

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE VACINAÇÃO
CONTRA *Toxoplasma Gondii* UTILIZANDO
Corynebacterium pseudotuberculosis ATENUADAS
RECOMBINANTES COMO VEÍCULO PARA A
APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS.

MARA CAMILA ARANTES MARQUES DE AGUIAR

ORIENTADOR: Prof. Dr. Oscar Bruña-Romero

BELO HORIZONTE

2012

MARA CAMILA ARANTES MARQUES DE AGUIAR

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE VACINAÇÃO
CONTRA *Toxoplasma gondii* UTILIZANDO
Corynebacterium pseudotuberculosis ATENUADAS
RECOMBINANTES COMO VEÍCULO PARA A
APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

ORIENTADOR: Dr. Oscar Bruña-Romero
Universidade Federal de Minas Gerais

BELO HORIZONTE

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Terezinha, pelo carinho, paciência, incentivo e confiança.

Ao Prof. Dr. Oscar Bruna-Romero, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e apoio.

Aos meus amigos do LAR, pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

À minha família, irmãos, sobrinhos e amigos, pela torcida, carinho e amizade.

À todos os colaboradores: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo e sua aluna Dra. Fernanda Alves Dorella e Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor e Rosálida Estevan Nazar Lopes, pelo suporte para a realização deste trabalho.

Aos professores, pelos ensinamentos e contribuição à minha formação, e aos funcionários do programa de Pós-Graduação, pela atenção e suporte aos alunos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Toxoplasmose.....	3
1.1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos.....	3
1.1.2 Ciclo de vida e transmissão do <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.1.3 Ocorrência de <i>T. gondii</i> em caprinos e ovinos	8
1.1.4 Resposta imune contra <i>T. gondii</i> e vacinas	10
1.2 <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>.....	17
1.2.1 Aspectos gerais	17
1.2.2 Resposta imune induzida por <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	20
1.2.3 <i>Corynebacterium</i> recombinantes como vetores vacinais	22
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	27
4.2 Construção do gene sintético de SAG2 e clonagem no vetor pECTACK99.....	27
4.3 Transformação bacteriana	28
4.3.1 Confeção de <i>Escherichia coli</i> XL1-blue quimiocompetente	28
4.3.2 Transformação de <i>E. coli</i> XL1-blue	28
4.3.3 Extração do DNA plasmidiano de <i>E. coli</i> XL1-blue	29

4.3.4 Digestão enzimática do plasmídeo para confirmação do inserto	29
4.4 Construção dos plasmídeos pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3	30
4.4.1 Amplificação das sequências de SAG1 e SAG3	30
4.4.2 Clonagem dos fragmentos de SAG1 e SAG3 no vetor de expressão pECTACK99-PS.....	31
4.5 Construção de <i>C. pseudotuberculosis</i> recombinantes.....	32
4.5.1 Confeção de <i>C. pseudotuberculosis</i> eletrocompetentes	32
4.5.2 Eletroporação de <i>C. pseudotuberculosis</i>	33
4.5.3 Extração do DNA plasmidiano de <i>C. pseudotuberculosis</i>	33
4.6 Expressão da proteína SAG2 por <i>C. pseudotuberculosis</i> recombinantes	34
4.6.1 Indução.....	34
4.6.2 Extração das proteínas secretadas e citoplasmáticas de <i>C.pseudotuberculosis</i>	34
4.7 Detecção das proteínas recombinantes por Western-Blotting.....	35
4.8 Purificação e titulação de adenovírus recombinantes para imunização	36
4.9 Imunização de animais experimentais	37
4.9.1 Cultivo de <i>C.pseudotuberculosis</i> recombinantes	37
4.9.2 Experimentos de vacinação.....	37
4.10 Análise da resposta imune humoral.....	38
4.10.1 Preparo do antígeno total lisado (TLA) de taquizoítos	38
4.10.2 Imunofluorescência	39
4.10.3 Ensaio Imunoenzimático ELISA.....	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Construção de <i>C. pseudotuberculosis</i> recombinantes.....	41
5.1.1 Construção do gene sintético de SAG2 e clonagem no vetor pECTACK99.....	41
5.1.2 Detecção da expressão de SAG2 através de Western Blotting	43
5.2 Construção dos plasmídeos pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3	44

5.2.1 Amplificação das sequências de SAG1 e SAG3	44
5.2.2 Clonagem dos fragmentos de SAG1 e SAG3 no vetor de expressão pECTACK99-PS	45
5.3 Análise da resposta imune humoral	46
5.3.1 Detecção da resposta imune humoral induzida nos camundongos imunizados	47
5.3.2 Imunofluorescência.....	48
5.3.3 Ensaio Imunoenzimático ELISA.....	50
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Antígenos de <i>T. gondii</i> em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita e vias de transmissão.....	7
Figura 2: Vantagens (+) e desvantagens (-) das estratégias usadas no desenvolvimento de vacinas contra <i>T. gondii</i>	14
Figura 3: Plasmídeo pECTAC-K99.....	23
Figura 4: Representação esquemática da construção do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2.....	28
Figura 5: Representação esquemática da construção dos plasmídeos pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3.....	32
Figura 6: Predição do peptídeo sinal da sequência da fosfolipase D (PLD) de <i>C.pseudotuberculosis</i> usando o programa SignalP 3.0.....	42
Figura 7: Representação esquemática da construção contendo a sequência do peptídeo sinal da PLD e a sequência de SAG2.....	42
Figura 8: Resolução eletroforética da digestão do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 com XmaI e XbaI para confirmar a presença do inserto.....	43
Figura 9: Western-blotting para confirmação da expressão do antígeno SAG2 (20kDa) por <i>C. pseudotuberculosis</i>	44
Figura 10: Resolução eletroforética da reação de PCR para amplificação de SAG1 e SAG3 a partir dos plasmídeos padCMV-link-SAG1 e padCMV-link-SAG3.....	45

Figura 11: Resolução eletroforética da digestão das construções de pECTACK99-PS-SAG1 com EcoRI e XbaI e pECTACK99-PS-SAG3 EcoRI e ClaI para confirmar a presença dos insertos.....	46
Figura 12: Western-blotting para detecção da resposta imune humoral induzida nos camundongos imunizados.....	47
Figura 13: Imunofluorescência para detecção da resposta imune humoral induzida nos camundongos imunizados.....	49
Figura 14: ELISA para detecção da resposta imune humoral induzida nos camundongos imunizados.....	51
Figura 15: Diluições seriadas dos soros de animais vacinados com os vetores recombinantes após a dose inicial e reforço.....	52
Tabela 1: Manifestações clínicas de <i>T. gondii</i>	4
Tabela 2: Prevalência de anticorpos contra <i>T. gondii</i> em caprinos e ovinos no Brasil.....	8
Tabela 3: Antígenos de superfície candidatos a vacinas (SAG1, SAG2 e SAG3) testados contra <i>T. gondii</i>	15
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de SAG1, SAG2, SAG3 e do peptídeo sinal da PLD.....	30
Tabela 5: Protocolos de vacinação.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

- ° C - Graus Celsius
- BHI - Caldo infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion)
- BSA - Albumina de soro bovino
- BSR - Recombinantes específicos de bradizoítos
- DAB - Diaminobenzidina
- DMEM – *Dullbeco's Modified Eagle Medium*
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
- DO_{600nm} - Densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm
- DTT - Ditioneitol
- EDTA - Etileno diamino tetra-acetato dissódio
- ELISA - Ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- ENO - Enolase
- FITC - Isoticianato de fluoresceína
- GPI - Âncora de glicosilfosfatidilinositol
- GRA - Grânulos densos
- HEPES – ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic
- IFN γ - Interferon-gamma
- IgG - Imunoglobulina G
- IL – Interleucina
- IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
- iNOS – óxido nítrico sintetase induzível
- Kb - Quilobases
- kDa – Kilodalton
- KVolts - Kilovolts
- LB - Meio Luria-Bertani
- LC - Linfadenite Caseosa
- LDH - Lactase dehidrogenase
- MAG - Proteínas da matriz
- MCS - Sítio múltiplo de clonagem
- MIC - Proteínas do micronema

mL - Mililitro
mM - Milimolar
ng - Nanograma
nm – Nanômetro
pb - Pares de bases
PBS - Salina tamponada com fosfato (Phosphate-buffered saline)
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction)
p.f.u. - Unidades formadoras de placa de lise
pH - Potencial Hidrogeniônico
PLD - Fosfolipase D
pMol - Picomol
PS - Peptídeo sinal
q.s.p - Quantidade suficiente para
RBS - Sítio de ligação de ribossomo
ROP - Róptrias
SAG – Antígenos de superfície
SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
SFB - Soro fetal bovino
SRS - Sequência relacionada à SAG
TCA - Ácido tricloroacético
TgRP0 - Proteínas relacionadas à embriogênese de *T. gondii*
TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA
TH1 - Células T auxiliares do tipo 1
TH2 - Células T auxiliares do tipo 2
TLA – Antígeno total lisado
TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TnFuZ - Transposon
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
 μ FD - Microfaraday
 μ g - Micrograma
 μ L - Microlitro
 μ M - Micromolar
 Ω – OHM

