cistos da cepa ME49. Os animais de cada grupo vacinal e controle receberam uma dose de cistos, preparados em 200 μ l de PBS e inoculados por meio de gavagem gástrica (via oral). A mortalidade dos animais desafiados foi acompanhada diariamente após a infecção. Cinquenta dias após a infecção, os animais sobreviventes foram sacrificados para isolamento dos cérebros e determinação da carga de cistos. O cérebro de cada animal foi macerado em 1ml de PBS e, em seguida, duplicatas de 10 μ l de extrato cerebral foram aplicadas sob lamínulas de 22x22cm. A contagem dos cistos foi feita em aumento de 400X, percorrendo-se toda a área das lamínulas.

3.7. Western-Blot

Os extratos antigênicos foram homogeneizados e a quantidade de proteína foi dosada por meio de reação colorimétrica com reagente comercial (*Protein Assay*[®], Bio Rad). As amostras – TLA ou células infectadas com vírus recombinantes - foram ressuspendidas em tampão SDS 4X, composto de 60mM de Tris, 2% de SDS, 5mM de β -Mercaptoetanol, 0,1% de glicerol e 0,006% de azul de bromofenol. As amostras foram, então, aquecidas a 95°C durante 5 minutos e aplicadas em gel de 12% de poliacrilamida, a 5 – 10 μ g de proteína por canaleta. A corrida foi realizada em condições desnaturantes, em tampão composto de 25mM de Tris, 192mM de Glicina e 0,1% de SDS, pH=8,0. Em seqüência, as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 μ m (Sigma) em sistema úmido (Mini Trans-Blot[®], Bio Rad) com tampão composto de 12mM de Tris, 96mM de glicina e 20% de metanol, pH=8,0.

Para bloqueio, as membranas foram incubadas durante uma noite a 4°C, em tampão composto de PBS acrescido de 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado. Todos os soros e anticorpos secundários foram diluídos no tampão de bloqueio. Entre as incubações, as membranas foram lavadas sob agitação por três vezes, durante 5 minutos cada vez, no mesmo tampão. Para análise da resposta imune humoral dos animais vacinados, amostras de soros de camundongos vacinados diluídas (1:500 a 1:1000) foram testadas individualmente contra extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA). Para detecção da

expressão de proteínas pelos vetores virais, as membranas contendo extratos de CEFs infectadas com os vírus recombinantes foram incubadas durante 120 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação, com amostras de soro de coelho infectados pela cepa RH de *T. gondii* (1:1000) ou, alternativamente, com amostras de soro de camundongos BALB/c vacinados com adenovírus recombinantes, codificando para as proteínas SAG1 ou SAG2, diluídas 1:1000. Para detecção dos complexos antígeno-anticorpo, as membranas foram incubadas durante 60 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação, com anti-IgG de camundongo (Sigma) diluído 1:3000 ou anti IgG de coelho diluído 1:5000 (Sigma), ambos conjugados com peroxidase. As membranas foram então lavadas seis vezes em PBS acrescido de 0,1% de Tween e duas vezes em PBS puro. A revelação foi realizada por meio da incubação das membranas com reagente quimioluminescente (ECL-Plus Western-Blot Analysis System[®], Amersham Biosciences) e exposição das mesmas a filme de raios X (Hiperfilm[™]; Amersham Biosciences).

3.8. ELISA

Para verificar a resposta de anticorpos dos animais vacinados com vírus recombinante, amostras de soro foram coletadas 12 dias após as imunizações e submetidas à reação imunoenzimática contra extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA). Placas de 96 poços (Maxisorp[®], Nunc) foram sensibilizadas durante uma noite, a 4°C, com 100µl/poço de uma solução de 5µg/ml de TLA diluído em tampão carbonato (15mM de carbonato de sódio e 34mM de bicarbonato de sódio, pH=9,6). As placas foram bloqueadas com 200µl/poço de PBS acrescido de 10% de SFB, durante 2h a 37°C. As placas foram lavadas uma vez com PBS acrescido de 0,05% de Tween 20 e incubadas com os soros dos camundongos imunizados diluídos 1:50 em tampão de incubação (PBS acrescido de 5% de SFB) durante 2 horas a 37°C. Após três lavagens, as placas foram incubadas com IgG de cabra anti-IgG total de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) diluída 1:3000; com anti-IgG1 de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:3000 (Sigma); ou alternativamente com anti-IgG2C de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:5000 (Southern Biotechnology), durante 60 minutos, a 37°C. Após seis lavagens, as reações foram reveladas com 100µl por poço de uma solução comercial de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma) e interrompidas com 50µl por poço de H₂SO₄ 2N. A leitura da absorbância das reações foi realizada a 450nm.

3.9. Peptídeos Sintéticos

Peptídeos MHC-I restritos foram identificados nas seqüências das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3, empregando-se o programa de predição de epítomos SYFPEITHI (www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/EpitopePrediction.htm). Para cada proteína foi verificada a existência de epítomos específicos para as moléculas H2-K^b, H2-L^b e H2-D^b. Os peptídeos que possuíam *score* superior a 21, foram selecionados para os ensaios de ELISPOT.

Os peptídeos foram sintetizados no Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG utilizando a metodologia de N-alfa-(9-fluorenilmetoxicarbonila) – Fmoc, em fase sólida, no aparelho de síntese PSSM8 (Shimadzu). Em seguida, esses foram submetidos ao processo de purificação por cromatografia líquida de alta eficiência e posteriormente suas identidades foram confirmadas por espectrometria de massas, em um espectrômetro equipado com sistema de geração de ions na forma de *spray* (ESI) e detecção de massas por *time of flight* (TOF - Micromass).

3.10. ELISPOT

A técnica de ELISPOT foi adaptada de um protocolo anteriormente descrito (Carvalho et al., 2001). Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços com fundo de nitrocelulose (Millipore) previamente incubadas durante uma noite, a 4°C, com 50µl por poço de um anticorpo monoclonal anti IFN-γ (clone R4-6A2; BD Biosciences Pharmingen) diluído a 5µg/ml em PBS estéril. Antes da adição das células, as placas foram bloqueadas durante 2 horas, a 37°C, com 200µl por poço de RPMI 1640 (Sigma) suplementado com 5% de SFB.

Os esplenócitos totais, alvos da re-estimulação *in vitro*, foram obtidos de camundongos vacinados com uma ou duas doses de vírus recombinantes. Os baços foram macerados e as suspensões obtidas foram centrifugadas a 300xg, por 5 minutos. Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise de hemácias, composto de 150mM de NH₄Cl, 1mM de KHCO₃ e 100µM de Na₂-EDTA por três minutos. Após três lavagens, os esplenócitos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 contendo 10% SFB. Para a re-estimulação dos esplenócitos foram utilizados peptídeos sintéticos MHC classe I restritos (50µM) e TLA (5 ou 10µg/ml).

Após 24 horas de incubação, as células foram descartadas e as placas lavadas quatro vezes com PBS acrescido de 0,01% de Tween 20 (PBS/T20). A detecção do IFN-γ foi feita com um anticorpo monoclonal anti-IFN-γ conjugado com biotina (clone XMG1.2; BD

Biosciences), o qual foi diluído a 2µg/ml em PBS/T20, adicionado às placas a 50µl por poço e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A detecção do IFN-γ complexado ao anticorpo específico foi feita com conjugado de estreptoavidina-peroxidase (BD Biosciences Pharmingen), diluída 1:2000 em PBS/T20 e incubada nas placas a 50µl por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente. Os *spots* foram revelados com solução de 2mM de DAB (3,3' diaminobenzidine, Sigma) e 1,5ml/ml de H₂O₂ em tampão Tris-HCL 100mM pH 7.5. A contagem dos spots foi realizada no aparelho ImmunoSpot, C.T.L. (Cellular Technology Ltd.).

3.11. Ensaio de estimulação de esplenócitos *in vitro* para dosagem de citocinas

Baços foram macerados individualmente e submetidos a lise de eritrócitos com tampão de lise de hemácias. As células foram ressuspendidas em meio de cultivo RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25mM de HEPES, 1mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sódio, 50µM de β-mercaptoetanol e 100U/ml de penicilina e estreptomicina. As células foram semeadas a 10⁶/poço em placas de 96 poços, juntamente com TLA (10µg/ml), peptídeos MHCII restritos derivados das SAGs ou peptídeo controle de β-galactosidase (50µM). As células foram incubadas por 24, 48 ou 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Para detecção das citocinas IFN-γ, IL-4 e IL-10 secretadas no sobrenadante após a incubação, os sobrenadantes livres de células foram testados com *kits* comerciais de ELISA (RD Systems) de acordo com especificações do fabricante.

3.12. Análise estatística

As curvas de mortalidade dos diferentes grupos vacinais após infecção com ME49 de *T. gondii* foram comparadas usando teste de Qui-Quadrado (*log-rank* Mantel-Cox *Test*). Para comparação dos valores de cistos cerebrais foi utilizado o teste t de Mann-Whitney e para os valores de IgGs nos Elisas de soro foi utilizado o teste t pareado. Os valores de células T produtoras de IFN-γ e a quantidade de citocinas secretadas por esplenócitos de animais vacinados submetidos a diferentes tratamentos de estimulação foram comparados por meio de teste ANOVA, com pós-teste de Bonferrone para comparação de todos os pares de tratamentos. Todos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism, versão 5.0 e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando p<0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Protocolo de vacinação homólogo com AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3

4.1.1. Resposta imune humoral após vacinação: produção de IgGs anti-SAG

Adenovírus recombinantes codificando três antígenos de superfície de *T. gondii*, SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2) e SAG3 (AdSAG3), foram inicialmente empregados em ensaios de vacinação de camundongos C57BL/6 de acordo com um protocolo do tipo iniciação/reforço homólogo, no qual os animais receberam duas doses de adenovírus por via subcutânea, com intervalo de seis semanas entre as doses.

Para verificar se os camundongos imunizados com adenovírus recombinantes produziam anticorpos específicos contra as proteínas SAGs foi realizado um ensaio de *Western-blot*, no qual amostras de soro coletadas duas semanas após a última dose de vírus recombinante foram testadas individualmente contra extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA). A figura 6 mostra que os soros de camundongos imunizados com duas doses de AdSAG1, AdSAG2 ou AdSAG3 reagiram especificamente com as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 presentes no extrato total de taquizoítos de *T. gondii*. Isso indica que essas proteínas foram corretamente expressas *in vivo* e que essa expressão foi seguida de uma liberação satisfatória dos antígenos para estimulação de linfócitos B. As alturas das bandas observadas estão de acordo com o tamanho esperado para cada proteína, a saber, SAG1 30Kd, SAG2 22Kd e SAG3 43Kd.

Os níveis de anticorpos IgG de diferentes classes foram detectados em reações de ELISA, com soros obtidos dos animais após a primeira e a segunda dose de adenovírus recombinantes. A figura 7A mostra que após a primeira dose de adenovírus recombinante, foi possível detectar produção de IgG total para os três adenovírus recombinantes em relação ao grupo AdCTRL. No caso dos animais imunizados com AdSAG3, detecta-se também produção de IgG1 já na primeira imunização. Após a segunda dose (figura 7B) observa-se aumento nos níveis de IgG total para todos os adenovírus codificando SAGs em relação ao grupo AdCTRL. Os animais vacinados com AdSAG2, entretanto, produziram quantidades menores de IgG total ($0,2826 \pm 0,1568$) se comparado aos grupos de receberam AdSAG1 ($0,7521 \pm 0,0755$) ou AdSAG3 ($0,7131 \pm 0,2377$). Com relação a IgG1 novamente observa-se produção significativa somente no grupo imunizado com AdSAG3 ($1,3145 \pm 0,4090$).

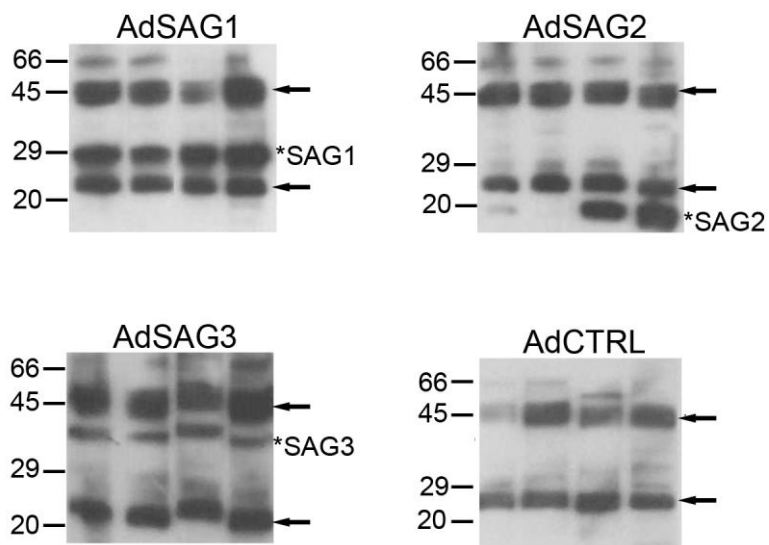


Figura 6 – Resposta imune humoral em camundongos vacinados com adenovírus recombinantes. Camundongos C57BL/6 foram vacinados com duas doses subcutâneas de 10^9 p.f.u. de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL. Amostras de soro obtidas duas semanas após a última imunização foram testadas em *Western-blot* contra extrato total de taquizoítos de *T. gondii*. Os asteriscos indicam a altura das bandas das proteínas SAG1, SAG2 ou SAG3 (30, 22 e 43 kD, respectivamente). As setas indicam reações inespecíficas produzidas pelo anticorpo secundário. Representativo de quatro animais/grupo testados individualmente.

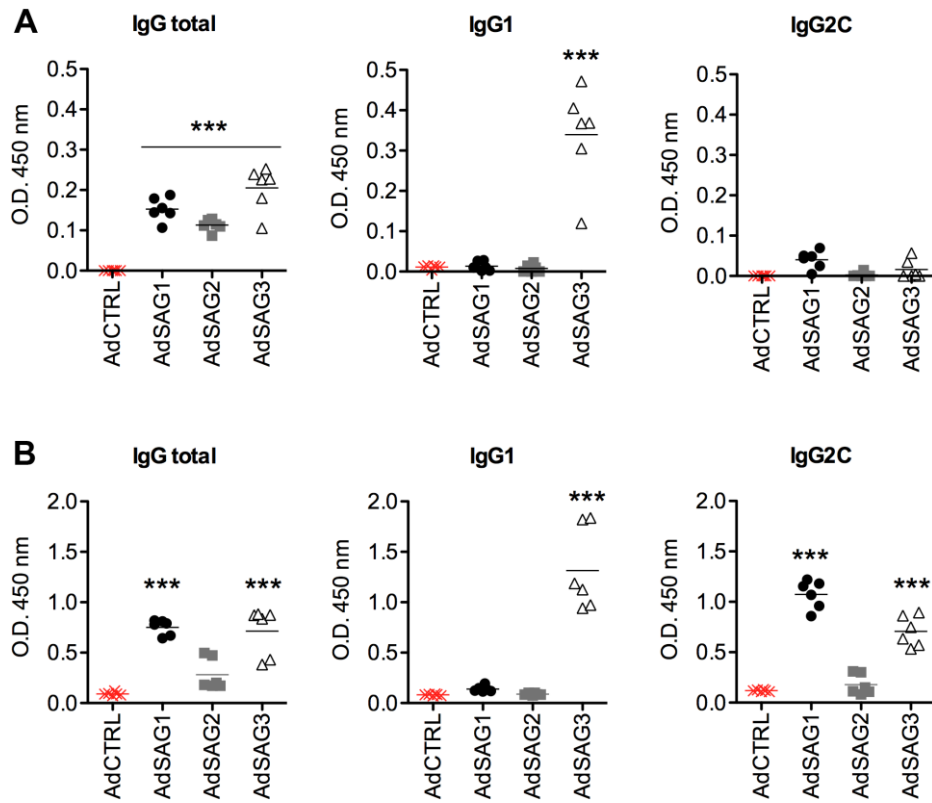


Figura 7 – Detecção de anticorpos anti-SAG em soro de animais vacinados com adenovírus recombinantes. Camundongos C57BL/6 foram vacinados com duas doses subcutâneas de 10^9 p.f.u. de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL. Amostras de soro foram coletadas de seis animais/grupo, duas semanas após a primeira (A) e segunda dose (B) vacinal e foram testadas em ELISA contra extrato total de taquizoítos de *T. gondii* para detecção dos níveis de anticorpos anti-SAG da classe IgG total e dos subtipos IgG1 e IgG2C. (***) indica que o nível de anticorpos anti-SAG é significativamente maior em comparação ao grupo vacinado com o AdCTRL ($p < 0,001$).

No caso de IgG2C detecta-se altos níveis desse isotipo tanto no grupo AdSAG1 quanto AdSAG3 ($1,074 \pm 0,1406$ e $0,7076 \pm 0,1513$, respectivamente) se comparado ao grupo AdCTRL ($0,1166 \pm 0,0088$). Além disso, quando analisamos a razão IgG2C/IgG1 houve uma tendência de resposta do tipo Th1 no grupo que recebeu AdSAG1, já que a produção de IgG2C foi aproximadamente dez vezes maior que a de IgG1 ($1,074 \pm 0,1406$ e $0,1398 \pm 0,0286$, respectivamente). Já no caso da imunização com AdSAG3 houve tendência de resposta do tipo Th2, com produção de IgG1 superior a IgG2C ($1,3145 \pm 0,4090$ e $0,7076 \pm 0,1513$, respectivamente).

4.1.2. Resposta imune celular após a vacinação: produção de citocinas Th1 x Th2

A resposta imune celular induzida pela vacinação com adenovírus recombinantes foi avaliada através de um ensaio de estimulação de células T *in vitro* no qual esplenócitos dos animais vacinados, obtidos após a última dose de vírus, foram cultivados na presença ou ausência de TLA, por 24 ou 48 horas. A resposta imune induzida foi então avaliada através da dosagem dos níveis de citocinas Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4) e da citocina imunoreguladora IL-10 no sobrenadante de cultivo dos esplenócitos por meio de ensaios de ELISA.

A estimulação dos esplenócitos por 24 horas não levou a secreção de níveis detectáveis de nenhuma das citocinas, por qualquer um dos grupos vacinais (dados não mostrados). Após 48 horas concentrações significativas de IFN- γ foram detectadas em cultivos de esplenócitos dos animais vacinados com AdSAG1 e AdSAG2. A produção de IFN- γ pelo grupo AdSAG1 foi bastante marcante ($1153,843 \pm 55,053$) e significativamente maior que a apresentada pelo grupo AdSAG2 ($470,4 \pm 89,198$). O grupo AdSAG3 apresentou secreção de IFN- γ acima dos níveis basais, no entanto, como pode ser observado na figura 8, a produção de IFN- γ não parece ser especificamente relacionada a antígenos de *T. gondii*, na medida em que os esplenócitos do grupo AdSAG3 também secretaram a citocina na ausência de estimulação.

Quanto a IL-4 e IL-10 observou-se que a produção dessas citocinas não ultrapassa níveis basais, mesmo após 48 horas de incubação com antígenos de *T. gondii*. Consistente com o que foi observado anteriormente na produção de anticorpos, o perfil de produção de citocinas após a vacinação com AdSAG1 e AdSAG2 evidencia um desvio da resposta imune para um perfil pró-inflamatório Th1 (figura 8).

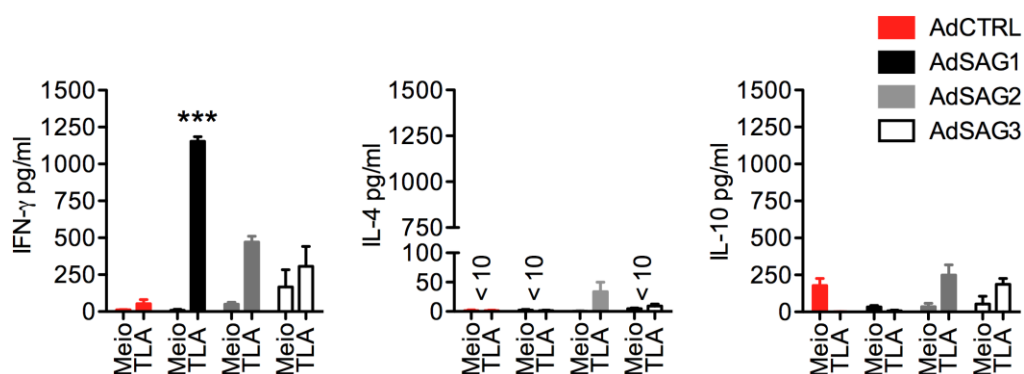


Figura 8 – Detecção de citocinas Th1 e Th2 em camundongos vacinados com adenovírus recombinantes. Camundongos C57BL/6 foram vacinados com duas doses subcutâneas de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL. Esplenócitos obtidos 2 semanas após a última imunização foram cultivados *in vitro* na presença ou ausência (Meio) de extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA), por 48 horas. Os sobrenadantes desses cultivos foram testados em ensaios de ELISA para dosagem das citocinas IFN- γ (esquerda), IL-4 (centro) e IL-10 (direita). As barras representam a média \pm desvio padrão de três animais testados individualmente. Dados representativos de um experimento de imunização, dentre dois experimentos que foram realizados independentemente com resultados semelhantes. (***) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com os demais grupos ($p < 0,001$).

4.1.3. Mapeamento de epítomos restritos a MHCI nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3

As proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 foram submetidas a uma análise *in silico* para identificação de possíveis epítomos ligantes de MHC de classe I (MHCI) murino. A predição computacional de epítomos nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 foi realizada através da análise das seqüências dessas proteínas no programa SYFPEITHI, o qual permite identificar seqüências peptídicas que apresentam afinidade por moléculas H2-L, -K ou -D. No caso da resposta às SAGs, o nosso maior interesse foi verificar se essas proteínas apresentavam seqüências ligantes de moléculas H2 de haplótipo “b” (C57BL/6), o qual foi previamente indicado como haplótipo relacionado com susceptibilidade a toxoplasmose (Resende et al., 2008b). Para cada SAG foram identificadas uma série de seqüências de nove aminoácidos com potencial para ligação em MHCI, mas apenas os ligantes de H2-K,D,L^b que alcançaram um *score* mínimo de ligação superior a 21 foram selecionados para síntese, como demonstrado na tabela 2 abaixo. O valor do *score* é calculado pelo programa e representa uma medida da probabilidade do peptídeo apresentar afinidade de ligação pela molécula de MHCI do haplótipo correspondente. Nota-se que o programa SYFPEITHI não detectou possíveis peptídeos específicos para o haplótipo H2-K,L ou D^b na proteína SAG2. Os peptídeos listados abaixo foram usados em ensaios de re-estimulação *in vitro* de esplenócitos de animais vacinados com adenovirus recombinantes para avaliar a ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ .

Tabela 2 – Peptídeos ligantes de MHCI derivados das proteínas SAG1 e SAG3 de *T. gondii*

Peptídeo	Proteína	Seqüência	Ligante	Score
SP0534	SAG1	TPTENHFTL	H2-D ^b	22
SP0540	SAG3	SKDANFIEI	H2-D ^b	25
SP0541	SAG3	SGPVNLEVD	H2-L ^b	23
SP0542	β -galactosidase	TPHPARIGL	H2-D ^d	25

As seqüências dos peptídeos foram preditas em software SYFPEITHI

4.1.4. Resposta imune celular após vacinação: identificação de linfócitos T CD8⁺ específicos

Para avaliar a capacidade dos adenovirus recombinantes SAG1, SAG2 e SAG3 em ativar células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ nos animais submetidos ao protocolo de vacinação homólogo foi empregado o ensaio de ELISPOT. Esplenócitos obtidos de 2-3 animais por grupo, duas a quatro semanas após a última dose de imunização, foram

submetidos à re-estimulação com peptídeos sintéticos restritos a MHCI derivados das proteínas SAG1 e SAG3. Os peptídeos SP0534, SP0540 e SP0541 (ligantes de H2-L,D^b), foram selecionados para os ensaios com camundongos C57BL/6. Como controle negativo de estimulação foi empregado o peptídeo H2-L^d-específico TPHPARIGL (SP0542) derivado da β -galactosidase (*lacZ*) de *E. coli* (Bruna-Romero et al., 1997).

Os resultados dos ensaios com os peptídeos nos camundongos C57BL/6 (figura 9) mostraram que a imunização de animais com AdSAG1 levou a ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo de SAG1 em níveis significativos tanto após a primeira dose vacinal ($92 \pm 8,485$) quanto após a segunda ($227 \pm 11,313$) em relação aos demais grupos e tratamentos analisados ($p < 0,001$). Não foi possível detectar uma resposta significativa aos epítipos de SAG3 após a vacinação dos animais com AdSAG3.

4.1.5. Avaliação da proteção de animais vacinados: proteção contra desafio com *T. gondii*

Para determinar se a resposta imune contra as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 induzida pela vacinação com adenovírus recombinante codificando os respectivos genes era capaz de proteger camundongos contra infecção com *T. gondii*, grupos de camundongos C57BL/6 vacinados com duas doses de adenovírus recombinantes foram desafiados oralmente com a cepa ME49 de *T. gondii*. A mortalidade foi acompanhada por 50 dias após a infecção, quando os animais sobreviventes foram sacrificados para contagem da carga de cistos cerebrais.

Os níveis de sobrevivência dos diferentes grupos foram: 60-75% dos animais vacinados com AdSAG1, 25-35% dos animais que recebem AdSAG2 ou AdSAG3 e 10-20% dos animais vacinados com AdCTRL e animais não imunizados (figura 10A). Além de apresentar maior sobrevivência, o grupo AdSAG1 foi o que apresentou a menor carga parasitária cerebral (137 ± 125 cistos).

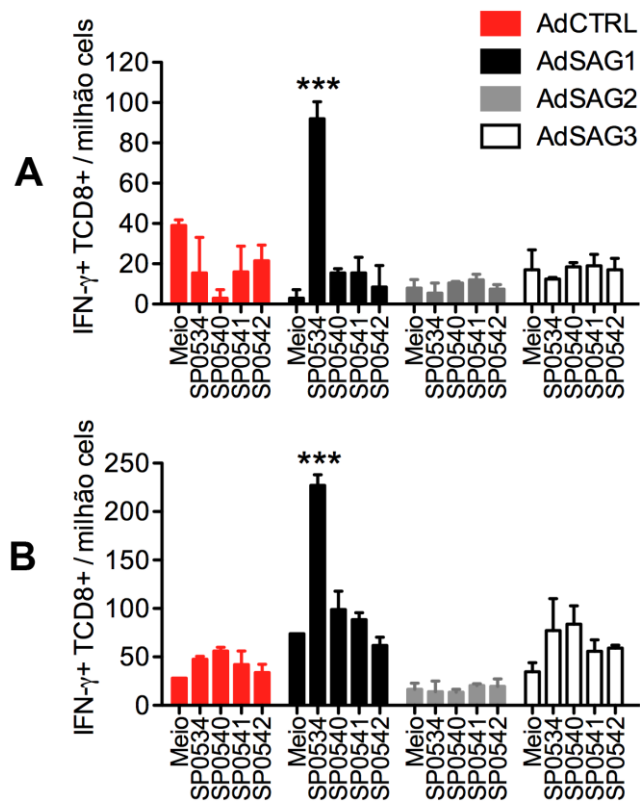


Figura 9 – Identificação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ em animais vacinados com adenovírus recombinantes. Camundongos C57BL/6 foram vacinados com uma dose (A) ou duas doses (B) dos adenovírus recombinantes AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL. Esplenócitos foram coletados 2 semanas após as imunizações e cultivados *in vitro* durante 24 horas na presença ou ausência (Meio) de peptídeos sintéticos ligantes de MHC1 derivados das proteínas SAG1 (SP0534), SAG3 (SP0540 e SP0541) ou β -galactosidase (SP0542). As células produtoras de IFN- γ foram, então, detectadas num ensaio de ELISPOT. As barras representam a média \pm desvio padrão de três animais testados individualmente. Dados representativos de um experimento de imunização, dentre dois experimentos que foram realizados independentemente com resultados semelhantes. (***) indica diferença estatisticamente significativa em comparação com os demais grupos ($p < 0,001$).

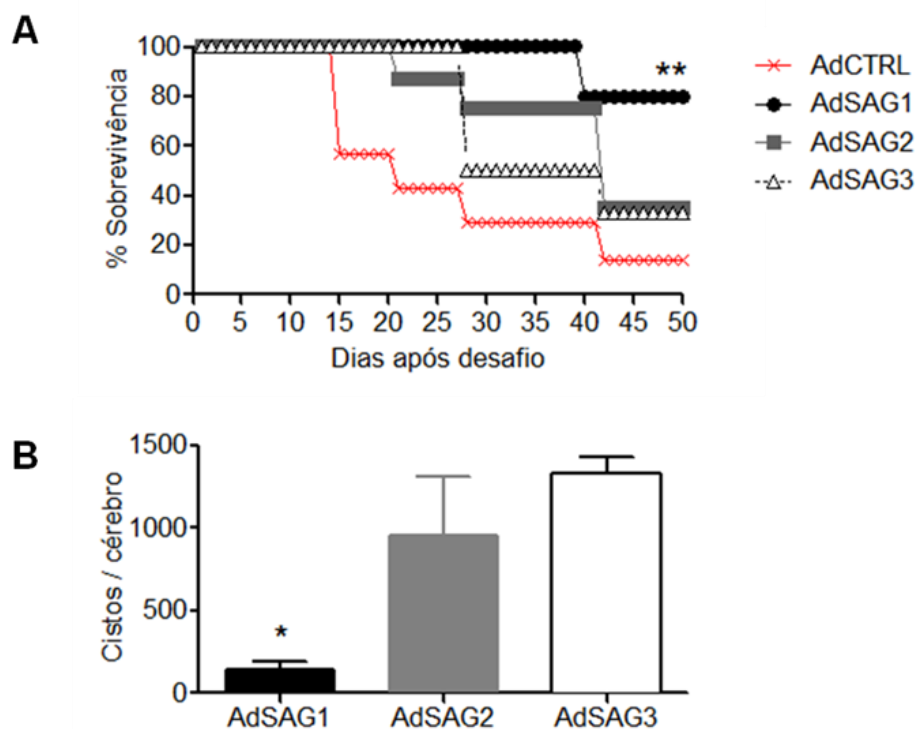


Figura 10 – Ensaio de proteção contra *T. gondii* em camundongos vacinados com adenovírus. Camundongos C57BL/6 vacinados com duas doses de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL foram desafiados com cepa cistogênica de *T. gondii*, duas semanas após a última imunização. (A) Curva de sobrevivência dos animais após desafio; (B), carga de cistos cerebrais dos animais sobreviventes, 50 dias após o desafio. Representativo de dois experimentos realizados independentemente, com 10 animais/grupo, e com resultados semelhantes. As barras representam a média \pm desvio padrão do número de cistos dos animais sobreviventes testados individualmente (**) indica diferença que a taxa de sobrevivência dos animais vacinados com AdSAG1 é significativamente maior que a dos demais grupos ($p < 0,01$); (*) indica que o número de cistos cerebrais nos animais vacinados com AdSAG1 é significativamente menor que nos demais grupos ($p < 0,05$).

Nos demais grupos os números obtidos foram 1200 ± 380 cistos para animais não imunizados, 1375 ± 883 cistos em animais vacinados com AdSAG2 e 1325 ± 176 cistos em animais imunizados com AdSAG3 (figura 10B). O único animal sobrevivente do grupo AdCTRL também apresentou um alto número de cistos cerebrais (1000).

Os experimentos evidenciam que o AdSAG1 é o mais eficiente na geração de resposta imune e proteção contra a toxoplasmose aguda e crônica. Levando em consideração o sucesso da vacinação com AdSAG1, decidimos focalizar as próximas etapas do nosso estudo nesse adenovírus no intuito de avaliar os mecanismos envolvidos na proteção observada.

4.1.6. Avaliação do papel dos linfócitos T CD8⁺ e do IFN- γ na proteção de camundongos imunizados com AdSAG1

Linfócitos T CD8⁺ são considerados importantes mediadores de proteção contra o *T. gondii* (Lepage et al., 1998; Tait et al., 2010). Essas células, juntamente com os linfócitos T CD4⁺, contribuem com a produção de IFN- γ durante a fase tardia da resposta imune, além de atuarem na prevenção da reativação da infecção crônica através da eliminação de cistos cerebrais via sua atividade citotóxica mediada por perforina (Suzuki et al., 2010). Além disso, reações pró-inflamatórias dependentes de IFN- γ são essenciais para a resistência contra taquizoítos durante a fase aguda da infecção (Denkers and Gazzinelli, 1998; Zhao et al., 2009). Para verificar o papel dos linfócitos T CD8⁺ e do IFN- γ na proteção contra o *T. gondii* induzida pelo nosso protocolo de imunização, camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ ($\beta 2$ microglobulina^{-/-}) ou em IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) foram vacinados com duas doses de AdSAG1 e desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*. A proteção contra desafio foi comparada com os níveis obtidos com a vacinação de camundongos C57BL/6 selvagens.

Todos os camundongos IFN- γ ^{-/-}, inclusive os vacinados com AdSAG1, morreram duas semanas após o desafio. A mortalidade também atingiu 100% nos grupos de animais deficientes em linfócitos T CD8⁺, independente da vacinação recebida. No entanto, a morte dos animais deficientes em células T CD8⁺ ocorreu numa taxa mais lenta que nos grupos deficientes em IFN- γ , com parte dos animais sucumbindo na fase aguda e parte na fase crônica da doença, em torno de seis semanas após o desafio. Como observado em experimentos anteriores, os camundongos C57BL/6 selvagens vacinados com AdSAG1 apresentaram altos níveis de sobrevivência (figura 11A).