RESUMO

A toxoplasmose é uma doença disseminada mundialmente e tem como agente etiológico o protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório. A doença apresenta quadro clínico variado, desde infecções assintomáticas a manifestações sistêmicas extremamente graves. Na pecuária, a transmissão congênita pode causar perdas significativas devido a abortos, ocorrência de natimortalidade, malformações fetais e nascimento de cordeiros fracos, e apesar dos altos índices de infecção, ainda não existe um tratamento capaz de erradicar o parasita do hospedeiro ou vacinas realmente eficazes. No intuito de desenvolver uma vacina bivalente contra Toxoplasmose e Linfadenite caseosa, outra doença responsável por grandes perdas econômicas em rebanhos de caprinos e ovinos e cuja causa é a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, neste trabalho, a linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis* foi usada como um vetor vivo para a expressão do antígeno SAG2 de *T. gondii*. Foi possível detectar a expressão de SAG2 por *C. pseudotuberculosis* (CpSAG2) através de Western Blotting. A bactéria recombinante foi usada, juntamente com um adenovírus humano recombinante expressando o mesmo antígeno (AdSAG2), na imunização de camundongos BALB/c mediante protocolos de imunização do tipo iniciação/reforço homólogos e heterólogos. CpSAG2 e AdSAG2 foram capazes de estimular uma resposta humoral em todos os grupos vacinados, detectada através da reatividade do soro dos animais com o antígeno total lisado de taquizoítos (TLA) ou com a própria proteína SAG2, em ensaios de ELISA e Western Blotting, respectivamente. Os resultados demonstram a correta expressão *in vivo* de SAG2 pela linhagem atenuada T1, assim como a imunogenicidade desta vacina bivalente nos animais inoculados, em especial quando utilizada em protocolos iniciação/reforço heterólogos, tornando esta bactéria um vetor vivo promissor para a geração de formulações vacinais contra estas e outras doenças de características similares.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a worldwide disease and its etiologic agent is the protozoan intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. The disease presents a clinical picture that varies from asymptomatic infections to extremely serious systemic manifestations. In livestock, congenital transmission can cause significant losses due to abortions, stillbirths, fetal malformations and birth of weak lambs and despite the high rates of infection there is still no treatment able to eradicate the parasite or truly effective vaccines that could protect against its infections. In an attempt to generate a bivalent vaccine against this disease as well as against caseous lymphadenitis, another disease that also affects ovine and caprine herds and is caused by the bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the attenuated T1 strain of *C. pseudotuberculosis* was used in this work as a live vector for the expression of *T. gondii* SAG2 antigen. In Western Blotting assays it was possible to detect the expression of SAG2 by *C. pseudotuberculosis* (CpSAG2). SAG2-recombinant bacteria and adenoviruses (AdSAG2) were used to immunize BALB/c mice with homologous and heterologous prime-boost protocols. CpSAG2 and AdSAG2 were able to stimulate a humoral response in all vaccinated groups, generating antibodies that reacted with *T. gondii* lysate antigen (TLA) as well as with SAG2 itself, as detected by ELISA and Western blotting assays, respectively. The results demonstrate the correct expression of SAG2 *in vivo* by the attenuated T1 strain as well as the immunogenicity of this bivalent vaccine candidate, in particular when used in heterologous prime-boost regimes, making of this microorganism a promising live vector for the generation of vaccinal formulations against these as well as other diseases with similar characteristics.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Toxoplasmose

1.1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos

A toxoplasmose é uma doença disseminada mundialmente e tem como agente etiológico o protozoário *Toxoplasma gondii*, um parasita intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Subclasse Coccidia, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystidae, e subfamília Toxoplasmatinae (Levine *et al*, 1980). O *T. gondii* foi inicialmente descrito em 1908, por Nicolle e Manceaux, a partir de tecidos do roedor *Ctenodactylus gundi*, e por Splendore (1908), no Brasil, em tecidos de coelhos. O gênero foi classificado por Nicolle e Manceaux como *Toxoplasma* devido a sua forma curvada. (do Grego Toxo= curva, arco; Plasma=criatura) (Weiss *et al*, 2009).

Esta zoonose possui grande importância médica e veterinária, uma vez que pode infectar praticamente todas as espécies de sangue quente, desde aves e humanos, até espécies de interesse econômico como caprinos, ovinos, suínos, etc. A ingestão de carne crua ou mal cozida, provenientes de animais infectados, é a principal rota para transmissão de *T. gondii* ao homem (EFSA, 2007, Bonametti *et al*, 1997, Dias *et al*, 2005). Estima-se que cerca de um terço da população mundial tenha sido exposta ao *T. gondii* (Tenter *et al*, 2000).

A doença apresenta quadro clínico variado, desde infecção assintomática a manifestações sistêmicas extremamente graves (tabela 1) (Ministério da Saúde, 2010). A doença não apresenta consequências graves em indivíduos saudáveis que conseguem desenvolver uma resposta imune eficaz e capaz de controlar a proliferação do parasita, evoluindo geralmente de maneira totalmente assintomática ou com sintomas como febre, linfoadenomegalia, dores de cabeça, mialgia e anorexia (Lindsay *et al*, 1995). No entanto, a infecção pode causar uma doença severa em indivíduos imunodeficientes e abortos em

mulheres grávidas, assim como morte neonatal, malformações fetais, ou qualidade de vida reduzida em crianças que sobrevivem à infecção pré-natal (Bayarri *et al*, 2012).

Os sinais clássicos da infecção congênita incluem coriorretinite, hidrocefalia e calcificações intracranianas, além de uma série de desordens físicas e mentais. A reativação da infecção latente de *T. gondii* em pacientes com HIV se manifesta tipicamente como toxoplasmose cerebral (Jones *et al*, 1999), podendo causar encefalite e também infecções sistêmicas, com alto risco de morte se não diagnosticada e tratada.

Tabela 1. Manifestações clínicas de *T. gondii*. Adaptado de Ministério da Saúde, 2010.

Toxoplasmose febril aguda	Na maioria das vezes, a infecção é assintomática. Porém, em muitos casos, pode generalizar-se e ser acompanhada de exantema, sintomas de acometimento pulmonar, miocárdico, hepático ou cerebral. Há casos em que ocorrem pneumonia difusa, miocardite, miosite, hepatite, encefalite e exantema maculopapular.
Linfadenite toxoplásmica	Geralmente, o quadro se caracteriza por linfadenopatia localizada, especialmente em mulheres e, em geral, envolvendo os nódulos linfáticos cervicais posteriores ou, mais raramente, linfadenopatia generalizada. Esse quadro é capaz de persistir por 1 semana ou 1 mês e pode assemelhar-se a mononucleose infecciosa, acompanhada por linfócitos atípicos no sangue periférico.
Toxoplasmose ocular	A coriorretinite e a lesão mais frequentemente em 30 a 60% dos pacientes com esta enfermidade. Dois tipos de lesões de retina podem ser observados: a retinite aguda, com intensa inflamação, e a retinite crônica, com perda progressiva de visão, algumas vezes chegando à cegueira.
Toxoplasmose em paciente imunodeprimido	Qualquer imunossupressão significativa, comumente associadas a aids, doença de Hodgkin e uso de imunossupressores, pode ser seguida por um recrudescimento da Toxoplasmose. As lesões são focais e vistas com maior frequência no

cérebro e, menos frequentemente, na retina, miocárdio e pulmões.

Toxoplasmose neonatal

A infecção varia de assintomática a letal, dependendo da idade fetal e de fatores não conhecidos. Os sintomas comuns são prematuridade, baixo peso, coriorretinite pós-maturidade, estrabismo, icterícia e hepatomegalia. Se a infecção ocorreu no último trimestre da gravidez, o recém-nascido pode apresentar, principalmente, pneumonia, miocardite ou hepatite com icterícia, anemia, plaquetopenia, coriorretinite e ausência de ganho de peso, ou pode permanecer assintomático. Se ocorrer no segundo trimestre da gestação, o bebê pode nascer prematuramente, mostrando sinais de encefalite com convulsões, pleocitose do líquido e calcificações cerebrais. Pode apresentar a tetrade de Sabin: microcefalia com hidrocefalia, coriorretinite, retardo mental e calcificações intracranianas.

A soroprevalência da doença apresenta grande variação dentre as populações do mundo, e até mesmo entre diferentes regiões de um país, pois esta relacionada a condições ambientais, hábitos alimentares, de higiene e susceptibilidade do hospedeiro. Nos Estados Unidos, calcula-se que cerca de 17, 5% a 29.2% da população em geral são soropositivos para *T. gondii* (Jones, 2001), enquanto os valores em países tropicais, como o Panamá, podem chegar a 90% em indivíduos com mais de 60 anos (Sousa *et al*, 1988), já que os fatores climáticos favorecem a sobrevivência de oocistos. Em países onde o hábito de comer vegetais e carnes crus são comuns, como a França (Bayarri, *et al*, 2012), os valores também são altos com prevalência de 47% em comunidades rurais (Fromont, 2009). Estima-se que 70 a 95% da população estão infectados (Ministério da Saúde, 2010).

1.1.2 Ciclo de vida e transmissão do *Toxoplasma gondii*

O ciclo infeccioso de *T. gondii* é heteroxeno facultativo, apresentando três estágios – esporozoítos, bradizoítos e taquizoítos (Tenter *et al*, 2000). Os esporozoítos são a forma infectante oriunda do processo de reprodução sexuada de *T. gondii*. O ciclo de vida sexuada do parasita ocorre apenas no intestino de membros da família Felidae (Dubey, 1977), únicos hospedeiros

definitivos do parasita, as demais espécies, classificadas como hospedeiros intermediários, não desenvolvem as formas sexuadas do parasita e não liberam oocistos nas fezes. Na mucosa intestinal de felídeos infectados, não imunes, ocorre a diferenciação dos gametas, fecundação e formação de oocistos não esporulados que são liberados no ambiente através das fezes. Sob condições adequadas de temperatura, umidade e oxigenação os oocistos se tornam infectantes. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos com quatro esporozoítos (Aramine *et al*, 1999) e podem permanecer viáveis em ambiente úmido por até 18 meses (Kawazoe, 2005), contaminando fontes de água e alimentos.

A transmissão ocorre principalmente por via oral, através da ingestão de oocistos contendo esporozoítos, liberados nas fezes de felídeos, ou pela ingestão de cistos contendo bradizoítos, presentes em carne crua ou mal cozida. Outra forma de infecção é a congênita, que ocorre quando a fêmea é infectada durante a gestação ou devido à reativação da infecção crônica em gestantes com comprometimento imune, decorrente da transmissão transplacentária de taquizoítos (figura 1) (Caetano, 2005).