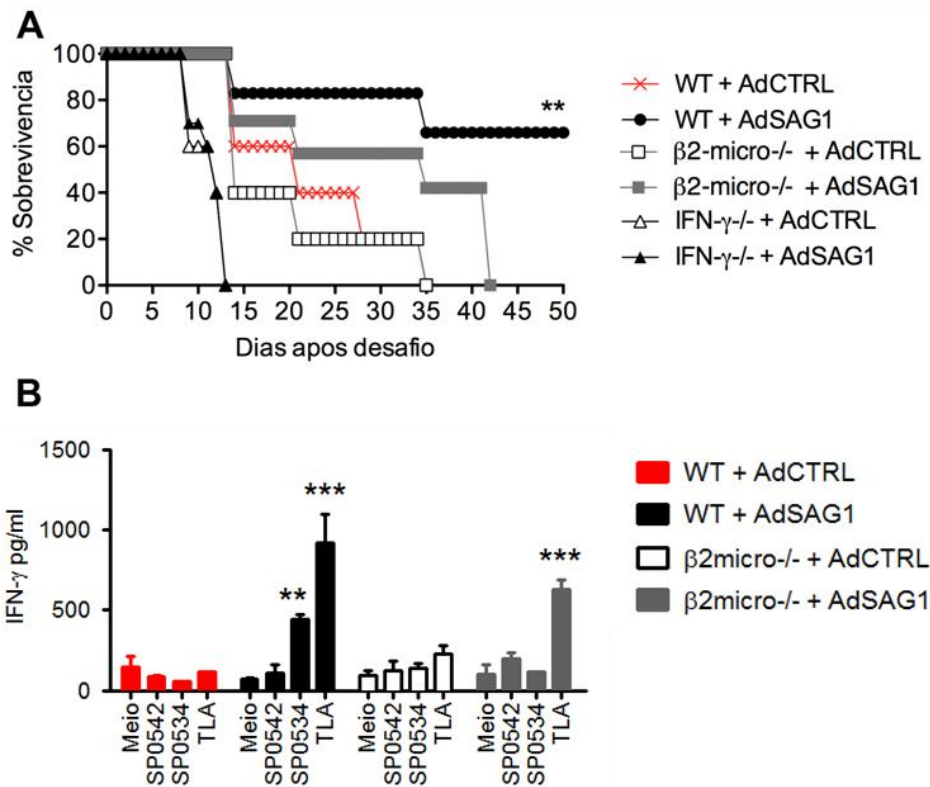


Figura 11 – Papel dos linfócitos T CD8⁺ e do IFN-γ na indução de proteção de camundongos C57BL/6 imunizados com adenovírus SAG1. Camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT), ou deficientes em IFN-γ (IFN-γ^{-/-}) ou deficientes em células T CD8 (β2-micro^{-/-}) foram imunizados com duas doses de adenovírus recombinantes (AdSAG1 ou AdCTRL). Os animais foram desafiados com 10 cistos da cepa ME49 de *T. gondii*, duas semanas após a última dose de vírus. A mortalidade (A) foi acompanhada diariamente após infecção. O asterisco indica diferença significativa entre o grupo de animais selvagens que recebeu AdSAG1 e demais grupos, sendo (**) $p < 0,01$. (B) Esplenócitos obtidos duas semanas após a segunda imunização foram cultivados na presença ou ausência (Meio) de diferentes antígenos por 48 horas para dosagem de IFN-γ. Os asteriscos indicam diferenças significativa entre o grupo de animais selvagens que receberam AdSAG1 e os respectivos grupos controle, sendo (**) $p < 0,01$ e (***) $p < 0,001$.

Ainda, a produção de IFN- γ após vacinação foi comparada entre camundongos deficientes em linfócitos T CD8⁺ e camundongos selvagens. Esplenócitos totais obtidos dos animais vacinados foram submetidos a re-estimulação com TLA por 48 horas para posterior dosagem de IFN- γ nos sobrenadantes dos cultivos. Apesar de produzirem IFN- γ , nota-se que os animais deficientes em linfócitos T CD8⁺ apresentaram tendência de redução da produção daquela citocina (figura 11B).

4.1.7. Avaliação dos mecanismos de resposta imune inata envolvidos na ativação dos linfócitos TCD8⁺ e na produção de IFN- γ na vacinação com AdSAG1

A secreção de IL-12 por células do sistema imune inato durante o início da infecção é um fator chave para a proteção contra a toxoplasmose (Gazzinelli et al., 1994; Vossenkamper et al., 2004). Um dos seus papéis é a ativação de linfócitos, incluindo os linfócitos T CD8⁺, dirigindo sua diferenciação em células secretoras de IFN- γ (Yap et al., 2000). A molécula MyD88, conhecida por atuar como adaptadora na via de sinalização dos TLRs, é reconhecida como um fator importante para a ativação de resposta imune inata, levando a produção de IL-12 pelas APCs, além de ter sido associada com as propriedades adjuvantes de algumas vacinas (Park et al., 2008). Caracteristicamente, a secreção de IL-12 é um evento típico que se segue a ativação da via dos TLRs durante a fase inata da resposta imune contra uma série de patógenos, incluindo o *T. gondii* (LaRosa et al., 2008). Assim, ativação da via dos TLR é importante para a proteção contra o *T. gondii*, já que camundongos MyD88^{-/-} são tão susceptíveis quanto os IL-12^{-/-} nocautes à infecção com cepas pouco virulentas do parasita (Sukhumavasi et al., 2008).

No presente modelo de vacinação, nós hipotetizamos que inicialmente os adenovírus recombinantes ativariam o sistema imune dos camundongos vacinados via TLRs/MyD88 ao infectar APCs levando a produção da citocina IL-12, o que coincidiria com a expressão e apresentação dos antígenos expressos pelos adenovírus. Células T CD8⁺ e T CD4⁺ específicas para os antígenos recombinantes reconheceriam os epítopos apresentados na superfície das APCs e na presença de um sinal co-estimulador, como a IL-12, elas seriam ativadas e se desenvolveriam em células secretoras de IFN- γ .

Para investigar essa hipótese, camundongos deficientes em IL-12 ou MyD88 foram vacinados com duas doses de AdSAG1 e submetidos ao desafio oral com cistos da cepa ME49 de *T. gondii*.

A figura 12A mostra que, ao contrário dos animais selvagens, houve 100% de mortalidade, 21 dias após a infecção, dos animais deficientes em MyD88 vacinados com AdSAG1. Consistentemente, a capacidade dos esplenócitos dos animais MyD88 nocautes em responderem ao TLA ou ao peptídeo MHC I restrito SP0534 e gerarem produção de IFN- γ *in vitro* foi praticamente abolida (figura 12B). Para descartar falha de vacinação como causa primária da irresponsividade dos MyD88^{-/-} realizou-se a dosagem de IgG total no soro desses animais. A figura 12C mostra que os camundongos MyD88^{-/-} produziram altos níveis de IgG total, o que indica eficiente expressão protéica do gene SAG1 nesses animais.

Do mesmo modo que os camundongos deficientes em MyD88, a ausência de IL-12 durante o início da infecção também interferiu na capacidade do AdSAG1 em induzir resposta imune protetora contra *T. gondii*. Todos os camundongos deficientes em IL-12 (IL-12^{-/-}) sucumbiram duas semanas após a infecção com *Toxoplasma* (figura 13). Além disso, do mesmo modo que nos animais MyD88^{-/-}, os esplenócitos obtidos desses animais não foram capazes de responder a re-estimulação *in vitro*, apesar de ter havido eficiente expressão do transgene *in vivo* como demonstrado pelos níveis de produção de IgG total em ensaio de Elisa no soro dos animais vacinados com AdSAG1. Em conjunto, esses resultados indicam que a ativação da via dos TLR/MyD88 é um dos eventos chave para a indução de uma forte resposta imune celular durante a vacinação com adenovírus recombinante codificando SAG1.

4.2. Protocolo de vacinação heterólogo

4.2.1. Geração dos MVAs recombinantes com genes SAG1 e SAG2 de *T. gondii*.

Numa tentativa de melhorar os níveis de proteção obtidos com os adenovírus recombinantes, construímos MVA recombinantes codificando as proteínas SAG1 e SAG2, para serem usados como dose de reforço após a primo-imunização com os adenovírus correspondentes.

Os genes que codificam para as proteínas SAG1 e SAG2 de *T. gondii* foram clonados no vetor de transferência pLW44 para construção dos MVAs recombinantes (figura 14A). Para verificar se os genes haviam sido corretamente inseridos no pLW44, procedeu-se à digestão de vários clones com enzimas de restrição. Para a construção pLW44-SAG1 foram utilizadas as enzimas *Xho*I e *Bam*HI originando os fragmentos de 5169, 527 e 262pb. Para o

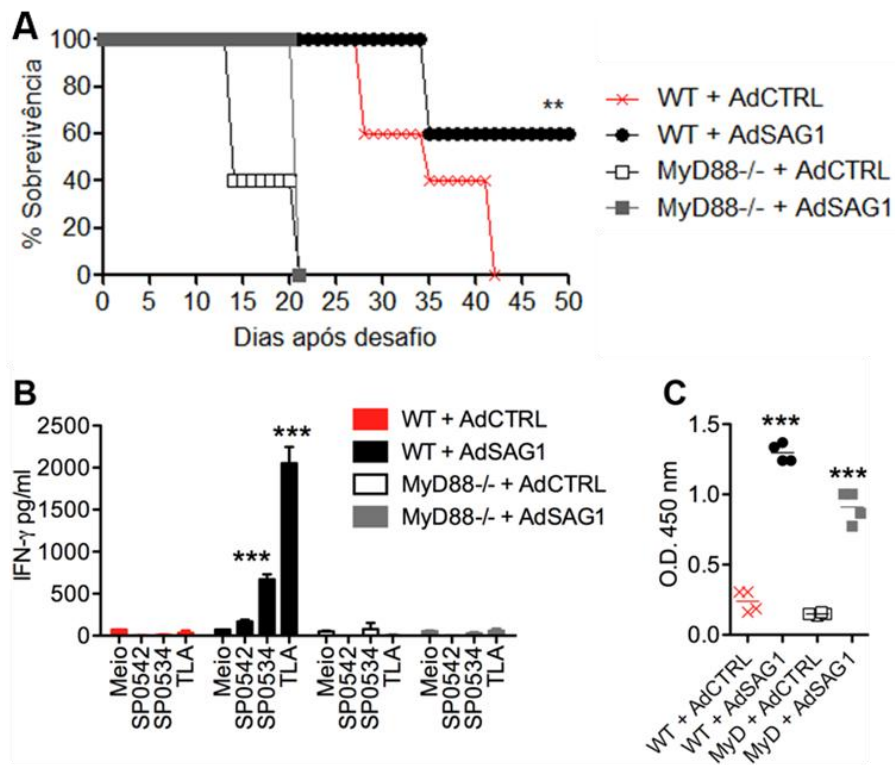


Figura 12 – Avaliação dos mecanismos de resposta imune inata envolvidos na proteção de camundongos C57BL/6 vacinados com adenovírus recombinante SAG1. Grupos de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) ou deficientes em MyD88 (MyD88^{-/-}) foram imunizados com duas doses de adenovírus recombinantes (AdSAG1 ou AdCTRL). (A) Curva de sobrevivência de animais desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*, duas semanas após a última imunização. (**) indica sobrevivência significativamente maior ($p < 0,01$). (B) Níveis de IFN- γ produzidos por animais vacinados, medidos em sobrenadantes de cultivos de esplenócitos, duas semanas após a última vacinação. As barras representam a média \pm desvio padrão de três animais testados individualmente. (***) indica nível de IFN- γ significativamente maior ($p < 0,001$). (C) Níveis de anticorpos anti-SAG1 (IgG total) no soro dos animais vacinados, duas semanas após a segunda dose de adenovírus (***) $p < 0,001$).

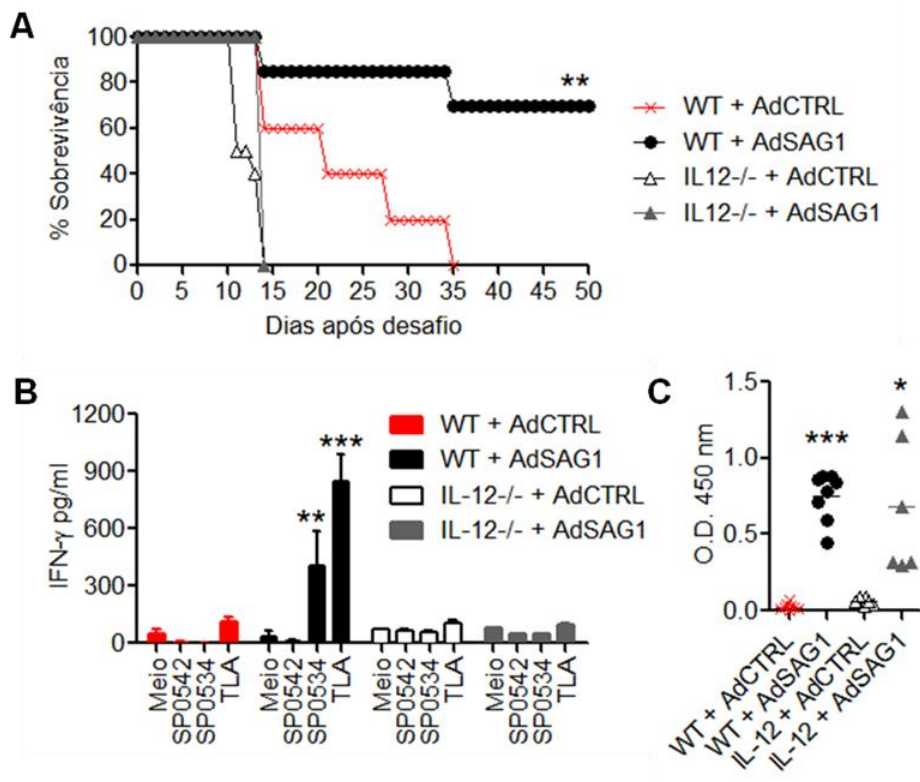


Figura 13 – Avaliação dos mecanismos de resposta imune inata envolvidos na proteção de camundongos C57BL/6 vacinados com adenovírus recombinante SAG1: papel da citocina IL-12. Grupos de camundongos C57BL/6 do tipo selvagem (WT) ou deficientes em IL-12 (IL-12^{-/-}) foram imunizados com duas doses de adenovírus recombinantes (AdSAG1 ou AdCTRL). (A) Curva de sobrevivência de animais desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*, duas semanas após a última imunização. (**) indica sobrevivência significativamente maior ($p < 0,01$). (B) Níveis de IFN- γ produzidos por animais vacinados, medidos em sobrenadantes de cultivos esplenócitos, duas semanas após a última vacinação. As barras representam a média \pm desvio padrão de três animais testados individualmente. Asteriscos indicam nível de IFN- γ significativamente maior (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). (C) Níveis de anticorpos anti-SAG1 (IgG total) no soro dos animais vacinados, duas semanas após a segunda dose de adenovírus (** $p < 0,001$; * $p < 0,05$).

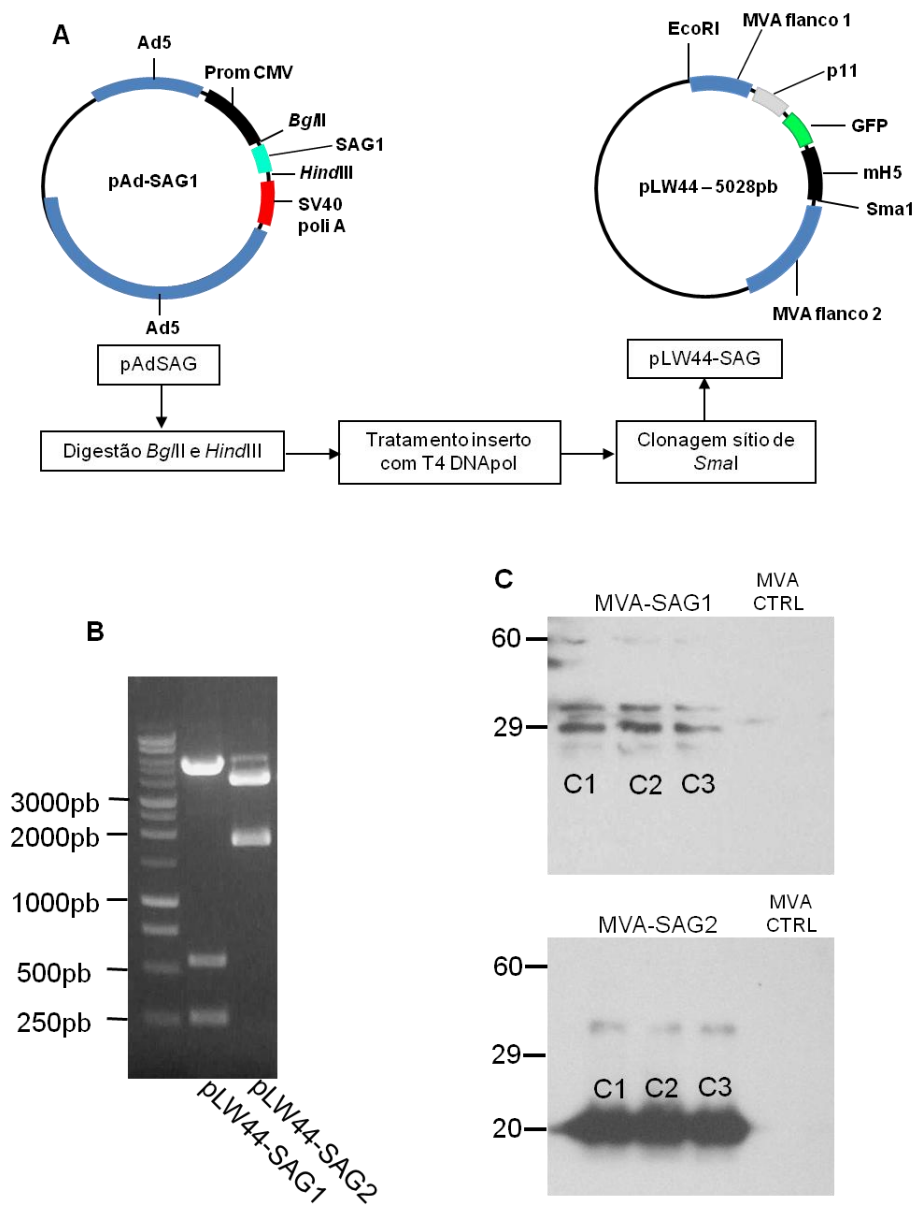


Figura 14 – Construção de um MVA recombinante com genes SAG1 e SAG2 de *Toxoplasma gondii*. A, as seqüências de SAG1 e SAG2 previamente clonadas no vetor pAd, foram clivadas e clonadas no sítio *SmaI* do vetor pLW44. B, perfil de digestão dos construtos pLW44-SAG1 e pLW44-SAG2 para verificar a orientação dos insertos. C, Os vírus foram construídos por meio de recombinação homóloga entre MVA selvagem e o vetor pLW44. A expressão de SAG1 e SAG2 foi testada por meio de *Western-blot* de células infectadas contra soro de animal vacinado com adenovírus que expressam as respectivas proteínas. C1, clone 1, C2, clone 2 e C3, clone 3.

recombinante pLW44-SAG2 empregou-se *EcoRI* e *BglII* o que gerou os fragmentos de 3756 e 1797pb (figura 14B).