Após a ingestão, cistos ou oocistos invadem a célula hospedeira e se diferenciam em taquizoítos (Weiss *et al*, 2009), forma assexuada que se divide rapidamente dentro das células. Na fase aguda da doença ocorre a ampla disseminação do parasita no organismo hospedeiro, com a multiplicação ativa dos taquizoítos em diferentes tipos de células. Devido à exposição do parasita a algumas condições de estresse, como a resposta imune do hospedeiro (Weiss *et al*, 2009), durante a infecção alguns taquizoítos se diferenciam em bradizoítos, formas de multiplicação lenta. Os bradizoítos formam cistos, presentes principalmente no tecido muscular esquelético, cardíaco e no cérebro (Dubey *et al*, 1998), e podem permanecer viáveis durante toda a vida do hospedeiro caracterizando a fase crônica da doença. Os cistos teciduais são infecciosos aos hospedeiros intermediários ou a felinos se ingeridos.

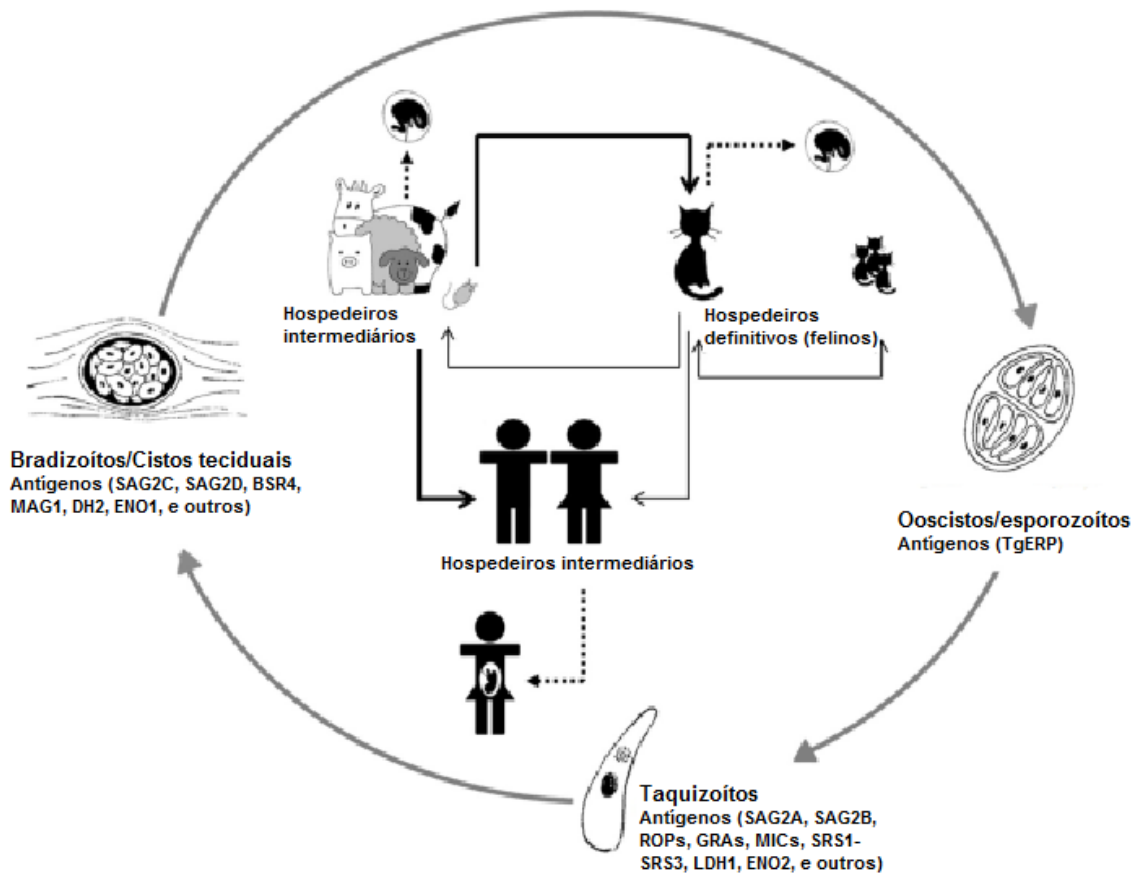


Figura 1: Antígenos já identificados de *T. gondii* em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita e vias de transmissão. Seta fina – transmissão horizontal por oocistos. Seta espessa – transmissão horizontal por cistos teciduais. Seta pontilhada - transmissão vertical por taquizoítos. SAG – antígenos de superfície; ROP – roptrias; GRA – grânulos densos; MIC – proteínas do micronema; SRS – sequências relacionadas à SAG; BSR – antígenos recombinantes específicos de bradizoítos; MAG – proteínas da matriz; LDH – lactase dehydrogenase; ENO – enolase; TgRP0- proteínas relacionadas a embriogênese de *T. gondii*. Adaptado de Bruna-Romero *et al*, 2012.

1.1.3 Ocorrência de *T.gondii* em caprinos e ovinos

Devido à contaminação de fontes de água, solo e pastagens com oocistos, grande parte dos animais de produção é soropositiva para *T. gondii* (tabela 2). Na pecuária, a importância econômica da infecção deve aos fatores reprodutivos e produtivos, onde a transmissão congênita pode causar perdas significativas devido a abortos, ocorrência de natimortalidade, malformações fetais e nascimento de cordeiros fracos (Dubey, 1994). Os abortos são mais frequentes em cabras e ovelhas comparados a outros animais de produção ou domésticos (Lindsay *et al*, 1995).

Tabela 2: Prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em caprinos e ovinos no Brasil. Adaptado de Fialho *et al*, 2009.

Caprinos			Ovinos		
UF - Teste	Prevalência(%)	Referências	UF- Teste	Prevalência(%)	Referências
BA - HAI	10	Amaral,Santos & Rebouças (1978)	RS – HAI	23	Amaral,Santos & Rebouças (1978)
RS - HAI	16,1	Araújo <i>et al.</i> (1984)	RS – SF	39	Larsson <i>et al.</i> (1980)
MG – IFI	87	Chiari, Lima & Antunes (1985)	RS – IFI	9,8	Silva, Costa & Souza (1980)
MG - IFI	11,4-36,1	Machado e Lima (1987)	RS –IFI	12,8	Silva <i>et al.</i> (1981)
MG – IFI	92,4	Chiari <i>et al.</i> (1987)	RS – HAI	18,2-18,6	Zonta <i>et al.</i> (1987)
RS – HAI	23	Braccini <i>et al.</i> (1992)	RS – AL	10	Martins & Hancock (1991)
RJ –IFI	15, 84	Serra-Freire, Noberg & Gazeta (1994)	RS – HAI	35,2	Braccini <i>et al.</i> (1992)
PR – IFI	30,71	Sella <i>et al.</i> (1994)	SP – HAI/IFI	17,5-22,5	Oliveira Sequeira <i>et al.</i> (1993)
MG – HAI/IFI	10-11,9	Figueiredo, Cabral & Silva (1997)	RS – IFI	47,83	Freire <i>et al.</i> (1995)
PB – IFI	26,8	Alves <i>et al.</i> (1997)	RS – HAI/IFI	22-24	Ulon (1996)
BA - AL	28,93	Gondim <i>et al.</i> (1999)	SP – HAI/IFI	30,4-55,11	Rosa <i>et al.</i> (1997)
SP – IFI	14, 47	Mainard <i>et al.</i> (2000)	RS – AL	44	Martins <i>et al.</i> (1998)
SP – ELISA	17	Meireles (2001)	BA – AL	18,75	Gondim <i>et al.</i> (1999)
SP –IFI/MAD	8-11	Silva, Cutolo & Langoni (2002)	PR – IFI	51,8	Garcia <i>et al.</i> (1999)
PE –IFI	10,33	Silva, Cunha & Meireles (2003)	SP – ELISA	31	Meireles (2001)
RS – HAI/IFI	19,4-30	Maciel & Araújo	SP – IFI	7,7	Silva & Langoni

SP - IFI	28,7	(2004) Figliuolo (2004)	SP – IFI/MAD	23-27	(2001) Silva, Cutolo & Langoni (2002)
BA - IFI	11,53	Uzêda <i>et al.</i> (2004)	PE – IFI	35,3	Silva, Cunha & Meireles (2003)
MG – HAI/ELISA	42,8-45,8	Carneiro (2006)	PR – IFI	54,3	Ogawa <i>et al.</i> (2003)
PB - IFI	24,5	Faria <i>et al.</i> (2007)	RS – HAI/IFI	13,6-15,2	Escopelli (2004)
RN –IFI	17,1	Lima <i>et al.</i> (2008)	SP – IFI	34,7	Figliuolo <i>et al.</i> (2004)
CE - ELISA	25,1	Cavalcante <i>et al.</i> (2008)	DF – IFI	38,22	Ueno (2005)
			MG – IFI/ELISA	31,2-43,2	Carneiro (2006)
			RS – HÁI/IFI	19,5-44,8	Silva & Rue (2006)
			PR – IFI	7	Moura <i>et al.</i> (2007)
			PR - IFI	51,5	Romanelli <i>et al.</i> (2007)

IFI – Imunofluorescência indireta; HAI- Hemaglutinação indireta; ELISA- Ensaio imunoenzimático; SF- Sabin-Feldman; AL- Aglutinação em látex; MAD- Método de aglutinação direta.

A ingestão da carne crua ou mal passada aumenta a transmissão deste protozoário, e pequenos ruminantes contaminados, como caprinos e ovinos, assumem grande importância na cadeia epidemiológica dessa doença (Barione *et al*, 2009), a presença de cistos teciduais é comum na carne destes animais. Casos de toxoplasmose também podem ser atribuídos ao consumo de leite de cabra não pasteurizado (Sacks *et al*, 1982).

Os sistemas de produção animal tem grande impacto na disseminação de *T.gondii*, é possível reduzir significativamente o risco de infecções por *Toxoplasma* na pecuária através de medidas adequadas de confinamento, higiene e prevenção, dentre as quais, manter áreas de produção livres de ratos, aves, insetos e animais domésticos (Bayarri *et al*, 2012). Outra forma de prevenção é o manejo adequado da carne durante o processamento industrial e também durante o preparo doméstico, estudos indicam que os cistos teciduais são sensíveis ao tratamento por calor, congelamento, irradiação, pressão, etc. (Kotula *et al*, 1991, Dubey & Thayer, 1994). O desenvolvimento de uma vacina para uso veterinário também apresenta a vantagem de diminuir a perda de produtividade e os riscos de transmissão através do consumo de carne contaminada com cistos.

1.1.4 Resposta imune contra *T. gondii* e vacinas

A proteção contra a infecção por *T. gondii* é atribuída principalmente à imunidade mediada por células. Os mecanismos de resistência do hospedeiro parecem estar relacionados principalmente a síntese de IFN- γ por células *natural killers* NK e por linfócitos T. Logo após a infecção, na fase aguda, ocorre a ativação de mecanismos inatos de defesa, mediado por macrófagos e células NK, estes mecanismos limitam a replicação de taquizoítos antes da ativação de uma resposta imune mediada por células T e direcionam o desenvolvimento de uma resposta com perfil TH1 (Denkers & Gazzinelli, 1998).

A ativação de células apresentadoras de antígeno pelo parasita induz a síntese de IL12 e outras citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-15, estas citocinas induzem células NK a secretar IFN- γ , que promove a ativação e aquisição de atividade microbicida por macrófagos. A ação conjunta de IL-12 e IFN- γ induz a diferenciação de precursores de linfócitos T auxiliares em linfócitos TH1 (Gazzinelli *et al*, 1996). Estas células T CD4+ sintetizam grandes quantidades de IFN- γ e IL-2. Estas duas citocinas por sua vez, induzem a proliferação de linfócitos T CD8+ e a secreção de IFN- γ por estes linfócitos (Poisson, 2012). Através de sua atividade citotóxica mediada por perforina (Suzuki *et al*, 2010), os linfócitos T CD8+ podem ser considerados importantes efetores na imunidade contra *T. gondii* na fase aguda e também prevenindo a reativação da infecção crônica. Linfócitos T CD8+ são capazes de induzir apoptose em células infectadas por *T. gondii*, eliminando parasitas intracelulares, ou podem, através da lise celular, torná-los acessíveis ao ataque por anticorpos e pelo sistema complemento (Daubener *et al*, 1995).

A produção de citocinas pró-inflamatórias do tipo 1 é necessária para a proteção e o controle da toxoplasmose, porém a produção excessiva dessas moléculas pode gerar uma resposta inflamatória intensa e danos ao tecido hospedeiro. Portanto, durante a resposta ocorre um balanço entre citocinas protetoras e citocinas regulatórias, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (Denkers & Gazzinelli, 1998), que evitam danos ao hospedeiro, mas que podem beneficiar a persistência do parasita.

Em termos de resposta humoral, o papel protetor de linfócitos B não está totalmente elucidado. Embora a resistência à infecção possa ser adquirida pela transferência passiva de linfócitos T CD8⁺ (Parker *et al*, 1991; Casciotti *et al*, 2002), a transferência de anticorpos demonstra pouco efeito protetor (Pavia, 1986). A infecção por *T. gondii* estimula a produção de imunoglobulinas específicas que podem ajudar no controle da disseminação do parasita, através de mecanismos de opsonização e aumento da atividade fagocitária de macrófagos (Anderson *et al*, 1976; Wilson *et al*, 1980), e também pela ativação do sistema complemento e lise de taquizoítas extracelulares. In vitro, na presença de anticorpos específicos, taquizoítos são rapidamente lisados pela via clássica do complemento (Schreiber & Feldman, 1980; Suzuki & Kobayashi, 1985). Estudos realizados com camundongos deficientes em linfócitos B sugerem que anticorpos podem não ser decisivos no processo de resistência durante a infecção aguda, mas podem ser importantes no controle de infecções crônicas (Frenkel & Taylor, 1982). Em um estudo semelhante, Kang *et al*, 2000, observaram o aumento na mortalidade diante da infecção de camundongos deficientes em linfócitos B, associada a proliferação contínua de taquizoítos no cérebro e pulmões na ausência de resposta por anticorpos, mesmo sem o decréscimo nos níveis de IFN- γ , TNF- α e NO sintetase induzível (iNOS), eles também observaram um aumento na taxa de sobrevivência após a transferência passiva de IgG anti-*T. gondii* nestes animais. IgGs também desempenham um importante papel na proteção do feto em casos de infecções congênitas, sendo capazes de ultrapassar a barreira placentária (Filisetti & Candolfi, 2004).

A infecção primária por *T. gondii* resulta na ativação de uma resposta imune humoral e de uma rápida resposta mediada por células, que pode conferir uma proteção a longo prazo (Poisson, 2012). No entanto, o perfil de resposta regulatória, necessária para a sobrevivência do hospedeiro, também garante a persistência do parasita e uma vez que ocorra a infecção, não existe tratamento disponível capaz de eliminar o parasita ou vacinas para uso humano que sejam capazes de controlar a doença (Poisson, 2012). A imunidade protetora em indivíduos naturalmente infectados contra uma re-infecção sugere que é possível o desenvolvimento de vacinas eficientes e muitos estudos vêm sendo realizados nesta área.

Diversas estratégias no desenvolvimento de vacinas já foram testadas para tentar reproduzir a proteção natural gerada pelo sistema imune hospedeiro contra uma infecção (e reinfeção) por *T. gondii*, e incluem vacinas baseadas em parasitas inteiros (atenuados de diversas formas), nos antígenos solúveis produzidos, em proteínas recombinantes purificadas (vacinas de subunidades) ou no uso de vetores vivos recombinantes que expressam antígenos heterólogos no organismo do hospedeiro (Bruna-Romero *et al*, 2012) (figura 2). As primeiras vacinas desenvolvidas foram baseadas na utilização de parasitas (taquizoítos ou bradizoítos) atenuados, que têm a vantagem de estimular uma resposta imune semelhante a uma infecção natural, porém o uso de vacinas baseadas em parasitas vivos atenuados de *T. gondii* apresentam o risco de reversão a um estado virulento (Kur *et al*, 2009) e seu uso é inadequado para humanos e até para animais, pois mesmo diminuindo perdas na produtividade, se o parasita conseguir estabelecer uma infecção crônica, ainda apresentará o risco de transmissão de cistos por carnes contaminadas. Em animais, existe uma única vacina liberada comercialmente para ovinos (TOXOVAX[®]), composta por taquizoítos da cepa S-48, que é capaz de proteger as fêmeas contra a transmissão congênita de toxoplasma e consequente abortamento (Buxton and Innes, 1995).

O desenvolvimento de vacinas tem se concentrado na identificação de componentes do parasita com propriedades imunogênicas que podem ser utilizados em vacinas de subunidades, vacinas de DNA ou em vetores vivos, e a caracterização de moléculas que estão envolvidas na patogenia do parasita e proteção do hospedeiro é o primeiro passo para a produção destas vacinas. Diversas proteínas secretórias como micronemas (MIC), róptrias (ROP), grânulos densos (GRA) (Desolme *et al*, 2000, Lourenco *et al*, 2006, Martin *et al*, 2004) e antígenos associados aos bradizoítos, tais como o antígeno BAG e o antígeno MAG1 (Kur *et al*, 2009), já foram identificados e estão sendo testados. No entanto, os maiores alvos para imunoglobulinas do tipo IgM e IgG são os antígenos de superfície de *T. gondii* (Filisetti & Candolfi, 2004).

As cinco maiores proteínas de membrana de taquizoítos são denominadas p22, p23, p30, p35 e p43 (Cesbron-Delauw *et al*, 1994), dentre as quais, p30

(SAG1), p22 (SAG2) e p43 (SAG3) são abundantes na superfície de taquizoítos. Estes antígenos desempenham um importante papel no processo de adesão e invasão celular e são denominados SAGs (“Surface Antigens”) e sequências relacionadas à SAG (SRSs - “SAG-Related Sequences”) (figura 1), eles se encontram ligados à membrana por um motivo de adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Nagel & Boothroyd, 1989). Estas sequências são altamente conservadas e compartilham um alto nível de homologia entre as linhagens de *T. gondii* do tipo 1 (patogênicas e letais em camundongos) e dos tipos II e III (cistogênicas) (Bruna-Romero *et al*, 2012). A maioria são membros relacionados às famílias do antígeno de superfície 1 (SAG1) ou a SAG2 (Lekutis *et al*, 2000). A família de SAG1 é definida por genes que codificam proteínas ancoradas por GPI e possuem resíduos de cisteína conservados, consistindo de SAG1, SAG3, SRS1-SRS4 e BSR4 (Lekutis *et al*, 2001). SAG1 e SAG3 apresentam 24% de homologia em sua sequência de nucleotídeos (Cesbron-Delauw *et al*, 1994), no entanto, os membros da família de SAG2 (SAG2A, SAG2B, SAG2C, SAG2D) tendem a ser menos similares. Estes antígenos de superfície já foram expressos como proteínas recombinantes em bactérias, leveduras ou vírus (Harning *et al*, 1996, Biemans *et al*, 1998, Xiong *et al*, 1993), e seu papel imunogênico já foi testado em diversos estudos utilizando vacinas de subunidades, vacinas de DNA e vetores vivos (tabela 3).

Apesar dos altos índices de infecção em populações e das grandes perdas econômicas causadas na pecuária, ainda não existe um tratamento capaz de erradicar o parasita do hospedeiro e esforços no desenvolvimento de vacinas ainda não chegaram a resultados satisfatórios. Diante da série de antígenos de *T. gondii* já identificados, o maior desafio no desenvolvimento de uma vacina contra Toxoplasmose será testar novas formulações, com a utilização de adjuvantes de nova geração e vetores vacinais que possam estimular uma resposta imune protetora, usados em diferentes combinações (antígenos + adjuvantes + vetores) e protocolos (dose única, múltiplas doses, homólogos ou heterólogos) (Bruna Romero *et al*, 2012).