A capacidade dos MVA recombinantes em induzir a expressão das proteínas foi verificada por meio de *Western-blot*, no qual os extratos de células CEFs infectadas com MVA-SAG1 e MVA-SAG2 foram testados contra soro de camundongos BALB/c imunizados com adenovírus recombinantes para as respectivas proteínas. A infecção, com os dois recombinantes, gerou uma intensa expressão das proteínas, que reagem prontamente e com grande especificidade com soro de animal vacinado (figura 14C).

4.2.2. Protocolo de vacinação heterólogo: resposta imune humoral dos animais imunizados

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com duas doses de adenovírus recombinante SAG1 (protocolo homólogo, como descrito anteriormente) ou com uma dose de iniciação de AdSAG1 e uma dose de reforço de MVASAG1 (protocolo heterólogo). Para verificar se camundongos imunizados com duas doses de vírus recombinantes produziam anticorpos anti-SAG1, amostras de soros obtidos dos animais vacinados, duas semanas após a dose de reforço vacinal, foram submetidas a ensaios de *Western blot* contra TLA. Na figura 15A pode-se observar que os soros dos animais vacinados com vírus codificando SAG1 mostraram reatividade com uma banda na altura de 30kD, correspondente ao antígeno SAG1. O ensaio de ELISA mostrou que os anticorpos são do tipo IgG (figura 15B). Os níveis de anticorpos obtidos foram comparáveis entre os dois protocolos de vacinação e, nos dois casos, houve predomínio de anticorpos da subclasse IgG2C em relação a IgG1. Esses dados indicam uma tendência de resposta do tipo Th1 em todos os grupos vacinados com vírus recombinantes contendo SAG1.

4.2.3. Protocolo de vacinação heterólogo: resposta imune celular dos animais imunizados

Camundongos C57BL/6 foram imunizados com vírus recombinantes codificando o antígeno SAG1, de acordo com o protocolo homólogo (duas doses seqüenciais de AdSAG1) ou com o protocolo heterólogo (uma dose de AdSAG1 seguida de uma dose de MVASAG1). Duas semanas após a última vacinação, esplenócitos foram obtidos dos animais imunizados e submetidos a ensaio de ELISPOT, usando como estímulo *in vitro* TLA ou o epítopo SP0534.

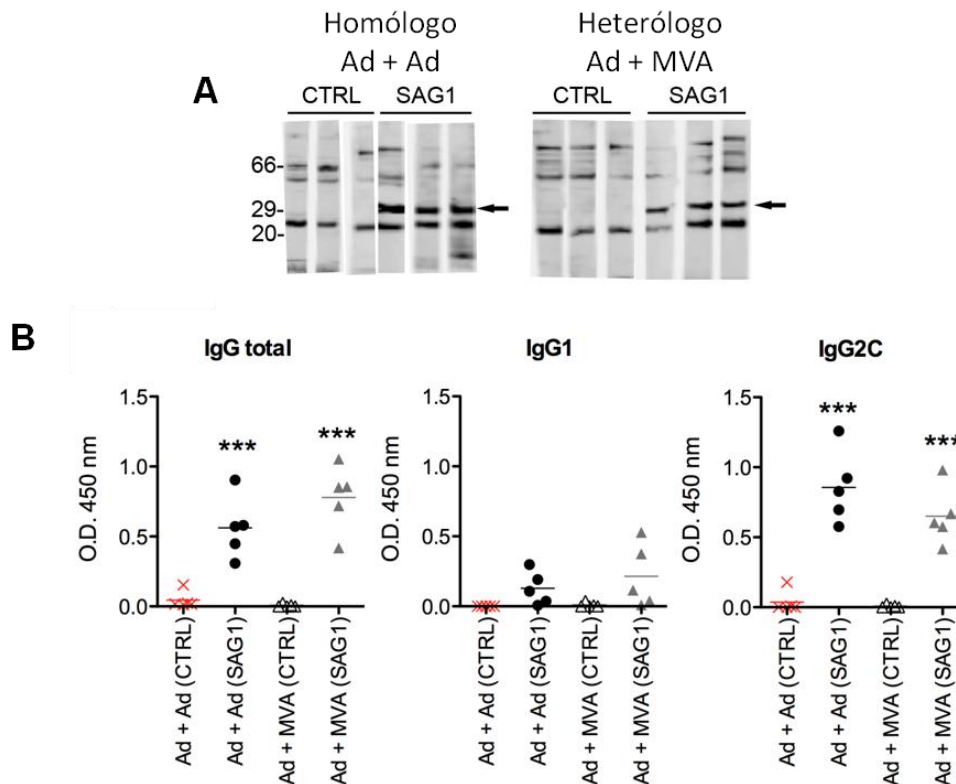


Figura 15 - Resposta imune humoral animais vacinados com vetores virais recombinantes codificando o antígeno SAG1. (A) *Western-blot* realizado com soros de camundongos C57BL/6 obtidos após a segunda dose de vírus recombinante. São representados três animais/grupo de um total de cinco animais. As setas indicam a altura da banda de SAG1 (30kD). (CTRL) animais imunizados com vetores virais contendo genes não relacionados ao *T. gondii*; (SAG1) animais imunizados com vetores virais contendo SAG1. Dados representativos de um experimento de vacinação, dentre dois que foram realizados independentemente e com resultados semelhantes. (B) ELISA realizado com soros de camundongos C57BL/6 vacinados com duas doses de vírus recombinantes. (***) indica diferença significativa com relação ao grupo vacinal controle ($p < 0,001$).

A figura 16 mostra que a re-estimulação dos esplenócitos com TLA, que leva a ativação tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺, resultou em quantidades semelhantes de células produtoras de IFN- γ ($p>0,05$) no grupo vacinado com duas doses de AdSAG1 (2555,333 \pm 882,6337) e no grupo que recebeu AdSAG1 seguido de MVASAG1 (2396,5 \pm 1622,81). Na estimulação com SP0534, no entanto, houve uma diferença significativa ($p<0,001$) entre aqueles grupos, com os animais do protocolo homólogo mostrando um menor número de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (325,333 \pm 39,4788) que no grupo vacinado de acordo com o protocolo heterólogo (973,6667 \pm 295,7902).

4.2.4. Protocolo de vacinação heterólogo: ensaio de proteção de camundongos imunizados

Para comparar a eficácia dos protocolos de imunização homólogos e heterólogo, camundongos C57BL/6 vacinados de acordo com cada um desses métodos de imunização foram desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*. A imunização com uma dose única de adenovírus ou MVASAG1 não teve efeito protetor contra a infecção, bem como a imunização homóloga ou heteróloga com vírus controles AdCTRL ou MVACTRL (figura 17A). Já os grupos que receberam duas doses de AdSAG1 ou a vacinação combinada de AdSAG1 seguida de MVASAG1 apresentaram proteção contra o desafio (figura 17B). Verificamos que houve tendência de maior sobrevivência dos animais vacinados com Ad-MVASAG1 (em torno de 80-86%) em relação aos vacinados com Ad-AdSAG1 (em torno de 60-70%). Com relação à carga de cistos cerebrais (Figura 18), observamos uma redução significativamente maior ($p<0,05$) nos animais do protocolo heterólogo (1325 \pm 648,2883), se comparado ao protocolo homólogo (2900 \pm 1185,327).

4.2.5. Protocolo de vacinação heterólogo: vacinação com vetores virais recombinantes contendo o gene SAG2

No intuito de se testar se a combinação de diferentes vetores virais codificando o antígeno SAG2 era capaz de induzir resposta imune celular e proteção contra desafio, nós realizamos um experimento para comparar a eficiência de imunização de um protocolo heterólogo Ad-MVA com um protocolo MVA-MVA. Para isso, esplenócitos obtidos dos animais duas semanas após a última dose vacinal foram submetidos à re-estimulação *in vitro* com TLA. Ainda, a proteção dos animais vacinados de acordo com cada um desses protocolos foi verificada através do desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*. A figura 19 mostra que, assim como no protocolo homólogo de imunização com adenovírus, não foi

possível detectar proteção significativa após desafio dos animais com a cepa ME49. Além disso, não detectamos diferença de resposta imune celular (produção de IFN- γ se comparado aos grupos controle).

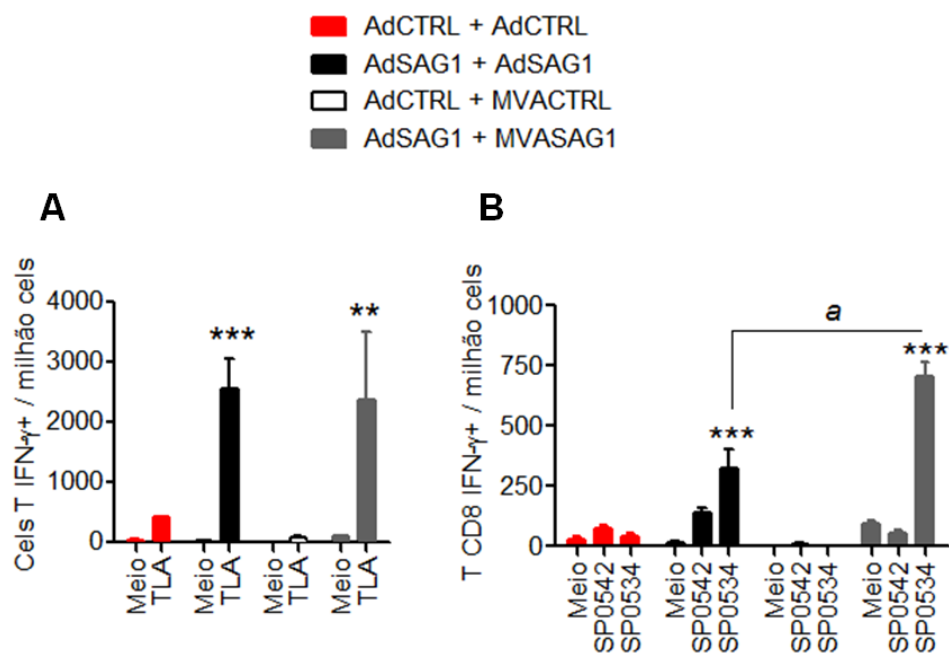


Figura 16 – Resposta imune celular em animais vacinados com adenovírus e MVA recombinantes codificando o antígeno SAG1. Camundongos C57BL/6 foram vacinados de acordo com um protocolo homólogo, com duas doses de adenovírus, ou de acordo com um protocolo heterólogo, com uma dose de iniciação de adenovírus seguida, quatro semanas depois, de uma dose de reforço de MVA. Esplenócitos foram obtidos dos animais duas semanas após a última imunização e cultivados na presença ou ausência de TLA (A) ou de peptídeos sintéticos MHC I restritos (B). As células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ foram detectadas nos cultivos por meio da técnica de ELISPOT. As barras verticais representam a média \pm desvio padrão de três animais testados individualmente. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos que receberam vírus codificando SAG1 e grupos que receberam os vírus controles (** p < 0,01 e *** p < 0,001); (a) indica diferença entre o grupo vacinado com AdSAG1 em protocolo homólogo e o grupo vacinado com AdSAG1 + MVASAG1 em protocolo heterólogo (p < 0,001).

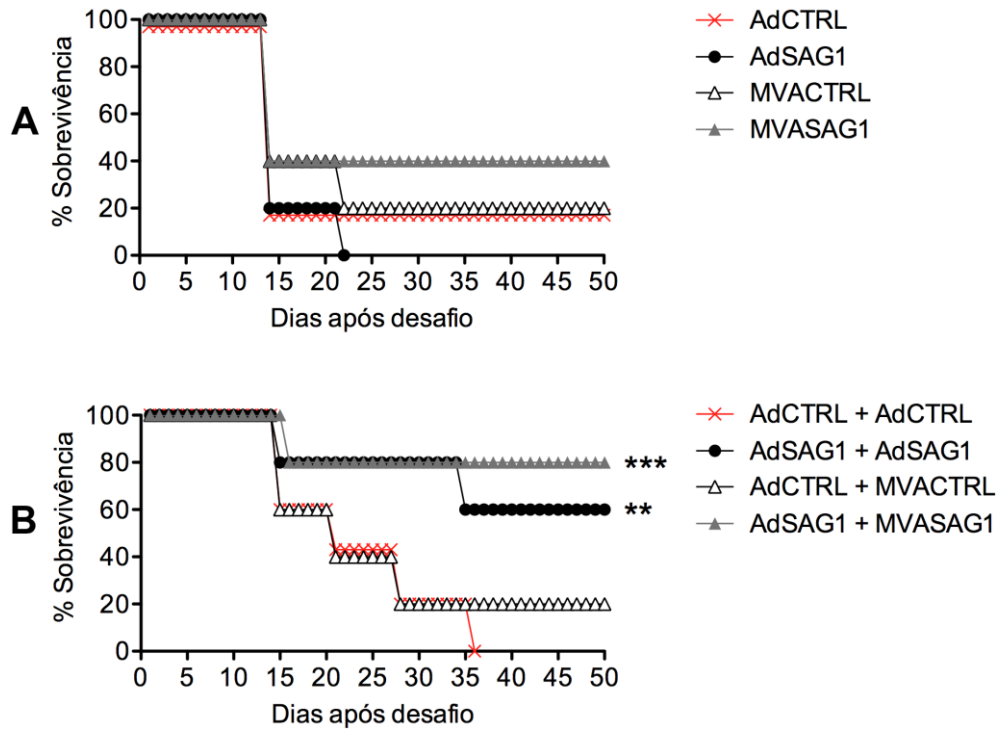


Figura 17 – Sobrevivência de camundongos vacinados com duas doses de vírus recombinantes. Grupos de camundongos C57BL/6 foram imunizados com duas doses de vírus recombinantes e desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*. A, curva de sobrevivência dos animais vacinados somente com uma dose; B, curva de sobrevivência dos animais vacinados com duas doses de vírus recombinantes. Representativo de dois experimentos realizados em dois tempos diferentes, com 7 animais/grupo/cada. Os asteriscos indicam diferença significativa entre os grupos que receberam vírus codificando SAG1 e os controles negativos (** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$).

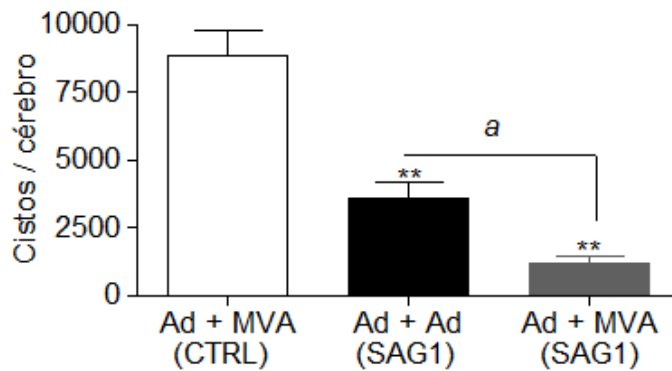


Figura 18 – Ensaio de proteção de camundongos vacinados com duas doses de vírus recombinantes. Média de cistos cerebrais dos animais sobreviventes após 50 dias do desafio. Representativo de dois experimentos realizados em dois tempos diferentes, com 6 animais/grupo/cada. As barras representam a média \pm desvio padrão da contagem de cistos dos animais sobreviventes. (** $p < 0,01$) indicam diferença significativa entre os grupos que receberam SAG1 e o grupo que recebeu vírus controle. (a) $p < 0,05$: indica diferença significativa entre o grupo que recebeu AdSAG1 + MVASAG1 do protocolo heterólogo e o grupo vacinado com duas doses de AdSAG1 do protocolo homólogo.

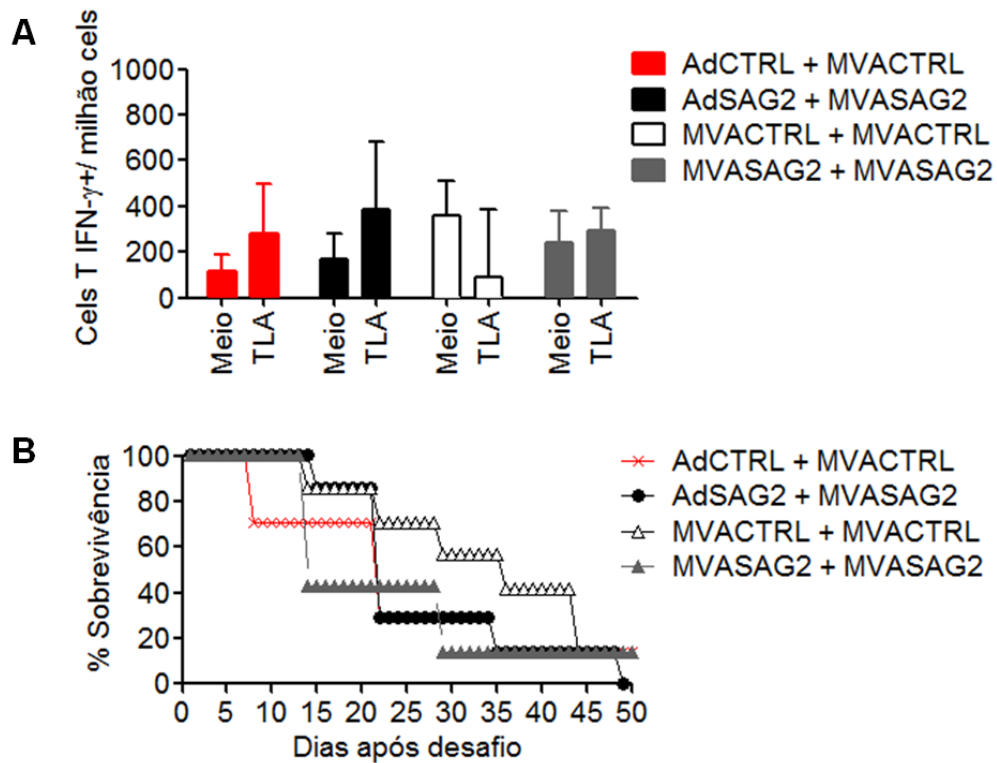


Figura 19 – Resposta imune celular e proteção de camundongos vacinados com duas doses de vírus recombinantes. (A) Células produtoras de IFN- γ avaliadas através de ensaio de ELISPOT. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com AdSAG2 + MVASAG2 ou duas doses de MVASAG2 e respectivos controles foram coletados 2 semanas após a última imunização e re-estimulados in vitro com TLA; (B) Curva de sobrevivência dos animais após o desafio. Representativo de dois experimentos realizados em dois tempos diferentes, com 6 animais por grupo/cada.

5. DISCUSSÃO

Muitos modelos experimentais têm sido testados com o intuito de se gerar um protocolo de vacinação seguro e eficiente contra a toxoplasmose. Alguns deles sugerem a utilização de plasmídeos carreando seqüências do patógeno como vetores vacinais, outros, proteínas recombinantes expressas em variados sistemas, como em bactérias ou leveduras (Cong et al., 2008; Lau and Fong, 2008; Lourenço et al., 2006). Embora muitos desses modelos de vacinação sejam capazes de gerar algum nível de proteção contra infecções experimentais, observa-se que eles apresentam baixa imunogenicidade, e em particular, limitada habilidade de induzir resposta imune celular, principalmente ativação de linfócitos T CD8⁺, os quais são críticos para indução de imunidade protetora contra o parasita *T. gondii* (Lee et al., 2007; Martin et al., 2004). Além disso, nesses modelos existe a necessidade de se inocular múltiplas doses vacinais e/ou a associação dos antígenos com adjuvantes (Liu et al., 2010).

Nesse sentido, vetores virais recombinantes apresentam algumas vantagens interessantes quando comparados a outros modelos experimentais de vacinação. Eles são extremamente eficientes em induzir altos níveis de expressão do antígeno recombinante *in vivo*, mesmo em células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas. Além disso, as partículas virais são compostas de diferentes proteínas, lipídeos, glicoproteínas e ácidos nucleicos, os quais interagem com diversos receptores inatos e ativam uma série de vias imunológicas que podem exercer efeitos adjuvantes à resposta ao produto antigênico recombinante (Muruve, 2004; Rocha et al., 2004). Dentre os diversos vetores virais que têm sido utilizados para indução de imunidade protetora contra doenças infecciosas, o adenovírus humano do tipo 5 tem ocupado uma posição de destaque devido à sua habilidade de ativar uma forte resposta imune (Bayer et al., 2010; Makedonas et al., 2010). Tendo as propriedades imunológicas dos diferentes vetores virais em mente, nós inicialmente escolhemos o adenovírus humano tipo 5 como um vetor para a expressão de três antígenos de superfície (SAG1, SAG2 e SAG3) de *T. gondii* e utilizamos os mesmos em protocolos de vacinação contra a toxoplasmose.

Um trabalho anterior do nosso grupo demonstrou que os três vetores recombinantes (AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3) foram capazes de induzir a expressão das proteínas SAG de maneira bastante eficiente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e que os mesmos possuem propriedades imunogênicas capazes de proteger parcialmente camundongos BALB/c contra

toxoplasmose crônica. A vacinação com os três adenovírus recombinantes resultou na redução do número de cistos cerebrais após desafio com a cepa P de *T. gondii*. (Caetano et al., 2006). No presente trabalho, o AdSAG1, AdSAG2 e o AdSAG3 foram testados como vacinas em um modelo murino de toxoplasmose aguda letal, no qual a cepa ME49 de *T. gondii* foi administrada a camundongos C57BL/6 (Fux et al., 2003). Nesse modelo, apenas o AdSAG1 foi capaz de proteger os animais contra a toxoplasmose aguda. Os adenovírus codificando SAG2 e SAG3 não foram capazes de impedir a mortalidade nem reduzir a formação de cistos cerebrais em camundongos C57BL/6. A diferença de resultados entre estudo conduzido em BALB/c e o modelo aqui descrito pode estar relacionada com a variedade genética das linhagens de camundongos utilizados nos experimentos de vacinação (BALB/c *versus* C57BL/6), as quais respondem diferencialmente aos antígenos SAG1, SAG2 e SAG3.

Uma hipótese levantada para explicar a falha do AdSAG2 e AdSAG3 em imunizar animais C57BL/6 foi a de que aqueles dois vírus não tenham infectado eficientemente as células desses camundongos, e que não tenham induzido correta expressão dos antígenos exógenos *in vivo* nesses animais. No entanto, a análise da resposta imune humoral dos animais vacinados descarta essa possibilidade, pois todos os grupos apresentaram anticorpos específicos contra a SAG com a qual foram vacinados, como demonstrado em ensaio de *Western blot* e ELISA. A diferença de eficiência entre os adenovírus recombinantes poderia estar relacionada, portanto, com a natureza da resposta imune ativada por cada um deles e/ou com as características do antígeno alvo dessa resposta. Como o vetor adenoviral que expressa o gene SAG1 é idêntico aos que vetores que carregam os genes SAG2 e SAG3, e sabendo-se que todos esses vírus empregam as mesmas células alvo e os mesmos mecanismos de infecção, expressão e apresentação de antígenos, acreditamos que a diferença final no resultado da vacinação possa estar relacionada à menor imunogenicidade dos antígenos SAG2 e SAG3 para camundongos C57BL/6.

A resposta imune humoral dos animais vacinados com AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3 foi avaliada no decorrer do protocolo de imunização. Todos os grupos vacinais desenvolveram uma resposta específica de anticorpos contra as SAG. Esse fato coloca em questionamento a importância dos anticorpos na proteção contra toxoplasmose aguda e crônica, tendo em vista que os grupos AdSAG2 e AdSAG3 não foram protegidos contra o desafio. O papel de anticorpos na proteção contra o *T. gondii* ainda não está totalmente esclarecido, e os dados mostrados por diferentes grupos de pesquisa são controversos. Em

estudos *in vivo* conduzidos com animais deficientes em linfócitos B, a vacinação com a cepa atenuada ts-4 de *T. gondii* não protegeu os animais contra mortalidade causada pelo desafio com a cepa altamente virulenta RH, a despeito dos animais vacinados terem desenvolvido resposta imune celular anti-*T. gondii*. Esses resultados argumentam que anticorpos são parte importante do mecanismo de proteção contra *T. gondii* (Sayles et al., 2000). Em contrapartida, em experimentos similares ao descrito anteriormente, a vacinação com ts-4 foi capaz de proteger animais deficientes em células B contra o desafio oral com a cepa ME49, mesmo na ausência de produção significativa de anticorpos (Johnson et al., 2004). Existem ainda outros exemplos de experimentos de imunização nos quais a indução da produção de anticorpos anti-*T. gondii* pela vacinação não se correlacionou com proteção contra toxoplasmose aguda causada pela cepa RH (Liu et al., 2006), ou com redução da carga de cistos cerebrais em animais desafiados com a cepa cistogênica ME49 (Roque-Resendiz et al., 2004).

Os resultados aqui apresentados concordam com os experimentos que mostram que anticorpos não são importantes para a proteção. Entretanto, antes de qualquer coisa, deve-se levar em consideração o antígeno alvo da resposta na interpretação dos resultados. Já foi descrito que SAG1, SAG2 e SAG3 são proteínas de superfície do *T. gondii* envolvidas no processo de adesão parasitária e invasão das células hospedeiras (Kasper and Mineo, 1994). No entanto, não se sabe qual o papel específico de cada uma no processo. Se SAG1 fosse, por exemplo, uma proteína essencial para a invasão e SAG2 e SAG3 assumissem um papel acessório, então a ligação de anticorpos em SAG1 poderia ativar mecanismos de neutralização mais eficientes que a ligação de anticorpos nas outras duas SAGs. Dessa forma, os anticorpos anti-SAG1 teriam propriedades protetoras superiores em comparação com anticorpos anti-SAG2 ou anti-SAG3. A produção de anticorpos contra SAG1, dessa maneira, faria grande diferença na resposta imune final contra o parasita. Isso explicaria em parte porque os animais vacinados com diferentes AdSAG produziram anticorpos, mas só os vacinados com AdSAG1 experimentaram proteção. Não existem, porém, muitas evidências experimentais que suportem essa hipótese, além de alguns estudos *in vitro* que demonstraram que anticorpos monoclonais anti-SAG1 foram capazes de neutralizar taquizoítos livres da cepa RH e impedir a infecção de fibroblastos humanos e enterócitos murinos em cultura (Mineo and Kasper, 1994). Na verdade, a maioria dos modelos de vacinação com SAG1 não conseguiram correlacionar a presença de anticorpos contra essa proteína com indução de proteção ao desafio experimental (Roque-Resendiz et al., 2004; Sayles et al., 2000). No entanto, não podemos descartar a participação de anticorpos na

proteção observada, já que os mesmos poderiam estar atuando na opsonização do parasita, facilitando o reconhecimento do mesmo por células do sistema imune, combatendo assim sua disseminação.

Enquanto a produção de anticorpos não parece ser um mecanismo fundamental para proteção, o desenvolvimento de resposta imune celular assume um papel essencial no controle da infecção por *T. gondii* (Miller et al., 2006). Em conjunto, os dados de produção de anticorpos obtidos no nosso modelo de imunização nos dão algumas indicações prévias de que os animais vacinados com adenovírus recombinantes de fato desenvolveram resposta imune mediada por células. Afinal, em todos os grupos vacinados com SAG foi detectada produção de diferentes isotipos de IgGs contra as três proteínas, o que é conhecidamente dependente da estimulação de células B por citocinas secretadas por células T CD4⁺ auxiliares (Gray et al., 2007). Curiosamente, quando comparado com os demais adenovírus, o AdSAG1 apresentou maior resposta de anticorpos do subtipo IgG2C do que IgG1, um indicativo de ativação preferencial de células T CD4⁺ com perfil inflamatório Th1 (associado a proteção contra a toxoplasmose). Já na vacinação com AdSAG3 houve produção predominante de IgG1, o que remonta a um perfil de resposta celular anti-inflamatória Th2. De fato, ao medirmos a atividade de produção de citocinas Th1 x Th2 de células T de animais vacinados com adenovírus, observamos que, naqueles que receberam AdSAG1, houve produção robusta de IFN- γ , em comparação com os níveis produzidos por células dos animais vacinados com AdSAG2 e AdSAG3.

Linfócitos T CD8⁺ também contribuem para a produção de IFN- γ durante a infecção por *T. gondii*. Além disso, acredita-se que as células T CD8⁺ sejam capazes de eliminar células parasitadas, contribuindo para o controle da formação de cistos teciduais na fase crônica da toxoplasmose (Suzuki et al., 2010). Um dos interesses do presente trabalho foi definir se os linfócitos T CD8⁺ específicos contra as SAGs são ativados com o protocolo de vacinação com adenovírus. Para detectar atividade de células T CD8⁺ usamos estímulos específicos para esse grupo celular, que consistiu de peptídeos sintéticos ligantes de MHC de classe I. A análise *in silico* das seqüências das proteínas SAG revelou um epítipo candidato a ligante de H2-D^b em SAG1, nenhum epítipo restrito a MHCI em SAG2 e dois possíveis ligantes de H2-D^b na proteína SAG3. Ensaio *in vitro* demonstraram que somente o peptídeo TPTENHFTL mapeado em SAG1 foi capaz de estimular a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ de animais vacinados com AdSAG1. Já os dois epítipos candidatos da

proteína SAG3 não apresentaram o mesmo efeito sobre esplenócitos dos animais vacinados com AdSAG3, apesar de terem recebido um *score* alto de probabilidade de ligação.

Em conjunto, os dados indicam que o AdSAG2 e o AdSAG3 não foram capazes de proteger os animais porque não ativaram células T específicas contra os antígenos SAG2 e SAG3. Isso pode estar relacionado com a ausência em SAG2 e SAG3 de epítomos capazes de induzir eficiente ativação de linfócitos T, principalmente linfócitos T CD8⁺, na linhagem de camundongos utilizada nesse estudo. Esses dados permitem argumentar mais uma vez que a falha na imunização com AdSAG2 e AdSAG3 possa estar relacionada a baixa imunogenicidade dos antígenos para camundongos C57BL/6. Essa idéia é corroborada pelo fato de que, no modelo de vacinação de BALB/c, dentro de um contexto de MHC diferente, os dois vírus apresentaram propriedades protetoras (Caetano et al., 2006). No entanto, deve-se manter em mente que apenas uma ferramenta de busca de epítomos de MHCI foi empregada e que o número de ligantes em SAG2 e SAG3 possa estar subestimado. Não devemos descartar também a possibilidade de que a baixa imunogenicidade do AdSAG2 e AdSAG3 possa ser contornada com um protocolo de vacinação diferente.

Os resultados obtidos até essa etapa do trabalho evidenciam que o sucesso da imunização com AdSAG1 em proteger contra mortalidade e a formação de cistos cerebrais está relacionado com capacidade desse vírus em ativar células T específicas com perfil Th1 e os consequentes mecanismos de eliminação de células parasitadas mediados por esses linfócitos. Essa hipótese foi ainda corroborada pelos experimentos de vacinação em que o AdSAG1 foi administrado a camundongos deficientes em IFN- γ e animais deficientes em linfócitos T CD8⁺. Os animais IFN- γ ^{-/-} mostraram-se altamente susceptíveis à infecção pelo *T. gondii*, morrendo duas semanas após o desafio. Já a mortalidade dos animais deficientes em células T CD8⁺ se estendeu até a fase crônica da infecção. Apesar dos animais deficientes em células T CD8⁺ terem sido capazes de produzir IFN- γ *in vitro* em resposta aos antígenos de *T. gondii*, todos os animais morreram seis semanas após o desafio, o que indica que eles não foram capazes de induzir níveis sustentáveis de resposta imune capaz de controlar eficientemente o parasita. Provavelmente, a ausência da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺, a qual é mediada por perforina, foi uma das causas da morte desses animais, já que esse mecanismo é importante para o controle do número de cistos cerebrais durante a fase crônica da infecção (Suzuki et al., 2010).

Uma área da imunologia bastante explorada atualmente é a interface entre a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. Hoje é consenso entre os imunologistas que a

resposta inata, desenvolvida no primeiro momento de contato do hospedeiro com o patógeno influencia o tipo e a potência da resposta adaptativa subsequente. Já é sabido que os mecanismos de imunidade inata desenvolvidos por células apresentadoras de antígenos são responsáveis pelas atividades potencializadoras de resposta imune exibidas por diferentes adjuvantes e pela imunogenicidade de vários tipos de vetores virais recombinantes (Letscher-Bru et al., 1998; Zhu et al., 2007).

Diferentes estudos têm demonstrado o envolvimento de Receptores do Tipo (TLRs) e da molécula adaptadora MyD88 na ativação de resposta imune inata inflamatória e conseqüente efeito adjuvante dos adenovírus tipo 5 (Hartman et al., 2007; Zhu et al., 2007). Aqui, nós avaliamos a contribuição da ativação de MyD88 para a imunogenicidade do adenovírus expressando SAG1 em experimentos onde animais deficientes em MyD88 (MyD88^{-/-}) foram vacinados de acordo com o protocolo homólogo e tiveram medidos sua resposta imune celular contra o antígeno SAG1 e os níveis de proteção contra desafio com o parasita. A deficiência em MyD88 resultou em inibição quase completa da produção de IFN- γ pelos esplenócitos de animais vacinados em resposta aos antígenos do parasita (TLA ou peptídeo SP0534). Isso é um forte indicativo de que a ativação de linfócitos T específicos anti-SAG1 está comprometida naqueles animais. Ainda mais, animais MyD88^{-/-} vacinados não foram protegidos pela vacinação com AdSAG1, ao contrário do observado em animais selvagens.