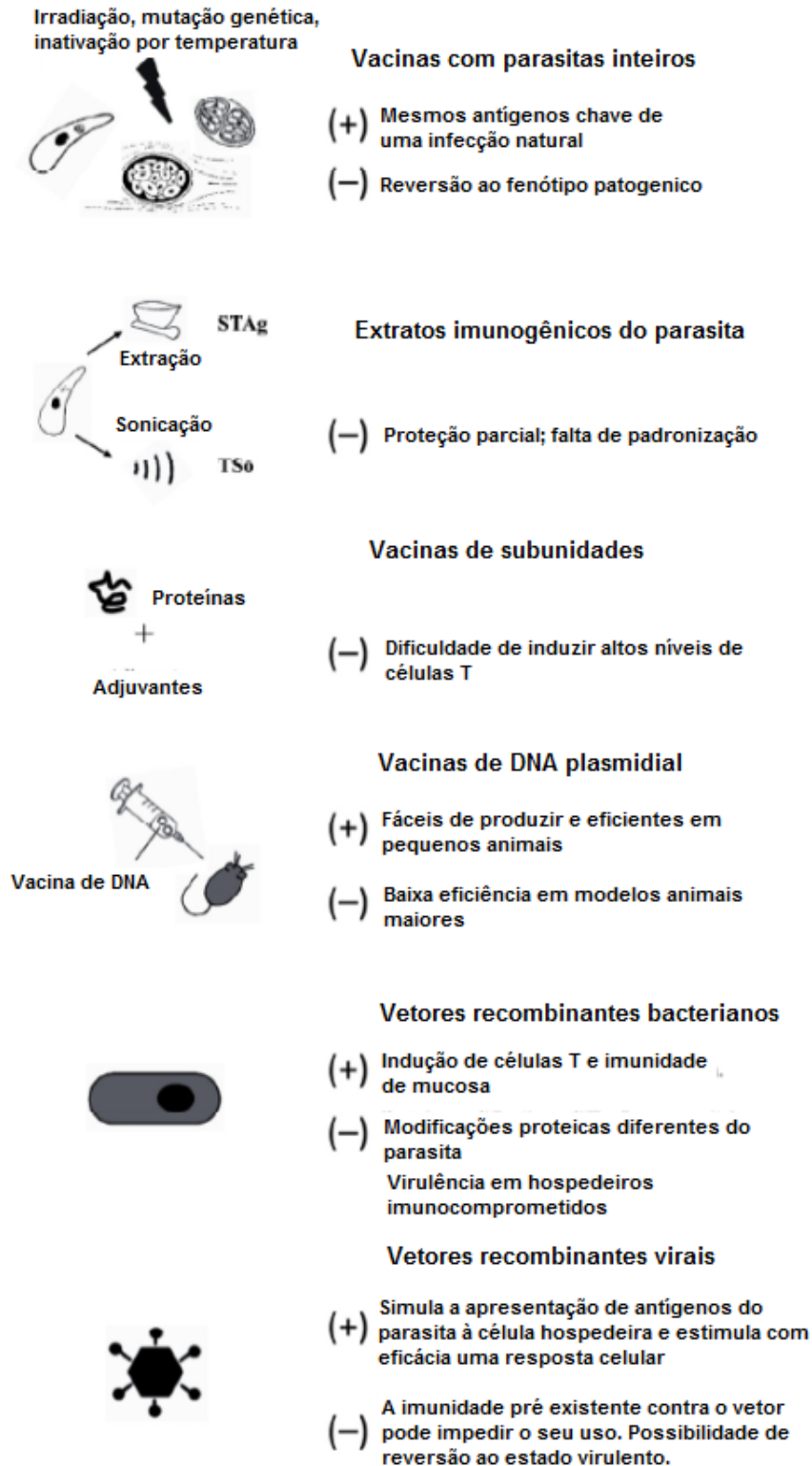


Figura 2: Vantagens (+) e desvantagens (-) das estratégias usadas no desenvolvimento de vacinas contra *T. gondii*. STAg – antígeno solúvel de taquizoítos; TSo – taquizoítos sonicados. Adaptado de Bruna-Romero *et al*, 2012.

Tabela 3: Antígenos de superfície candidatos a vacinas (SAG1, SAG2 e SAG3) testados contra *T. gondii*.

Imunógeno	Descrição	Referência
SAG1 purificada e incorporada a lipossomas	A imunização de camundongos Suíços induziu uma resposta humoral e foi capaz de reduzir significativamente na taxa de mortalidade mediante infecção com a cepa selvagem C.	Bulow & Boothroyd, 1991
SAG1 e SAG2 purificadas (ISCOMS) +	A imunização de ovelhas com as proteínas purificadas associadas a complexos imunoestimuladores (ISCOMS) foi capaz de ativar uma resposta humoral e celular e produzir proteção parcial (redução da resposta febril) contra desafio com oocistos da cepa M3.	Lunden, 1995
SAG1 recombinante + Alúmem	A imunização com a proteína recombinante expressa em <i>E. coli</i> induziu uma resposta do tipo Th2 e promoveu o aumento na taxa de sobrevivência dos camundongos após desafio com a cepa RH.	Petersen <i>et al</i> , 1998
SAG1 + IL12 recombinantes	Indução de resposta tipo Th1, o que proporcionou proteção contra a formação de cistos cerebrais após o desafio com 20 cistos da cepa PRU.	Letscher-Bru <i>et al</i> , 1998
Plasmídeo codificando o gene SAG1 (p1tPASAG1)	Proteção completa após o desafio com 10 ⁵ taquizoítos da cepa RH em camundongos C3H, 80% de proteção BALB/c e proteção parcial após a transferência passiva de células T CD8(+) dos animais imunizados com p1tPASAG1 para animais não imunizados.	Nielsen <i>et al</i> , 1999
SAG1 recombinante + toxina da cólera (CT)	A imunização intranasal de camundongos CBA/J promoveu uma redução de 85% na carga de cistos cerebrais nos animais vacinados após o desafio com 100 cistos da cepa 76K.	Debard <i>et al</i> , 1996
SAG1 recombinante + (LT), LTR72 e LTK63	A imunização intranasal de camundongos CBA/J com SAG1 e dois mutantes não tóxicos (LTR72 e LTK63) de enterotoxina lábil (LT) promoveu uma redução significativa na carga de cistos cerebrais nos animais vacinados após o desafio com 70 cistos da cepa 76K.	Bonenfant <i>et al</i> , 2001
SAG1, SAG2, SAG3, P54, SRS1, recombinantes + Adjuvante Completo de Freund (CFA)	A imunização com SAG2r, SRS1r ou com a mistura dos cinco antígenos proporcionou uma baixa taxa de sobrevivência (17 - 25%) em camundongos BALB/c após o desafio com 300 bradizoítos da cepa Berveley e a inibição total na formação de cistos nos animais sobreviventes vacinados com SAG2r e SRS1r.	Mishima <i>et al</i> , 2001
Plasmídeo codificando o gene SAG1	A vacina promoveu o aumento nos níveis de IgG2a e de IFN-γ induzindo um resposta TH1 e a prevenção da formação de cistos cerebrais em BALB/c desafiados com a cepa Beverley.	Couper <i>et al</i> , 2003
SAG1, SAG2, e SAG3 clonadas em Adenovírus recombinantes	Três adenovírus recombinantes expressando SAG1 (rAd/SAG1), SAG2 (rAd/SAG2) e SAG3 (rAd/SAG3), utilizados como vetores vivos na imunização de camundongos BALB/c, foram capazes de estimular uma potente resposta humoral com perfil TH1, sendo que o grupo imunizado com rAd/SAG2 apresentou os maiores níveis de anticorpos e a ativação de células T CD8+ específicas produtoras de IFN-γ. Foi observada uma redução significativa no número de cistos cerebrais após o desafio com 20 cistos da cepa P-BR, com altos níveis de inibição (80%) em animais imunizados com uma mistura dos três vetores (rAdMIX). No entanto, os animais não apresentaram proteção ao desafio com 100	Caetano <i>et al</i> , 2006