Um dos mecanismos de resposta imune inata regulados por TLR/MyD88 é a produção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno, tais como células dendríticas e macrófagos. A produção de IL-12 é acompanhada da ativação da capacidade de apresentação de antígenos e expressão de moléculas co-estimuladoras pelas APCs, o que conduz a diferenciação dos linfócitos T específicos a um perfil Th1 (Tait and Hunter, 2009; Yarovinsky and Sher, 2006). Nossos resultados mostraram que a IL-12 também está envolvida nos mecanismos de ativação de células T específicas contra SAG1 durante a vacinação com AdSAG1. A deficiência de IL-12 prejudicou a produção de IFN- γ pelos esplenócitos de animais vacinados com AdSAG1 em resposta aos antígenos de *T. gondii*. Além disso, todos os animais IL-12^{-/-} vacinados morreram duas semanas após o desafio, o que indica que a precoce produção da citocina IL-12 após a vacinação é um fator determinante para ativação de células T específicas contra o parasita e indução de proteção.

Em sumário, nossos resultados mostraram que a proteção observada em camundongos vacinados com AdSAG1 é dependente da ativação de células T com perfil

Th1 contra o antígeno SAG1. Por sua vez, a ativação das células T é influenciada por mecanismos de imunidade inata mediados por MyD88 e IL-12. Esta citocina atua como um potente indutor da ativação de células T CD8⁺ e produção de IFN- γ , eventos esses essenciais para o controle do parasitismo após desafio com o *T. gondii*. Os resultados aqui apresentados são consistentes com a hipótese de que TLR/MyD88 possuem um importante papel no desenvolvimento de atividade adjuvante, imunogenicidade e desenvolvimento de imunidade protetora induzida pelo adenovírus recombinante do tipo 5 (Hartman et al., 2007; Lindsay et al., 2010).

Os resultados apresentados anteriormente juntamente com dados obtidos em literatura indicam que os adenovírus recombinantes apresentam um grande potencial para futura utilização como uma vacina contra parasitas intracelulares, inclusive o *T. gondii*. Entretanto, algumas questões importantes relacionadas à eficiência dos protocolos de imunização devem ser levadas em consideração. Um ponto importante que é constantemente levantado diz respeito à aplicação de adenovírus como vetor vacinal é o fato do sorotipo 5 – o mais amplamente utilizado em protocolos de imunização – ser distribuído dentro da população humana, a qual apresenta alto índice de anticorpos neutralizantes contra o mesmo (Seregin and Amalfitano, 2009). Tais anticorpos impediriam a transdução eficiente das células hospedeiras após a administração do vetor e, conseqüentemente, a adequada expressão e apresentação de antígenos. Além disso, a imunidade contra epítomos virais levaria a uma eliminação mais rápida das células infectadas. Já foi demonstrado, por exemplo, que a transferência de soro de animais previamente expostos ao adenovírus para animais não imunes limita a expressão do transgene e que a transferência de linfócitos T CD8⁺ limita a resposta imune contra o produto do gene recombinante (Sumida et al., 2004; Yang et al., 1995a). Sendo assim, a eficácia esperada para a vacinação com um vetor recombinante é altamente variável dependendo do nível de imunidade pré-existente (Bangari and Mittal, 2006a). Outra limitação do uso dos adenovírus provém do fato de que para a geração da resposta protetora contra um patógeno, é necessário o uso de protocolos de vacinação com múltiplas doses (protocolos de iniciação e reforço) (Rocha et al., 2004). Nesse caso, a resposta antivector específica gerada com a dose inicial poderia interferir na expressão e resposta ao transgene na re-administração. Na tentativa de se escapar desses problemas, diversas estratégias têm sido utilizadas, dentre elas, a administração de adenovírus recombinantes baseados em sorotipos raros, como o Ad35, uso de sorotipos não humanos (Bangari and Mittal, 2006b; Seregin and Amalfitano, 2009), construção de vetores

que apresentam modificações na superfície (Krasnykh et al., 1996; Roberts et al., 2006; Thacker et al., 2009), além da combinação de diversos vetores carreando o mesmo antígeno, os chamados protocolos de imunização heterólogos (Gilbert et al., 2006; Gilbert et al., 2002).

Por sua segurança comprovada, o MVA tem sido explorado como vetor recombinante em ensaios de imunização, podendo ser utilizado tanto em animais previamente imunizados contra o vírus, quanto em animais que nunca entraram em contato com o agente. Da mesma maneira observada para outros vetores recombinantes, inoculações sucessivas levam a uma forte resposta anti-MVA que interfere na expressão do transgene. Trabalhos mostraram que, enquanto a administração de duas doses de MVA recombinante tem efeito aditivo sobre a resposta imune contra o transgene, foi observado que a partir da terceira dose há queda significativa da resposta imune contra o patógeno de interesse (Hodge et al., 2003). Por outro lado, combinações de MVA com outros vetores vacinais mostraram melhor desempenho na indução de imunidade contra o transgene que o protocolo homólogo somente com MVA (Gilbert et al., 2006). Devido a esses fatos, nós resolvemos construir MVAs recombinantes codificando os antígenos de superfície SAG1 e SAG2 de *T. gondii* para serem utilizados em protocolos de imunização heterólogo com o intuito de tentar melhorar o nosso protocolo de imunização.

Uma das expectativas era de que o protocolo heterólogo com adenovírus e MVA-SAG2 pudesse promover a proteção de animais C57BL/6 frente o desafio, o que não foi observado com protocolo homólogo. A hipótese era de que o uso de dois vetores pudesse aumentar a eficiência da expressão de SAG2 *in vivo*, e que isso melhorasse o processamento e a apresentação de eventuais epítomos ativadores de resposta imune celular que essa proteína tivesse. No entanto, nem aumento da resposta de células T, nem proteção satisfatória foi observado. Qualquer efeito aditivo de expressão protéica que o protocolo heterólogo tenha gerado não foi capaz de compensar a baixa imunogenicidade de SAG2 em camundongos C57BL/6.

Um panorama diferente foi observado na vacinação com os vírus recombinantes expressando SAG1. Tanto o protocolo homólogo quanto o heterólogo promoveram resposta imune celular (produção de IFN- γ por células T CD4⁺ e TCD8⁺) e proteção contra mortalidade causada pela cepa ME49. Na comparação dos dois protocolos, entretanto, vimos uma resposta de IFN- γ mais potente nos animais vacinados de acordo com protocolo heterólogo. Essa resposta mais potente refletiu-se numa tendência de maior sobrevivência e

quantidade significativamente menor de cistos cerebrais nos grupos que receberam a combinação AdSAG1 seguido de MVA-SAG1.

Os dados aqui apresentados estão de acordo com estudos anteriores que indicam que a utilização de protocolos heterólogos de imunização utilizando diferentes vetores virais como Ad-MVA resulta em níveis de resposta imune e proteção significativamente maiores, se comparados a utilização somente do vetor adenoviral como agente de imunização. Reyes-Sandoval e colaboradores, por exemplo, demonstraram em um modelo murino com *P. berghei* que a combinação dos vetores adenovírus-MVA em protocolos de imunização resultou em maior proteção (Reyes-Sandoval et al., 2010). Além disso, a proteção correlacionou-se com o aumento do número de células T polifuncionais pra IFN- γ , TNF e IL-12. Em outro estudo que associou DNA-MVA em um modelo de vacinação contra o HIV, a combinação dos dois vetores resultou em indução de uma forte resposta imune celular, sendo que mais de 80% das células TCD8⁺ ativadas foram específicas para antígenos do HIV, o mesmo não sendo observado nos protocolos que utilizaram somente um dos vetores recombinantes (Brave et al., 2007). Apesar de não termos realizado investigações mais detalhadas sobre o repertório celular ativado nos dois protocolos de imunização, acreditamos que a combinação de diferentes vetores virais é capaz de ativar um repertório celular com funcionalidade maior, além de ampliar a distribuição e aumentar a frequência de aparecimento tanto de linfócitos TCD4⁺ quanto TCD8⁺ específicos para o antígeno de interesse. Os resultados ainda demonstraram que a utilização de vetores virais recombinantes codificando antígenos do parasita *T. gondii* é uma abordagem viável para o desenvolvimento de plataformas seja pra vacinação profilática quanto imunoterápica para o combate da doença.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostra a utilização de vetores virais recombinantes codificando antígenos de superfície (SAG1, SAG2 ou SAG3) do protozoário *T. gondii* em protocolos de imunização de camundongos.

Os resultados obtidos no nosso modelo experimental de toxoplasmose em camundongos C57BL/6 indicam que somente o adenovírus recombinante que expressa a proteína SAG1 foi capaz de aumentar a sobrevivência e reduzir a carga parasitária dos animais após infecção com o parasita. A falha de proteção do AdSAG2 e AdSAG3 foi devida a baixa imunogenicidade das proteínas SAG2 e SAG3, as quais possivelmente não possuem epítomos ativadores de resposta imune celular para linhagem de camundongos C57BL/6.

Alguns dos mecanismos imunológicos envolvidos na proteção conferida pelo AdSAG1 foram identificados. Essa é dependente de MyD88, IL-12 e IFN- γ , além da ativação de linfócitos T CD8⁺. A ativação de MyD88 levaria a produção da citocina IL-12 durante a fase aguda da infecção. Essa citocina, por sua vez, é um importante indutor de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, os quais desempenham papel importante no controle do parasitismo durante a fase crônica da doença.

Com intuito de tentar melhorar a eficácia do nosso protocolo de imunização, nós combinamos o AdSAG1 e AdSAG2 com vetores MVA codificando os genes das proteínas SAG1 e SAG2 (MVA SAG1 e MVASAG2), em protocolos de imunização heterólogo. Novamente, apenas a vacinação com os vírus expressando SAG1 foi protetora. A comparação dos dois protocolos (AdSAG1 + AdSAG1 contra AdSAG1 + MVASAG1) mostrou que o protocolo heterólogo foi mais eficiente na proteção contra a infecção crônica.

A vacinação com vetores virais recombinantes expressando antígenos de superfície do parasita *T. gondii* foi capaz de gerar proteção parcial contra a infecção. Novos estudos ainda são necessários a fim de se gerar um protocolo de imunização capaz de induzir imunidade estéril contra a infecção pelo parasita, tais como a combinação das SAGs com outros antígenos protetores de *T. gondii* em uma nova formulação vacinal. Isso seria importante pra se tentar gerar também um protocolo de imunização mais eficiente capaz de proteger contra uma ampla gama de linhagens do parasita espalhadas pelo mundo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboud, S., C. Nilsson, K. Karlen, M. Marovich, B. Wahren, E. Sandstrom, H. Gaines, G. Biberfeld, and K. Godoy-Ramirez. 2010. Strong HIV-specific CD4+ and CD8+ T-lymphocyte proliferative responses in healthy individuals immunized with an HIV-1 DNA vaccine and boosted with recombinant modified vaccinia virus ankara expressing HIV-1 genes. *Clin Vaccine Immunol.* 17:1124-1131.
- Antoine, G., F. Scheiflinger, F. Dorner, and F.G. Falkner. 1998. The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology.* 244:365-396.
- Araujo, P.R., and A.W. Ferreira. 2008. Avidity of IgG antibodies against excreted/secreted antigens of *Toxoplasma gondii*: immunological marker for acute recent toxoplasmosis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41:142-147.
- Asmuth, D.M., E.L. Brown, M.J. DiNubile, X. Sun, C. del Rio, C. Harro, M.C. Keefer, J.G. Kublin, S.A. Dubey, L.S. Kierstead, D.R. Casimiro, J.W. Shiver, M.N. Robertson, E.K. Quirk, and D.V. Mehrotra. 2010. Comparative cell-mediated immunogenicity of DNA/DNA, DNA/adenovirus type 5 (Ad5), or Ad5/Ad5 HIV-1 clade B gag vaccine prime-boost regimens. *J Infect Dis.* 201:132-141.
- Babiuk, L.A., and S.K. Tikoo. 2000. Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J Biotechnol.* 83:105-113.
- Bangari, D.S., and S.K. Mittal. 2006a. Current strategies and future directions for eluding adenoviral vector immunity. *Curr Gene Ther.* 6:215-226.
- Bangari, D.S., and S.K. Mittal. 2006b. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine.* 24:849-862.
- Bayer, W., M. Tenbusch, R. Lietz, L. Johrden, S. Schimmer, K. Uberla, U. Dittmer, and O. Wildner. 2010 . Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection. *J Virol.* 84:1967-1976.
- Bhadra, R., H. Guan, and I.A. Khan. 2010. Absence of both IL-7 and IL-15 severely impairs the development of CD8 T cell response against *Toxoplasma gondii*. *PLoS One.* 5:e10842.

- Bojar, I., and J. Szymanska. 2010. Environmental exposure of pregnant women to infection with *Toxoplasma gondii*--state of the art. *Ann Agric Environ Med.* 17:209-214.
- Bonenfant, C., I. Dimier-Poisson, F. Velge-Roussel, D. Buzoni-Gatel, G. Del Giudice, R. Rappuoli, and D. Bout. 2001. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 69:1605-1612.
- Boothroyd, J.C., A. Hehl, L.J. Knoll, and I.D. Manger. 1998. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol.* 28:3-9.
- Brave, A., A. Boberg, L. Gudmundsdotter, E. Rollman, K. Hallermalm, K. Ljungberg, P. Blomberg, R. Stout, S. Paulie, E. Sandstrom, G. Biberfeld, P. Earl, B. Moss, J.H. Cox, and B. Wahren. 2007. A new multi-clade DNA prime/recombinant MVA boost vaccine induces broad and high levels of HIV-1-specific CD8(+) T-cell and humoral responses in mice. *Mol Ther.* 15:1724-1733.
- Bruder, J.T., M.E. Stefaniak, N.B. Patterson, P. Chen, S. Konovalova, K. Limbach, J.J. Campo, D. ETTYREDDY, S. Li, F. Dubovsky, T.L. Richie, C.R. King, C.A. Long, and D.L. Doolan. 2010. Adenovectors induce functional antibodies capable of potent inhibition of blood stage malaria parasite growth. *Vaccine.* 28:3201-3210.
- Bruna-Romero, O., G. Gonzalez-Aseguinolaza, J.C. Hafalla, M. Tsuji, and R.S. Nussenzweig. 2001. Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:11491-11496.
- Bruna-Romero, O., J.J. Lasarte, G. Wilkinson, K. Grace, B. Clarke, F. Borrás-Cuesta, and J. Prieto. 1997. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology.* 25:470-477.
- Bruna-Romero, O., C.D. Rocha, M. Tsuji, and R.T. Gazzinelli. 2004. Enhanced protective immunity against malaria by vaccination with a recombinant adenovirus encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium* lacking the GPI-anchoring motif. *Vaccine.* 22:3575-3584.
- Butcher, B.A., L. Kim, A.D. Panopoulos, S.S. Watowich, P.J. Murray, and E.Y. Denkers. 2005. IL-10-independent STAT3 activation by *Toxoplasma gondii* mediates suppression of IL-12 and TNF-alpha in host macrophages. *J Immunol.* 174:3148-3152.
- Buxton, D., and E.A. Innes. 1995. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 110 Suppl:S11-16.

- Caetano, B.C., O. Bruna-Romero, B. Fux, E.A. Mendes, M.L. Penido, and R.T. Gazzinelli. 2006. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gene Ther.* 17:415-426.
- Carvalho, L.H., J.C. Hafalla, and F. Zavala. 2001. ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8⁺ T cell responses. *J Immunol Methods.* 252:207-218.
- Casimiro, D.R., L. Chen, T.M. Fu, R.K. Evans, M.J. Caulfield, M.E. Davies, A. Tang, M. Chen, L. Huang, V. Harris, D.C. Freed, K.A. Wilson, S. Dubey, D.M. Zhu, D. Nawrocki, H. Mach, R. Troutman, L. Isopi, D. Williams, W. Hurni, Z. Xu, J.G. Smith, S. Wang, X. Liu, L. Guan, R. Long, W. Trigona, G.J. Heidecker, H.C. Perry, N. Persaud, T.J. Toner, Q. Su, X. Liang, R. Youil, M. Chastain, A.J. Bett, D.B. Volkin, E.A. Emini, and J.W. Shiver. 2003. Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol.* 77:6305-6313.
- Coelho, R.A., M. Kobayashi, and L.B. Carvalho, Jr. 2003. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 45:229-231.
- Combe, C.L., T.J. Curiel, M.M. Moretto, and I.A. Khan. 2005. NK cells help to induce CD8(+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4(+) T cells. *Infect Immun.* 73:4913-4921.
- Cong, H., Q.M. Gu, H.E. Yin, J.W. Wang, Q.L. Zhao, H.Y. Zhou, Y. Li, and J.Q. Zhang. 2008. Multi-epitope DNA vaccine linked to the A2/B subunit of cholera toxin protect mice against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 26:3913-3921.
- Couper, K.N., H.V. Nielsen, E. Petersen, F. Roberts, C.W. Roberts, and J. Alexander. 2003. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. *Vaccine.* 21:2813-2820.
- Couvreur, J., P. Thulliez, F. Daffos, C. Aufrant, Y. Bompard, A. Gesquiere, and G. Desmots. 1993. In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. *Fetal Diagn Ther.* 8:45-50.
- Dabritz, H.A., and P.A. Conrad. 2010. Cats and *Toxoplasma*: implications for public health. *Zoonoses Public Health.* 57:34-52.
- Darde, M.L. 2004. Genetic analysis of the diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 40:57-63.