taquizoítos da cepa RH.		
SAG3 recombinante + QuilA	Promoveu proteção parcial com a indução de uma resposta TH1, aumento da sobrevivência de camundongos BALB/c após uma dose letal da cepa ME49 e redução parcial da carga de cistos após desafio com doses sub-letais da mesma cepa.	Lee <i>et al</i> , 2007
Plasmídeo codificando o gene SAG1 + ROP2 (pcDNA3.1-SAG1-ROP2) + IL12	Foi capaz de prolongar a sobrevivência de camundongos BALB/c após desafio com a cepa RH e a co-administração de IL-12r murina como adjuvante aumentou os níveis de resposta imune celular e humoral.	Zhang <i>et al</i> , 2007
SAG2 recombinante	SAG2 expressa em <i>Pichia pastoris</i> promoveu a proteção contra o desafio com uma dose letal de taquizoítos da cepa RH, porém esse efeito perdeu por pouco tempo e os grupos vacinados sucumbiram cerca de sete dias após os grupos controles.	Lau & Fong, 2008
SAG1 clonada no vetor viral (PRV)	Um pseudovírus da raiva (PRV) expressando TgSAG1 (rPRV/SAG1) foi capaz de estimular a produção de altos níveis de anticorpos anti-TLA (antígeno lisado de <i>T. gondii</i>), a proliferação de esplenócitos e a produção de IFN- γ e IL-2. A imunização de camundongos BALB/c induziu uma proteção parcial (60%) após o desafio com uma dose letal de taquizoítos da cepa RH e também a produção de anticorpos neutralizantes contra PRV.	Liu <i>et al</i> , 2008
SAG1 e MIC3 clonadas no vetor bacteriano <i>S. typhimurium</i>	A imunização oral de camundongos com diferentes doses de uma linhagem atenuada de <i>Salmonella typhimurium</i> expressando SAG1 e/ou MIC3 foi capaz de induzir uma resposta humoral e celular, embora tenha promovido somente uma proteção parcial, com um aumento de 20% na taxa de sobrevivência, após o desafio com 500 taquizoítos da cepa RH.	Qu <i>et al</i> , 2008
Plasmídeo codificando SAG1 e MIC4 (pcDNA3.1-SAG1-MIC4) + toxina da cólera A2/B (pCTA2/B)	A vacina foi capaz de estimular uma resposta humoral e celular em camundongos BALB/c e promover proteção após o desafio com taquizoítos da cepa RH nos animais imunizados com as formulações contendo o adjuvante.	Wang <i>et al</i> , 2009
pVAX/TgSAG1(prime) + rPRV/TgSAG1 (boost)	A imunização de camundongos de acordo com um protocolo do tipo "prime-boost" com o plasmídeo pVAX/TgSAG1 e o pseudovírus rPRV/TgSAG1 expressando SAG1 foi capaz de promover proteção após o desafio com uma dose letal de taquizoítos da cepa RH.	Shang <i>et al</i> , 2009
SAG1 clonada no vetor viral (BV-G-SAG1)	O pseudo-baculovírus (Bac-VSV-G) codificando o gene SAG1 foi usado na imunização de camundongos BALB/c em diferentes doses e foi capaz de induzir altos níveis de anticorpos específicos e de IFN- γ . O desafio com taquizoítos da cepa RH resultou em aumento de cerca de duas semanas na sobrevivência dos animais em relação ao grupo controle.	Fang <i>et al</i> , 2010
rFLU/SAG2 (prime) + rAd/SAG2 (boost)	Os vetores virais recombinante de Influenza A (rFLU/SAG2) juntamente com adenovírus (rAd/SAG2) expressando SAG2 foram usados na imunização de camundongos BALB/c de acordo com protocolos do tipo "prime-boost" heterólogos, sendo capazes de estimular uma resposta humoral e celular específicas para SAG2 e de proteger após o desafio com a cepa P-Br, com uma redução de 85% na carga parasitária.	Machado <i>et al</i> , 2010
Plasmídeo codificando SAG1	Todos os animais imunizados com pcDNA/TgSAG1 sozinho ou associado a pVAX/mIL-18 desenvolveram anticorpos anti-	Liu <i>et al</i> , 2010

(pcDNA/TgSAG1) + TLA (antígeno lisado de *T. gondii*) e a proliferação de linfócitos IL18 (pVAX/mL-18) específicos, a co-injeção com pVAX/mL-18 aumentou significativamente a produção de IFN- γ e IL-2 e a sobrevivência(60%) dos animais após o desafio com taquizoítos da cepa RH comparado a pcDNA/TgSAG1 (40%).

rAd/SAG1, rAd/SAG2, rAd/SAG3, rMVASAG1 e rMVASAG2

A imunização de camundongos C57BL/6 com os adenovírus recombinantes (rAd/SAG1, rAd/SAG2 e rAd/SAG3) foi capaz de induzir a produção de IgGs específicas contra cada SAG, no entanto, após o desafio com 10 cistos da cepa Me49 somente os animais imunizados com rAd/SAG1 apresentaram níveis significativos de sobrevivência e redução no número de cistos cerebrais. Foi observado também que a imunização heteróloga com rAd/SAG1 + rMVASAG1 (vírus vaccinia Ankara modificados recombinantes codificando o antígeno SAG1) promoveu o aumento na sobrevivência e redução no número de cistos cerebrais em comparação ao protocolo homólogo (rAd/SAG1).

Mendes *et al*, 2011; Mendes, 2011

1.2 *Corynebacterium pseudotuberculosis*

1.2.1 Aspectos Gerais

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria intracelular facultativa e agente causador da Linfadenite Caseosa (LC), uma doença que também tem grande relevância veterinária, pois é responsável por grandes perdas econômicas em rebanhos de caprinos e ovinos. Esta bactéria se caracteriza como um bacilo Gram-positivo, curto e irregular, medindo 0,5 a 0,6 μm por 1 a 3 μm , podendo apresentar aspecto cocóide, mostrando-se isolado ou formando grupamentos irregulares ou em paliçada, são imóveis, anaeróbios facultativos, fermentativos e não formam esporos (Alves *et al*, 2007).

Os prejuízos causados pela LC na produção de caprinos e ovinos estão relacionados a alguns aspectos da patogenia desta enfermidade. Após atingir os linfonodos locais, a infecção evolui com fagocitose, multiplicação intracelular da *C. pseudotuberculosis*, desintegração e morte celular. Esse processo é cíclico e recorrente, causando as lesões crônicas típicas (abscessos) da LC. A presença de abscessos em linfonodos superficiais e em tecidos subcutâneos caracteriza a LC externa e pode interferir na execução das funções normais do animal como pastejar, mastigar, regurgitar e amamentar as crias. Já a forma visceral da doença atinge órgãos como pulmões, rins, fígado e baço, e pode

acarretar consequências mais sérias ao organismo como debilitação do animal e disseminação dos abscessos, causando problemas reprodutivos, condenação de peles e carcaças, e até mesmo a morte dos animais (Alves *et al*, 2007).

A transmissão da LC em ovinos e caprinos ocorre, principalmente, através de ferimentos na pele ou através da aspiração de aerossóis (Paton, 1993). A disseminação desta bactéria no meio ambiente ocorre através da ruptura de abscessos e da habilidade de sobrevivência desse microrganismo por longos períodos no solo e em materiais diversos, tornando-se uma fonte constante de infecção para animais saudáveis. A imunoprofilaxia é a melhor estratégia para a prevenção da LC, já que o tratamento com o uso de antibióticos não representa um método viável, uma vez que as drogas não penetram na cápsula dos abscessos (Williamson, 2001).

Estudos comparativos com outras espécies do gênero identificaram que *C. pseudotuberculosis* possui um dos menores genomas devido à perda de numerosos genes, outra diferença associada à adaptação patogênica inclui um conteúdo GC menor (52%), a redução do repertório genético e a presença de sete prováveis ilhas de patogenicidade, que incluem fatores de virulência clássicos, como subunidades fimbriais, fatores de adesão e de aquisição de ferro e toxinas secretadas, todos estes fatores de virulência apresentaram característica que indicam a transferência horizontal destes genes (Ruiz *et al*, 2011).

Os maiores fatores de virulência diretamente relacionados com a patogenia de LC são a fosfolipase D (PLD) e os lipídeos tóxicos da parede celular. A fosfolipase D é uma exotoxina com ação dermonecrótica em células endoteliais, uma vez que as membranas das células de mamíferos possuem altos teores de fosfolipídeos, que causa o aumento da permeabilidade vascular e promove a disseminação da bactéria do sítio de infecção a outras partes do organismo animal, como os vasos linfáticos e vários órgãos viscerais. Estudos conduzidos com linhagens mutantes, com o gene da fosfolipase D deletados, demonstram que a exotoxina está envolvida na persistência e disseminação da

bactéria no organismo do hospedeiro (McNamara *et al*,1994). O uso de uma antitoxina ou a vacinação de cabras com a exotoxina inativada é capaz de prevenir a disseminação de *C. pseudotuberculosis* após o desafio experimental (Williamson, 2001, Brown *et al*,1986).

Além disso, essa exotoxina contribui para as lesões e a destruição de macrófagos durante a infecção com *C. pseudotuberculosis* (Tashjian e Campbell, 1983). Em Moore *et al* (2007), a expressão intracelular de PLD pela bactéria teve uma pequena, mas significativa contribuição para a perda de viabilidade de macrófagos e alguns mecanismos propostos foram: a redução da integridade da membrana plasmática dos macrófagos devido a sua ação de esfingomielinase, a PLD, presente no meio extracelular, seria capaz de atacar as ligações éster na esfingomielina, presente na membrana externa dos macrófagos viáveis; alternativamente, a esfingomielina também esta presente na membrana do fagossomo, da linhagem murina J774 de macrófagos utilizados, e a PLD poderia então reduzir a integridade destes compartimentos intracelulares permitindo o escape da bactéria do fagossomo; este mecanismo intracelular também poderia promover a alteração de vias sinalizadoras envolvidas na modulação da membrana dependentes de fosfolipases celulares, em benefício do patógeno.

Os lipídeos tóxicos da parede celular são importantes fatores na patogênese da doença (Hardy, 1972), semelhantes ao ácido micólico de *Mycobacterium tuberculosis*, eles promovem uma proteção contra a ação degradativa das enzimas presentes nos fagolisossomos, além de permitir a aderência dos microrganismos e promover uma citotoxicidade local (Alves *et al*, 1997), facilitando assim a replicação da bactéria dentro de macrófagos. Segundo Muckle e Gyles (1982), há uma relação direta entre a porcentagem de lipídeos de superfície e a indução de abscessos crônicos, sendo que as linhagens virulentas de *C. pseudotuberculosis* possuem uma quantidade maior destes lipídeos (Jolly, 1966).

1.2.2 Resposta imune induzida por *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Por ser um patógeno intracelular facultativo, a imunidade contra *C. pseudotuberculosis* é mediada por uma complexa resposta imune celular e humoral (Prescott *et al*, 2002). A infecção por *C. pseudotuberculosis* é determinada por uma fase inicial, onde ocorre o recrutamento de neutrófilos ao sítio de infecção, e pela disseminação deste antígeno para os linfonodos superficiais, seguida da internalização da bactéria por células fagocíticas e de ciclos de replicação, fagocitose e reinfecção de novos fagócitos (Moore *et al*, 2007). Dentro dos fagolisossomos, a persistência da bactéria pode ser atribuída aos lipídeos tóxicos da parede celular e outros componentes antigênicos que atenuam a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos (Bastos *et al*, 2012, Bogdan *et al*, 1997). Como resultado da multiplicação descontrolada das bactérias dentro de macrófagos, a resposta imune do hospedeiro limita a disseminação do patógeno através da formação de granulomas, que são caracterizados pelo encapsulamento das células infectadas pela bactéria (Bastos *et al*, 2012).