- de Alencar, B.C., P.M. Persechini, F.A. Haolla, G. de Oliveira, J.C. Silverio, J. Lannes-Vieira, A.V. Machado, R.T. Gazzinelli, O. Bruna-Romero, and M.M. Rodrigues. 2009. Perforin and gamma interferon expression are required for CD4+ and CD8+ T-cell-dependent protective immunity against a human parasite, *Trypanosoma cruzi*, elicited by heterologous plasmid DNA prime-recombinant adenovirus 5 boost vaccination. *Infect Immun.* 77:4383-4395.
- de Andrade, B.P., R.T. Gazzinelli, M. Del Val, and O. Bruna-Romero. 2007. Protective immunization against murine cytomegalovirus infection using adenoviruses and poxviruses expressing hepatitis B virus chimeras. *Int Microbiol.* 10:261-269.
- de Medeiros, B.C., C.R. de Medeiros, B. Werner, G. Loddo, R. Pasquini, and L.F. Bleggi-Torres. 2001. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis.* 3:24-28.
- Debard, N., D. Buzoni-Gatel, and D. Bout. 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect Immun.* 64:2158-2166.
- Debierre-Grockiego, F., M.A. Campos, N. Azzouz, J. Schmidt, U. Bieker, M.G. Resende, D.S. Mansur, R. Weingart, R.R. Schmidt, D.T. Golenbock, R.T. Gazzinelli, and R.T. Schwarz. 2007. Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 179:1129-1137.
- Denkers, E.Y. 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 1:699-708.
- Denkers, E.Y., and R.T. Gazzinelli. 1998. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev.* 11:569-588.
- Desolme, B., M.N. Mevelec, D. Buzoni-Gatel, and D. Bout. 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine.* 18:2512-2521.
- Di Paolo, N.C., E.A. Miao, Y. Iwakura, K. Murali-Krishna, A. Aderem, R.A. Flavell, T. Papayannopoulou, and D.M. Shayakhmetov. 2009. Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo. *Immunity.* 31:110-121.
- Drexler, I., C. Staib, and G. Sutter. 2004. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr Opin Biotechnol.* 15:506-512.
- Dubey, J.P. 2004. Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 126:57-72.
- Dubey, J.P. 2009. Toxoplasmosis in sheep--the last 20 years. *Vet Parasitol.* 163:1-14.

- Dubey, J.P., J.E. Gomez-Marin, A. Bedoya, F. Lora, M.C. Vianna, D. Hill, O.C. Kwok, S.K. Shen, P.L. Marcet, and T. Lehmann. 2005. Genetic and biologic characteristics of *Toxoplasma gondii* isolates in free-range chickens from Colombia, South America. *Vet Parasitol.* 134:67-72.
- Dubey, J.P., D.H. Graham, C.R. Blackston, T. Lehmann, S.M. Gennari, A.M. Ragozo, S.M. Nishi, S.K. Shen, O.C. Kwok, D.E. Hill, and P. Thulliez. 2002. Biological and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens (*Gallus domesticus*) from Sao Paulo, Brazil: unexpected findings. *Int J Parasitol.* 32:99-105.
- Dubey, J.P., D.S. Lindsay, and C.A. Speer. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev.* 11:267-299.
- Dzierszynski, F., M. Mortuaire, M.F. Cesbron-Delauw, and S. Tomavo. 2000. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. *Mol Microbiol.* 37:574-582.
- Earl, P.L., J.L. Americo, L.S. Wyatt, L.A. Eller, D.C. Montefiori, R. Byrum, M. Piatak, J.D. Lifson, R.R. Amara, H.L. Robinson, J.W. Huggins, and B. Moss. 2007. Recombinant modified vaccinia virus Ankara provides durable protection against disease caused by an immunodeficiency virus as well as long-term immunity to an orthopoxvirus in a non-human primate. *Virology.* 366:84-97.
- Earl, P.L., B. Moss, L.S. Wyatt, and M.W. Carroll. 2001. Generation of recombinant vaccinia viruses. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 5:Unit5 13.
- Elmore, S.A., J.L. Jones, P.A. Conrad, S. Patton, D.S. Lindsay, and J.P. Dubey. 2010. *Toxoplasma gondii*: epidemiology, feline clinical aspects, and prevention. *Trends Parasitol.* 26:190-196.
- Fang, R., H. Feng, H. Nie, L. Wang, P. Tu, Q. Song, Y. Zhou, and J. Zhao. 2010. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model. *Vaccine.* 28:1803-1807.
- Ferguson, D.J. 2009. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:133-148.
- Ferreira Ade, M., R.W. Vitor, R.T. Gazzinelli, and M.N. Melo. 2006. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 6:22-31.

- Ferreira, M.S., and A.S. Borges. 2002. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 97:443-457.
- Frickel, E.M., N. Sahoo, J. Hopp, M.J. Gubbels, M.P. Craver, L.J. Knoll, H.L. Ploegh, and G.M. Grotenbreg. 2008. Parasite stage-specific recognition of endogenous *Toxoplasma gondii*-derived CD8+ T cell epitopes. *J Infect Dis*. 198:1625-1633.
- Fux, B., C.V. Rodrigues, R.W. Portela, N.M. Silva, C. Su, D. Sibley, R.W. Vitor, and R.T. Gazzinelli. 2003. Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 71:6392-6401.
- Gazzinelli, R.T., D. Amichay, T. Sharton-Kersten, E. Grunwald, J.M. Farber, and A. Sher. 1996. Role of macrophage-derived cytokines in the induction and regulation of cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 219:127-139.
- Gazzinelli, R.T., M. Wysocka, S. Hayashi, E.Y. Denkers, S. Hieny, P. Caspar, G. Trinchieri, and A. Sher. 1994. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 153:2533-2543.
- Gilbert, S.C., V.S. Moorthy, L. Andrews, A.A. Pathan, S.J. McConkey, J.M. Vuola, S.M. Keating, T. Berthoud, D. Webster, H. McShane, and A.V. Hill. 2006. Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis. *Vaccine*. 24:4554-4561.
- Gilbert, S.C., J. Schneider, C.M. Hannan, J.T. Hu, M. Plebanski, R. Sinden, and A.V. Hill. 2002. Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes. *Vaccine*. 20:1039-1045.
- Giraldo, M., H. Cannizzaro, M.A. Ferguson, I.C. Almeida, and R.T. Gazzinelli. 2000. Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 38:1453-1460.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.
- Gray, D., M. Gray, and T. Barr. 2007. Innate responses of B cells. *Eur J Immunol*. 37:3304-3310.

- Harrison, S.C., B. Alberts, E. Ehrenfeld, L. Enquist, H. Fineberg, S.L. McKnight, B. Moss, M. O'Donnell, H. Ploegh, S.L. Schmid, K.P. Walter, and J. Theriot. 2004. Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:11178-11192.
- Hartman, Z.C., D.M. Appledorn, and A. Amalfitano. 2008. Adenovirus vector induced innate immune responses: impact upon efficacy and toxicity in gene therapy and vaccine applications. *Virus Res*. 132:1-14.
- Hartman, Z.C., A. Kiang, R.S. Everett, D. Serra, X.Y. Yang, T.M. Clay, and A. Amalfitano. 2007. Adenovirus infection triggers a rapid, MyD88-regulated transcriptome response critical to acute-phase and adaptive immune responses in vivo. *J Virol*. 81:1796-1812.
- Henderson, H., F. Jackson, K. Bean, B. Panasuk, M. Niezgod, D. Slate, J. Li, B. Dietzschold, J. Mattis, and C.E. Rupprecht. 2009. Oral immunization of raccoons and skunks with a canine adenovirus recombinant rabies vaccine. *Vaccine*. 27:7194-7197.
- Hidajat, R., S. Kuate, D. Venzon, V. Kalyanaraman, I. Kalisz, J. Treece, Y. Lian, S.W. Barnett, and M. Robert-Guroff. 2010. Construction and immunogenicity of replication-competent adenovirus 5 host range mutant recombinants expressing HIV-1 gp160 of SF162 and TV1 strains. *Vaccine*. 28:3963-3971.
- Hide, G., E.K. Morley, J.M. Hughes, O. Gerwash, M.S. Elmahaishi, K.H. Elmahaishi, D. Thomasson, E.A. Wright, R.H. Williams, R.G. Murphy, and J.E. Smith. 2009. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 136:1877-1885.
- Hodge, J.W., D.J. Poole, W.M. Aarts, A. Gomez Yafal, L. Gritz, and J. Schlom. 2003. Modified vaccinia virus ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Res*. 63:7942-7949.
- Holst, P.J., C. Orskov, A.R. Thomsen, and J.P. Christensen. 2010. Quality of the transgene-specific CD8+ T cell response induced by adenoviral vector immunization is critically influenced by virus dose and route of vaccination. *J Immunol*. 184:4431-4439.
- Howe, D.K., S. Honore, F. Derouin, and L.D. Sibley. 1997. Determination of genotypes of *Toxoplasma gondii* strains isolated from patients with toxoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 35:1411-1414.
- Howe, D.K., and L.D. Sibley. 1995. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. *J Infect Dis*. 172:1561-1566.
- Howell, M.R., R.N. Nang, C.A. Gaydos, and J.C. Gaydos. 1998. Prevention of adenoviral acute respiratory disease in Army recruits: cost-effectiveness of a military vaccination policy. *Am J Prev Med*. 14:168-175.

- Imler, J.L. 1995. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine*. 13:1143-1151.
- Innes, E.A. 2010. A brief history and overview of *Toxoplasma gondii*. *Zoonoses Public Health*. 57:1-7.
- Innes, E.A., P.M. Bartley, D. Buxton, and F. Katzer. 2009. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology*. 136:1887-1894.
- Jenkins, M.C. 2001. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet Parasitol*. 101:291-310.
- Johnson, L.L., P. Lanthier, J. Hoffman, and W. Chen. 2004. Vaccination protects B cell-deficient mice against an oral challenge with mildly virulent *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*. 22:4054-4061.
- Johnson, L.L., and P.C. Sayles. 2002. Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun*. 70:185-191.
- Jongert, E., C.W. Roberts, N. Gargano, E. Forster-Wald, and E. Petersen. 2009. Vaccines against *Toxoplasma gondii*: challenges and opportunities. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:252-266.
- Jongert, E., D. Verhelst, M. Abady, E. Petersen, and N. Gargano. 2008. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. *Vaccine*. 26:5289-5295.
- Jooss, K., and N. Chirmule. 2003. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther*. 10:955-963.
- Jordan, K.A., and C.A. Hunter. 2010. Regulation of CD8(+) T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol*.
- Kasper, L.H., and J.R. Mineo. 1994. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today*. 10:184-188.
- Kim, K., and L.M. Weiss. 2008. *Toxoplasma*: the next 100years. *Microbes Infect*. 10:978-984.
- Kolibab, K., A. Yang, S.C. Derrick, T.A. Waldmann, L.P. Perera, and S.L. Morris. 2010. Highly persistent and effective prime/boost regimens against tuberculosis that use a multivalent modified vaccine virus Ankara-based tuberculosis vaccine with interleukin-15 as a molecular adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*. 17:793-801.
- Krasnykh, V.N., G.V. Mikheeva, J.T. Douglas, and D.T. Curiel. 1996. Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol*. 70:6839-6846.
- Kravetz, J.D., and D.G. Federman. 2005. Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med*. 118:212-216.

- Kur, J., L. Holec-Gasior, and E. Hiszczynska-Sawicka. 2009. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 8:791-808.
- Kutscher, S., S. Allgayer, C.J. Dembek, J.R. Bogner, U. Protzer, F.D. Goebel, V. Erfle, and A. Cosma. 2010. MVA-nef induces HIV-1-specific polyfunctional and proliferative T-cell responses revealed by the combination of short- and long-term immune assays. *Gene Ther*.
- Lago, E.G., G.S. Conrado, C.S. Piccoli, R.L. Carvalho, and A.L. Bender. 2009. Toxoplasma gondii antibody profile in HIV-infected pregnant women and the risk of congenital toxoplasmosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 28:345-351.
- LaRosa, D.F., J.S. Stumhofer, A.E. Gelman, A.H. Rahman, D.K. Taylor, C.A. Hunter, and L.A. Turka. 2008. T cell expression of MyD88 is required for resistance to Toxoplasma gondii. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:3855-3860.
- Lau, Y.L., and M.Y. Fong. 2008. Toxoplasma gondii: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast Pichia pastoris. *Exp Parasitol*. 119:373-378.
- Lee, Y.H., D.W. Shin, J.H. Lee, H.W. Nam, and M.H. Ahn. 2007. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant Toxoplasma gondii SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. *Yonsei Med J*. 48:396-404.
- Lekutis, C., D.J. Ferguson, M.E. Grigg, M. Camps, and J.C. Boothroyd. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol*. 31:1285-1292.
- Lepage, A.C., D. Buzoni-Gatel, D.T. Bout, and L.H. Kasper. 1998. Gut-derived intraepithelial lymphocytes induce long term immunity against Toxoplasma gondii. *J Immunol*. 161:4902-4908.
- Letscher-Bru, V., O. Villard, B. Risse, M. Zauke, J.P. Klein, and T.T. Kien. 1998. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect Immun*. 66:4503-4506.
- Lindsay, R.W., P.A. Darrah, K.M. Quinn, U. Wille-Reece, L.M. Mattei, A. Iwasaki, S.P. Kasturi, B. Pulendran, J.G. Gall, A.G. Spies, and R.A. Seder. 2010. CD8+ T Cell Responses following Replication-Defective Adenovirus Serotype 5 Immunization Are Dependent on CD11c+ Dendritic Cells but Show Redundancy in Their Requirement of TLR and Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Signaling. *J Immunol*. 185:1513-1521.

- Liu, K.Y., D.B. Zhang, Q.K. Wei, J. Li, G.P. Li, and J.Z. Yu. 2006. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *World J Gastroenterol.* 12:2363-2368.
- Liu, Q., L. Shang, H. Jin, F. Wei, X.Q. Zhu, and H. Gao. 2010 . The protective effect of a *Toxoplasma gondii* SAG1 plasmid DNA vaccine in mice is enhanced with IL-18. *Res Vet Sci.* 89:93-97.
- Lopes, F.M., R. Mitsuka-Bregano, D.D. Goncalves, R.L. Freire, C.J. Karigyo, G.F. Wedy, T. Matsuo, E.M. Reiche, H.K. Morimoto, J.D. Capobiango, I.T. Inoue, J.L. Garcia, and I.T. Navarro. 2009. Factors associated with seropositivity for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women of Londrina, Parana, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:378-382.
- Lourenco, E.V., E.S. Bernardes, N.M. Silva, J.R. Mineo, A. Panunto-Castelo, and M.C. Roque-Barreira. 2006. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 8:1244-1251.
- Luft, B.J., and J.S. Remington. 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis.* 15:211-222.
- Lukashok, S.A., and M.S. Horwitz. 1998. New perspectives in adenoviruses. *Curr Clin Top Infect Dis.* 18:286-305.
- Lunde, M.N., and L. Jacobs. 1983. Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 69:806-808.
- Lykens, J.E., C.E. Terrell, E.E. Zoller, S. Divanovic, A. Trompette, C.L. Karp, J. Aliberti, M.J. Flick, and M.B. Jordan. 2010. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. *J Immunol.* 184:877-885.
- Machado, A.V., J.E. Cardoso, C. Claser, M.M. Rodrigues, R.T. Gazzinelli, and O. Bruna-Romero. 2006. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther.* 17:898-908.
- Mahmoud, A.A., K.S. Warren, and G.T. Strickland. 1976. Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 263:56-57.
- Makedonas, G., N. Hutnick, D. Haney, A.C. Amick, J. Gardner, G. Cosma, A.R. Hersperger, D. Dolfi, E.J. Wherry, G. Ferrari, and M.R. Betts. 2010