Estudos imunohistoquímicos demonstram que os granulomas são limitados por uma capsula fibrosa exterior e que possuem um centro necrótico interno cercado por uma zona de macrófagos, que expressam MHCII em sua superfície, e por uma zona formada por linfócitos T CD4 e TCD8 e por linfócitos B e T gama-delta, adjacentes à cápsula fibrosa (Pépin, *et al*, 1994, Walker *et al*, 1991). Um estudo, utilizando RT-PCR semi-quantitativa, demonstrou o perfil de citocinas produzidas durante a infecção pela bactéria, citocinas inflamatórias (IL-1 β , TNF- α) e citocinas expressas por linfócitos T (IL-2, IL-4) foram observadas em grande quantidade no sítio de infecção e nos linfonodos drenantes, respectivamente, e altos níveis de IFN- γ , TNF- α e IL-2 foram detectados no início da infecção, este estudo demonstrou que a formação dos granulomas esta relacionada a um perfil de resposta TH1 e TH2 e a elevada produção de citocinas como IFN- γ , IL-2, IL-4, TNF- α e MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócito do tipo 1) (Pépin *et al*, 1997).

A presença de populações de linfócitos nos granulomas indica que estes desempenham um importante papel na resposta contra *C. pseudotuberculosis*. A arquitetura dos granulomas permite a proximidade dos macrófagos ao centro necrótico, facilitando a fagocitose e a apresentação dos antígenos processados aos linfócitos T CD4, que por sua vez, secretam IFN- γ para a estimulação de macrófagos e ativação de linfócitos T CD8+, e os linfócitos B atuam na neutralização das toxinas secretadas pela bactéria (Walker *et al*, 1991), prevenindo o desenvolvimento de lesões e protegendo o hospedeiro em uma exposição secundária ao patógeno (Zaki, 1976). Diversos experimentos demonstram que anticorpos anti-PLD podem exercer um efeito protetor, diminuindo a permeabilidade induzida pela PLD e evitando a disseminação da bactéria para os linfonodos drenantes (Bastos *et al*, 2012).

O papel das citocinas TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento de uma resposta protetora também foram analisados em estudos utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) anti-TNF- α e anti-IFN- γ , que aumentaram a proliferação da bactéria no organismo, levando a morte dos camundongos infectados. A administração de mAbs anti-CD4 e anti-CD8 também resultou em um aumento significativo na mortalidade dos animais infectados e na supressão da produção de IFN- γ , mas não diminuiu a produção de TNF- α , a liberação desta citocina nos estágios iniciais da infecção parece ser crucial para o desenvolvimento de resistência, já que a administração de anti-TNF- α nos dias 0 e 4 após a infecção foi altamente efetiva. Este estudo sugere que a produção endógena de IFN- γ e TNF- α são essenciais para a defesa do hospedeiro diante de uma infecção primária por *C. pseudotuberculosis* (Lan *et al*, 1998). A produção e o papel destas citocinas durante uma infecção secundária também foi estudado em camundongos imunizados com bactérias inativadas por formalina e desafiados 28 dias após a infecção primária, estes animais apresentaram uma recuperação 50% mais rápida, com a detecção de produção de IFN- γ e TNF- α dentro de 3 e 24 horas após do desafio, neste mesmo estudo, a administração de mAbs anti-CD4 sozinho ou associado a anti-CD8 aumentaram a proliferação bacteriana após a infecção secundária, com aumento na taxa de mortalidade devido a supressão na produção destas citocinas, enquanto que a administração de mAbs anti-CD8 sozinho não

demonstrou efeito nos mecanismo de resistência ou na produção de citocinas, sugerindo a importância dos linfócitos T CD4, com perfil TH1, na ativação de macrófagos e no estabelecimento de imunidade protetora em uma infecção secundária (Lan *et al*, 1999).

A importância de mecanismos humorais tem sido demonstrada em numerosos ensaios de vacinas comerciais e experimentais, as estratégias usadas no desenvolvimento de vacinas contra *C. pseudotuberculosis* incluem o uso de formulações baseadas em toxinas ou sobrenantes de cultura inativados, em frações da parede celular bacteriana, em bactérias atenuadas ou inativadas, em exotoxinas e suas subunidades ou em patógenos geneticamente modificados (Bastos *et al*, 2012).

1.2.3 Corynebacterium recombinantes como vetores vacinais

Bactérias recombinantes podem ser utilizadas como vetores vivos para a apresentação antígenos ao sistema imunológico e são de grande interesse pela possibilidade de atuar como uma vacina múltipla, as toxinas secretadas por estes vetores bacterianos podem atuar como potentes adjuvantes, com capacidade de induzir a produção de citocinas inflamatórias. A linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* Toxminus, com o gene PLD inativado, apresentou uma boa resposta imune protetora (humoral e celular) contra Linfadenite Caseosa quando administrada por via oral ou subcutânea (Hodgson *et al*, 1994), e foi capaz de expressar uma variedade de antígenos candidatos a vacinas (Moore *et al*, 2000). Outra linhagem de *C. pseudotuberculosis*, denominada T1, foi isolada no estado da Bahia e possui características atenuadas, T1 foi usada na imunização de caprinos da raça Canindé, sendo capaz de induzir a proteção parcial em 55,5% dos animais desafiados com 1×10^5 UFC da linhagem virulenta VD57 (Moura-Costa, 2007), esta linhagem apresenta potencial imunogênico para o desenvolvimento de uma vacina viva atenuada contra Linfadenite Caseosa e poderia ser usada para a expressão de proteínas heterólogas.

Os métodos básicos para a expressão heteróloga de genes em *C. pseudotuberculosis* estão bem estabelecidos, como plasmídeos de clonagem e expressão disponíveis, protocolos de eletroporação eficientes e genoma sequenciado. Algumas bactérias do gênero, como *C. glutamicum* e *C. ammoniagenes* recombinantes, já são amplamente usadas na produção industrial de aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas (Tauch *et al*, 2002). O vetor de expressão pECTAC-K99, derivado do plasmídeo pGA1 de *Corynebacterium glutamicum*, já foi utilizado eficazmente na expressão de *gfp* em *Corynebacterium diphtheriae*. Esse plasmídeo possui o promotor P_{tac} anterior ao sítio múltiplo de clonagem (MCS) e também sinais de terminação de transcrição *rrnB* de *E. coli*. Genes contendo um sítio de ligação de ribossomo (RBS) podem ser inseridos em qualquer local do MCS (Tauch *et al*, 2002) (figura 3).

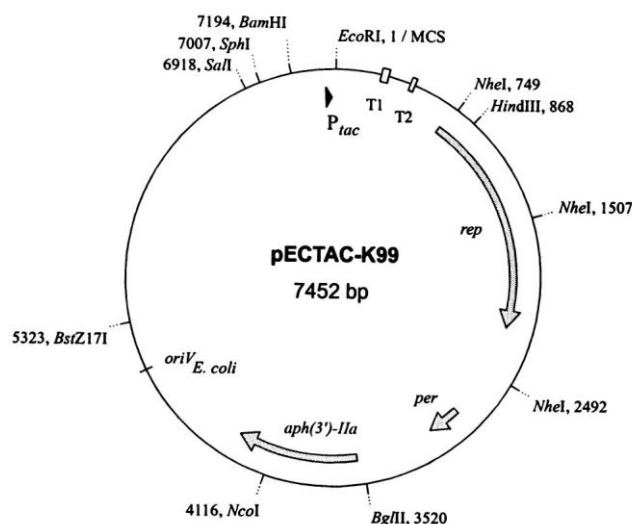


Figura 3: Plasmídeo pECTAC-K99 (Tauch *et al*, 2002).

O trabalho propõe a clonagem das sequências dos antígenos de superfície de *T. gondii* (SAG1, SAG2, SAG3) no plasmídeo pECTAC-K99 e a inserção deste vetor de expressão na linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis*, para a construção de bactérias recombinantes capazes expressar estas proteínas heterólogas, e a sua utilização como um vetor vivo para a imunização de animais contra Toxoplasmose e Linfadenite Caseosa, com o objetivo de desenvolver uma vacina bivalente eficaz para ovinos e caprinos.

2. JUSTIFICATIVA

O mercado mundial de carne ovina e caprina está em crescimento constante, sendo que de 2000 a 2008 a produção de carne ovina aumentou 14,4%, enquanto que o rebanho caprino aumentou cerca de 40% em 20 anos (MDIC, 2010). A ovinocaprinocultura no Brasil está criando novas possibilidades comerciais e se tornando bastante expressiva, principalmente na região Nordeste.

Apesar do desenvolvimento de novas tecnologias e de modelos de sistemas de produção visando o bem estar, a saúde animal e a qualidade dos alimentos, a produção de caprinos e ovinos tem sido afetada pelo manejo inadequado do rebanho e pela ocorrência de doenças (Alves *et al*, 2007), dentre elas, a Linfadenite Caseosa (LC) e a Toxoplasmose, e grandes esforços em pesquisas tem sido realizados para erradicá-las.

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra toxoplasmose seria interessante para impedir a infecção aguda em fêmeas prenhes de rebanhos, impedindo a transmissão transplacentária do parasita e suas sérias consequências e prejuízos econômicos (Alexander *et al*, 1996), e também para prevenir a formação de cistos teciduais na carne dos animais de abate e sua transmissão por via oral (Caetano, 2005).

As afecções causadas por *C. pseudotuberculosis* em animais de produção também geram grandes prejuízos aos produtores, que incluem a redução na produção de lã, carne e leite. O tratamento da Linfadenite Caseosa em animais infectados não é economicamente viável e as vacinas disponíveis não oferecem a proteção necessária contra a infecção ou não foram ainda suficientemente testadas em campo (Dorella, 2009).