- . Perforin and IL-2 upregulation define qualitative differences among highly functional virus-specific human CD8 T cells. *PLoS Pathog.* 6:e1000798.
- Manger, I.D., A.B. Hehl, and J.C. Boothroyd. 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun.* 66:2237-2244.
- Martin, V., A. Supanitsky, P.C. Echeverria, S. Litwin, T. Tanos, A.R. De Roodt, E.A. Guarnera, and S.O. Angel. 2004. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11:704-710.
- McGrory, W.J., D.S. Bautista, and F.L. Graham. 1988. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology.* 163:614-617.
- Mets, M.B., E. Holfels, K.M. Boyer, C.N. Swisher, N. Roizen, L. Stein, M. Stein, J. Hopkins, S. Withers, D. Mack, R. Luciano, D. Patel, J.S. Remington, P. Meier, and R. McLeod. 1996. Eye manifestations of congenital toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 122:309-324.
- Miller, C.M., N.R. Boulter, R.J. Ikin, and N.C. Smith. 2009. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 39:23-39.
- Miller, R., X. Wen, B. Dunford, X. Wang, and Y. Suzuki. 2006. Cytokine production of CD8+ immune T cells but not of CD4+ T cells from *Toxoplasma gondii*-infected mice is polarized to a type 1 response following stimulation with tachyzoite-infected macrophages. *J Interferon Cytokine Res.* 26:787-792.
- Mineo, J.R., and L.H. Kasper. 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol.* 79:11-20.
- Mishima, M., X. Xuan, A. Shioda, Y. Omata, K. Fujisaki, H. Nagasawa, and T. Mikami. 2001. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. *J Vet Med Sci.* 63:433-438.
- Mittal, S.K., N. Aggarwal, G. Sailaja, A. Van Olphen, A. Hogenesch, A. North, J. Hays, and S. Moffatt. 2001. Immunization with DNA, adenovirus or both in biodegradable alginate microspheres: effect of route of inoculation on immune response. *Vaccine.* 19:253-263.
- Molinier-Frenkel, V., R. Lengagne, F. Gaden, S.S. Hong, J. Choppin, H. Gahery-Segard, P. Boulanger, and J.G. Guillet. 2002. Adenovirus hexon protein is a potent adjuvant for activation of a cellular immune response. *J Virol.* 76:127-135.
- Molinier-Frenkel, V., A. Prevost-Blondel, S.S. Hong, R. Lengagne, S. Boudaly, M.K. Magnusson, P. Boulanger, and J.G. Guillet. 2003. The maturation of murine dendritic

- cells induced by human adenovirus is mediated by the fiber knob domain. *J Biol Chem.* 278:37175-37182.
- Montoya, J.G., and O. Liesenfeld. 2004. Toxoplasmosis. *Lancet.* 363:1965-1976.
- Moss, B. 1996. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11341-11348.
- Moss, B. 2011. Smallpox vaccines: targets of protective immunity. *Immunol Rev.* 239:8-26.
- Muruve, D.A. 2004. The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum Gene Ther.* 15:1157-1166.
- Muruve, D.A., M.J. Barnes, I.E. Stillman, and T.A. Libermann. 1999. Adenoviral gene therapy leads to rapid induction of multiple chemokines and acute neutrophil-dependent hepatic injury in vivo. *Hum Gene Ther.* 10:965-976.
- Muruve, D.A., V. Petrilli, A.K. Zaiss, L.R. White, S.A. Clark, P.J. Ross, R.J. Parks, and J. Tschopp. 2008. The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature.* 452:103-107.
- Mussi-Pinhata, M.M., and A.Y. Yamamoto. 1999. [Congenital and perinatal infections]. *J Pediatr (Rio J).* 75 Suppl 1:S15-30.
- Nicklin, S.A., E. Wu, G.R. Nemerow, and A.H. Baker. 2005. The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol Ther.* 12:384-393.
- Nielsen, H.V., S.L. Lauemoller, L. Christiansen, S. Buus, A. Fomsgaard, and E. Petersen. 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infect Immun.* 67:6358-6363.
- Norrby, E., A. Bartha, P. Boulanger, R.S. Dreizin, H.S. Ginsberg, S.S. Kalter, H. Kawamura, W.P. Rowe, W.C. Russell, W. Schlesinger, and R. Wigand. 1976. Adenoviridae. *Intervirology.* 7:117-125.
- O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol.* 7:425-428.
- Orefice, F., and A.A. Bonfioli. 2000. Toxoplasmose. In *Uveíte Clínica e Cirúrgica.* F. Orefice, editor. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro. 619-680.
- Paoletti, E., B.R. Lipinkas, C. Samsonoff, S. Mercer, and D. Panicali. 1984. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 81:193-197.
- Park, S.M., H.J. Ko, D.H. Shim, J.Y. Yang, Y.H. Park, R. Curtiss, 3rd, and M.N. Kweon. 2008. MyD88 signaling is not essential for induction of antigen-specific B cell responses but is

- indispensable for protection against *Streptococcus pneumoniae* infection following oral vaccination with attenuated *Salmonella* expressing PspA antigen. *J Immunol.* 181:6447-6455.
- Parmley, S.F., U. Gross, A. Sucharczuk, T. Windeck, G.D. Sgarlato, and J.S. Remington. 1994. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.* 80:293-301.
- Parrino, J., L.H. McCurdy, B.D. Larkin, I.J. Gordon, S.E. Rucker, M.E. Enama, R.A. Koup, M. Roederer, R.T. Bailer, Z. Moodie, L. Gu, L. Yan, and B.S. Graham. 2007. Safety, immunogenicity and efficacy of modified vaccinia Ankara (MVA) against Dryvax challenge in vaccinia-naive and vaccinia-immune individuals. *Vaccine.* 25:1513-1525.
- Pena, H.F., S.M. Gennari, J.P. Dubey, and C. Su. 2007. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. *Int J Parasitol.*
- Pena, H.F., R.M. Soares, M. Amaku, J.P. Dubey, and S.M. Gennari. 2006. *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sao Paulo state, Brazil: seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. *Res Vet Sci.* 81:58-67.
- Petersen, E., H.V. Nielsen, L. Christiansen, and J. Spenter. 1998. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 16:1283-1289.
- Resende, D.M., B.C. Caetano, M.S. Dutra, M.L. Penido, C.F. Abrantes, R.M. Verly, J.M. Resende, D. Pilo-Veloso, S.A. Rezende, O. Bruna-Romero, A.P. Fernandes, and R.T. Gazzinelli. 2008a. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania amastigote* specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. *Vaccine.* 26:4585-4593.
- Resende, M.G., B. Fux, B.C. Caetano, E.A. Mendes, N.M. Silva, A.M. Ferreira, M.N. Melo, R.W. Vitor, and R.T. Gazzinelli. 2008b. The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain. *An Acad Bras Cienc.* 80:85-99.
- Reyes-Sandoval, A., T. Berthoud, N. Alder, L. Siani, S.C. Gilbert, A. Nicosia, S. Colloca, R. Cortese, and A.V. Hill. 2010. Prime-boost immunization with adenoviral and modified vaccinia virus Ankara vectors enhances the durability and polyfunctionality of protective malaria CD8+ T-cell responses. *Infect Immun.* 78:145-153.
- Richardson, J.S., M.K. Yao, K.N. Tran, M.A. Croyle, J.E. Strong, H. Feldmann, and G.P. Kobinger. 2009. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One.* 4:e5308.

- Roberts, D.M., A. Nanda, M.J. Havenga, P. Abbink, D.M. Lynch, B.A. Ewald, J. Liu, A.R. Thorner, P.E. Swanson, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, A.A. Lemckert, L. Holterman, B. Chen, A. Dilraj, A. Carville, K.G. Mansfield, J. Goudsmit, and D.H. Barouch. 2006. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. *Nature*. 441:239-243.
- Rocha, C.D., B.C. Caetano, A.V. Machado, and O. Bruna-Romero. 2004. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Int Microbiol*. 7:83-94.
- Rodriguez, A., R. Mintardjo, D. Tax, G. Gillissen, J. Custers, M.G. Pau, J. Klap, S. Santra, H. Balachandran, N.L. Letvin, J. Goudsmit, and K. Radosevic. 2009. Evaluation of a prime-boost vaccine schedule with distinct adenovirus vectors against malaria in rhesus monkeys. *Vaccine*. 27:6226-6233.
- Roque-Resendiz, J.L., R. Rosales, and P. Herion. 2004. MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis. *Parasitology*. 128:397-405.
- Russell, W.C. 2000. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*. 81:2573-2604.
- Sabin, A.B. 1941. Toxoplasmic encephalithes in children. *J Am Med Assoc*. 116:801-807.
- Saeij, J.P., J.P. Boyle, and J.C. Boothroyd. 2005. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. *Trends Parasitol*. 21:476-481.
- Santiago, H.C., M.A. Oliveira, E.A. Bambirra, A.M. Faria, L.C. Afonso, L.Q. Vieira, and R.T. Gazzinelli. 1999. Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun*. 67:4939-4944.
- Sayles, P.C., G.W. Gibson, and L.L. Johnson. 2000. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun*. 68:1026-1033.
- Schatzmayr, H.G. 2001. [Smallpox, an old foe]. *Cad Saude Publica*. 17:1525-1530.
- Seder, R.A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W.E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10188-10192.
- Seregin, S.S., and A. Amalfitano. 2009. Overcoming pre-existing adenovirus immunity by genetic engineering of adenovirus-based vectors. *Expert Opin Biol Ther*. 9:1521-1531.
- Shaw, G., S. Morse, M. Ararat, and F.L. Graham. 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J*. 16:869-871.

- Shenk, T.E. 2001. Adenoviridae: the viruses and their replication. *In* Fields Virology. Vol. 2. D.M.H. Knipe, P.M., editor. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2265-2300.
- Souza, A.P., L. Haut, A. Reyes-Sandoval, and A.R. Pinto. 2005. Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biol Res.* 38:509-522.
- Spalding, S.M., M.R. Amendoeira, C.H. Klein, and L.C. Ribeiro. 2005. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38:173-177.
- Stickl, H., V. Hochstein-Mintzel, A. Mayr, H.C. Huber, H. Schafer, and A. Holzner. 1974. [MVA vaccination against smallpox: clinical tests with an attenuated live vaccinia virus strain (MVA) (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr.* 99:2386-2392.
- Sukhumavasi, W., C.E. Egan, A.L. Warren, G.A. Taylor, B.A. Fox, D.J. Bzik, and E.Y. Denkers. 2008. TLR adaptor MyD88 is essential for pathogen control during oral toxoplasma gondii infection but not adaptive immunity induced by a vaccine strain of the parasite. *J Immunol.* 181:3464-3473.
- Sullivan, N.J., T.W. Geisbert, J.B. Geisbert, L. Xu, Z.Y. Yang, M. Roederer, R.A. Koup, P.B. Jahrling, and G.J. Nabel. 2003. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature.* 424:681-684.
- Sullivan, N.J., A. Sanchez, P.E. Rollin, Z.Y. Yang, and G.J. Nabel. 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature.* 408:605-609.
- Sumida, S.M., D.M. Truitt, M.G. Kishko, J.C. Arthur, S.S. Jackson, D.A. Gorgone, M.A. Lifton, W. Koudstaal, M.G. Pau, S. Kostense, M.J. Havenga, J. Goudsmit, N.L. Letvin, and D.H. Barouch. 2004. Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. *J Virol.* 78:2666-2673.
- Sutter, G., and B. Moss. 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:10847-10851.
- Sutter, G., and C. Staib. 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 3:263-271.
- Suzuki, Y., A. Sher, G. Yap, D. Park, L.E. Neyer, O. Liesenfeld, M. Fort, H. Kang, and E. Gufwoli. 2000. IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57BL/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* 164:5375-5382.

- Suzuki, Y., X. Wang, B.S. Jortner, L. Payne, Y. Ni, S.A. Michie, B. Xu, T. Kudo, and S. Perkins. 2010. Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells. *Am J Pathol.* 176:1607-1613.
- Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, and G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol.* 145:3796-3806.
- Switaj, K., A. Master, M. Skrzypczak, and P. Zaborowski. 2005. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect.* 11:170-176.
- Tait, E.D., and C.A. Hunter. 2009. Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:201-210.
- Tait, E.D., K.A. Jordan, C.D. Dupont, T.H. Harris, B. Gregg, E.H. Wilson, M. Pepper, F. Dzierzinski, D.S. Roos, and C.A. Hunter. 2010. Virulence of *Toxoplasma gondii* is associated with distinct dendritic cell responses and reduced numbers of activated CD8+ T cells. *J Immunol.* 185:1502-1512.
- Tenter, A.M., A.R. Heckeroth, and L.M. Weiss. 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *In Int J Parasitol.* Vol. 30. 1217-1258.
- Thacker, E.E., M. Nakayama, B.F. Smith, R.C. Bird, Z. Muminova, T.V. Strong, L. Timares, N. Korokhov, A.M. O'Neill, T.D. de Gruijl, J.N. Glasgow, K. Tani, and D.T. Curiel. 2009. A genetically engineered adenovirus vector targeted to CD40 mediates transduction of canine dendritic cells and promotes antigen-specific immune responses in vivo. *Vaccine.* 27:7116-7124.
- Tomko, R.P., R. Xu, and L. Philipson. 1997. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:3352-3356.
- Varga, M.J., C. Weibull, and E. Everitt. 1991. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J Virol.* 65:6061-6070.
- Velmurugan, G.V., J.P. Dubey, and C. Su. 2008. Genotyping studies of *Toxoplasma gondii* isolates from Africa revealed that the archetypal clonal lineages predominate as in North America and Europe. *Vet Parasitol.* 155:314-318.
- Vossenkamper, A., D. Struck, C. Alvarado-Esquivel, T. Went, K. Takeda, S. Akira, K. Pfeffer, G. Alber, M. Lochner, I. Forster, and O. Liesenfeld. 2004. Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. *Eur J Immunol.* 34:3197-3207.

- Wang, H., S. He, Y. Yao, H. Cong, H. Zhao, T. Li, and X.Q. Zhu. 2009. Toxoplasma gondii: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol.* 122:226-232.
- Yang, Y., Q. Li, H.C. Ertl, and J.M. Wilson. 1995a. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol.* 69:2004-2015.
- Yang, Y., G. Trinchieri, and J.M. Wilson. 1995b. Recombinant IL-12 prevents formation of blocking IgA antibodies to recombinant adenovirus and allows repeated gene therapy to mouse lung. *Nat Med.* 1:890-893.
- Yap, G., M. Pesin, and A. Sher. 2000. Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii. *J Immunol.* 165:628-631.
- Yarovinsky, F., and A. Sher. 2006. Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii. *Int J Parasitol.* 36:255-259.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, J.F. Andersen, G.L. Bannenberg, C.N. Serhan, M.S. Hayden, S. Hieny, F.S. Sutterwala, R.A. Flavell, S. Ghosh, and A. Sher. 2005. TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science.* 308:1626-1629.
- Zhang, J., S. He, H. Jiang, T. Yang, H. Cong, H. Zhou, Q. Gu, Y. Li, and Q. Zhao. 2007. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of Toxoplasma gondii and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitol Res.* 101:331-338.
- Zhang, Y., and J.M. Bergelson. 2005. Adenovirus receptors. *J Virol.* 79:12125-12131.
- Zhao, Y.O., A. Khaminets, J.P. Hunn, and J.C. Howard. 2009. Disruption of the Toxoplasma gondii parasitophorous vacuole by IFN-gamma-inducible immunity-related GTPases (IRG proteins) triggers necrotic cell death. *PLoS Pathog.* 5:e1000288.
- Zhu, J., X. Huang, and Y. Yang. 2007. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol.* 81:3170-3180.

8. ANEXOS

1- Produção técnico-científica:

1- MACHADO, A.M.V., CAETANO, B.C., FONSECA, F.G., BRUNA-ROMERO, O., POLIDORO, R.B., GAZZINELLI, R.T., **MENDES, E.A.** Utilização de vírus Influenza recombinantes e Vírus Ankara Modificado (MVA) com genes que codificam para as proteínas de superfície SAG1 e SAG2 do *Toxoplasma gondii* como vacinas contra a toxoplasmose, 2009.

Patente: Privilégio de Inovação n. 0704860A2, Utilização de vírus Influenza recombinantes e Vírus Ankara Modificado (MVA) com genes que codificam para as proteínas de superfície SAG1 e SAG2 do *Toxoplasma gondii* como vacinas contra a toxoplasmose. 21 de Dezembro de 2006 (Depósito); 11 de Agosto de 2009 (Concessão).

2- MACHADO, A.M.V., CAETANO, B.C., FONSECA, F.G., BRUNA-ROMERO, O., POLIDORO, R.B., GAZZINELLI, R.T., **MENDES, E.A.** Vaccine comprising *T. gondii* surface proteins, 2009.

Patente: Patente no Exterior n. WO2009/079731A3, Vaccine comprising *T. gondii* surface protein. 22 de Dezembro de 2008 (Depósito); 02 de Julho de 2009 (Concessão).

2- Artigos completos publicados/submetidos em periódicos científicos:

1- MyD88-dependent protective immunity elicited by adenovirus 5 expressing the surface antigen 1 from *T. gondii* is mediated by CD8+ lymphocytes

Autores: **Érica A. Mendes**, Bráulia C. Caetano, Marcus L. O. Penido, Oscar Bruna-Romero e Ricardo T. Gazzinelli. Periódico: *Vaccine* (2011) 29(27): 4476-84.

2- The role of MHC haplotypes H2d/H2b in mouse resistance/susceptibility to cyst formation is influenced by the lineage of infective *Toxoplasma gondii* strain

Autores: Marianne G. Resende, Blima Fux, Bráulia C. Caetano, **Érica A. Mendes**, Neide M. Silva, Adriana M. Ferreira, Maria Norma Melo, Ricardo W.A. Vitor e Ricardo T. Gazzinelli. Periódico: *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2008) 80(1): 85-99.

3- Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice.

Autores: Caetano, B.C., Bruna-Romero, O., Fux, B., **Mendes, E.A.**, Penido, M.L.O., Gazzinelli, R.T.
Periódico: *Human Gene Therapy* (2006), 17, p.415-426.