O uso de *Corynebacterium* como vetor vivo para a administração de antígenos heterólogos já foi demonstrado com sucesso modelando a resposta imune humoral e celular contra diversos antígenos de parasitas (Moore *et al*, 2000).

Portanto, é possível o desenvolvimento de uma vacina viva baseada em uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* expressando os genes de interesse, que forneça uma proteção dupla contra esses patógenos.

O desenvolvimento de vacinas com formulações que contenham em sua composição antígenos capazes de gerar proteção contra várias doenças é uma tendência, uma vacina bivalente contra toxoplasmose e linfadenite caseosa apresenta vantagens econômicas, como uma redução considerável nos custos de administração de duas vacinas, com um protocolo único de imunização, e também nos custos de produção. As vacinas para Toxoplasmose, baseadas em taquizoítos vivos atenuados ou no seu extrato antigênico, requerem o cultivo de células *in vitro* para a propagação do parasita, além de etapas de purificação para a separação de parasitas e debrís celulares e o seu armazenamento e transporte devem ser refrigerados, enquanto uma vacina baseada em um vetor bacteriano poderia ser facilmente cultivada em biorreatores, liofilizada e transportada à temperatura ambiente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver candidatos vacinas recombinantes contendo os antígenos de superfície de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* vetorizados em uma linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* e avaliar a resposta imune da formulação bivalente gerada em modelos animais.

3.2 Objetivos Específicos

1. Construir *C. pseudotuberculosis* recombinantes capazes de expressar os genes que codificam os antígenos de superfície SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii* em versões sem as sequências correspondentes à âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e com o peptídeo sinal do gene da fosfolipase D.
2. Avaliar, mediante a determinação da produção de anticorpos específicos, a imunogenicidade humoral da proteína de superfície SAG2 expressa por *C. pseudotuberculosis* e comparar com a imunogenicidade da mesma proteína expressa por adenovírus recombinantes, em camundongos BALB/c de acordo com protocolos de imunização do tipo iniciação/reforço.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis*, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (Brain Heart Infusion-BHI) ou em meio Luria Bertani (LB), acrescidos de 0,5% de Tween 20, por 48-72 horas a 37°C com agitação. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB por 16 horas a 37°C com agitação. Quando necessário, os meios foram suplementados com os antibióticos canamicina (25 µg/mL), tetraciclina (12,5 µg/mL) ou ampicilina (100 µg/mL).

4.2 Construção do gene sintético de SAG2 e clonagem no vetor pECTACK99

A sequência codificadora de SAG2 de *T.gondii* juntamente com a sequência que codifica o sítio de ligação de ribossomo (RBS) e o peptídeo sinal (PS) da fosfolipase D (PLD) de *C.pseudotuberculosis* foram sintetizadas e clonadas no vetor de expressão pECTACK99 (cedido pelo Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo) pela empresa GenOne Biotecnologia, gerando o plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 (figura 4). Estas sequências foram obtidas junto ao GenBank através dos números de acesso FJ825705.1 (SAG2) e L16587.1 (PLD). A sequência sintética de SAG2 foi desenhada com os códons preferenciais para *C. pseudotuberculosis* e também com a exclusão das sequências que codificam o peptídeo sinal de transporte para o retículo endoplasmático e o motivo de adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), nativos de SAG2. Foram inseridos sítios de restrição para as enzimas EcoRI, XmaI/SmaI e XbaI entre as sequências do peptídeo sinal da PLD e de SAG2.

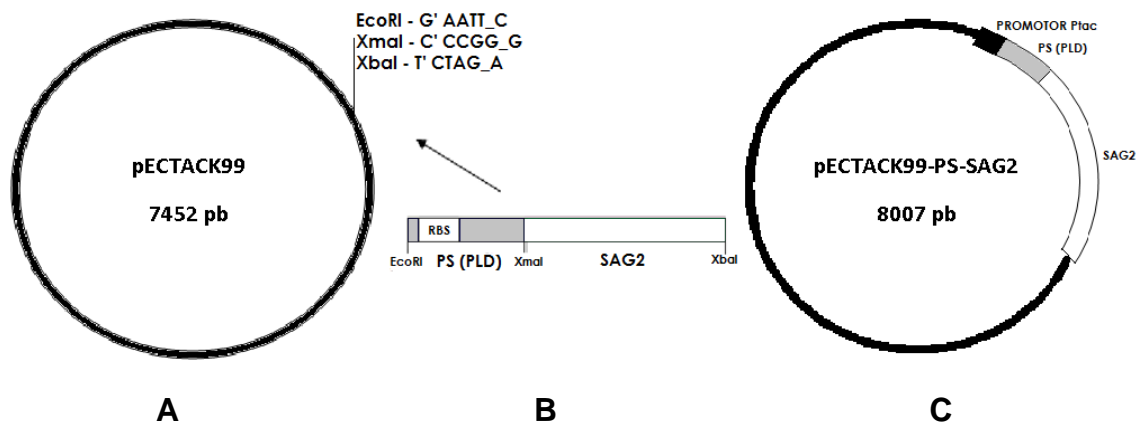


Figura 4: Representação esquemática da construção do plasmídeo. **A-** Vetor de expressão pECTACK99; **B-** Gene sintético de SAG2 com peptídeo sinal (PS), sítio de ligação de ribossomo (RBS) e sítio para as enzimas de restrição EcoRI, XmaI e XbaI; **C** – plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2.

4.3 Transformação bacteriana

4.3.1 Confeção de *Escherichia coli* XL1-Blue quimiocompetente

Uma colônia de *E. coli* XL1-Blue foi cultivada em 5 mL de meio LB suplementado com tetraciclina (12,5 µg/mL) e incubada sob agitação a 37°C por 16 horas. Uma alíquota de 1 mL desta cultura foi inoculada em 100 mL de LB e incubada sob as mesmas condições até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (DO_{600nm}) entre 0.4 e 0.6. As bactérias foram centrifugadas a 2800 x g por 10 minutos a 4°C e o sedimento homogeneizado em 20 mL de uma solução $CaCl_2$ (0,1M) estéril. As bactérias foram centrifugadas novamente e o sedimento celular foi ressuspenso em 2 mL da solução $CaCl_2$ (0,1M) com 15% de Glicerol, sendo então distribuído em alíquotas de 100 µL e congelados a -70°C até o momento do uso.

4.3.2 Transformação de *E. coli* XL1-Blue

O plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 foi utilizado para transformar células de *E. coli* XL1-blue quimiocompetentes pelo Método de Choque Térmico. Alíquotas de bactérias quimiocompetentes (armazenadas no -70°C) foram descongeladas e cerca de 100 ng do plasmídeo foram adicionados a cada

ependorff, a mistura foi incubada em gelo por 30 minutos, seguida de choque térmico a 42°C por 1'30" minuto. Após o choque térmico, foram adicionados 600 µL de meio LB e as bactérias foram incubadas a 37°C por 2 horas com agitação. Após a incubação as células foram plaqueadas em meio LB ágar com canamicina (25 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas, para seleção das colônias de bactérias transformadas.

4.3.3 Extração do DNA plasmidiano de *E. coli* XL1-Blue

Os plasmídeos foram obtidos em pequena escala (miniprep) por Kit (QIAGEN® Plasmid Purification) ou através do protocolo de lise alcalina descrito por Sambrook *et al*, (1989), com modificações. As colônias de bactérias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB suplementado com canamicina (25 µg/mL) e incubadas a 37°C por 16 horas com agitação. A cultura foi então centrifugada a 12.000 x *g* por 10 minutos e o precipitado ressuspenso em 300 µL de solução I (50mM de Tris-HCl pH 8.0 e 10mM de EDTA). Logo após, foram adicionados 300 µL de solução II (200mM de NaOH e 1% de SDS), sendo a mistura foi incubada por 5 minutos, e 300 µL de solução III (3.0M acetato de potássio, pH 5.5), sendo incubada novamente por 5 minutos no gelo e em seguida centrifugada a 12.000 x *g* por 10 minutos. Ao sobrenadante foram adicionados 0,7 volumes de isopropanol, seguido de centrifugação por 30 minutos a 12.000 x *g*. Os precipitados foram lavados com 1 mL de etanol 70%, ressuspenso em 30 µL de água ultra-pura e tratados com RNase A (100µg/mL) em banho-maria a 37°C por uma hora.

4.3.4 Digestão enzimática do plasmídeo para confirmação do inserto

O plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2, extraído das colônias transformantes de *E. coli* XL1-Blue, foi submetido à digestão enzimática com as enzimas EcoRI e XbaI, de acordo com especificações do fabricante. Os produtos das reações enzimáticas foram resolvidos em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04M; EDTA 0,001M), acrescido com brometo de etídio (1% p/v), sob voltagem de 100 V.

4.4 Construção dos plasmídeos pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3

4.4.1 Amplificação das sequências de SAG1 e SAG3.

As sequências de interesse foram amplificadas a partir dos plasmídeos padCMV-link-SAG1 e padCMV-link-SAG3 (Caetano, 2005) por PCR, a sequência destes insertos não possuem âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e peptídeo sinal. Iniciadores específicos foram desenhados utilizando o software Primer-Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), para permitir a inserção de sítios de restrição para as enzimas XmaI/SmaI e XbaI em todos os fragmentos e posterior clonagem destes no plasmídeo de expressão pECTAC-K99.

Os oligonucleotídeos utilizados para a realização das ampliações de SAG1 e SAG3 com os sítios de restrição específicos para a clonagem no pECTAC-K99 estão descritos a seguir (tabela 4), também estão descritos os oligonucleotídeos de SAG2 e do peptídeo sinal da PLD:

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação de SAG1, SAG2, SAG3 e do peptídeo sinal da PLD.

Sequência	Oligonucleotídeos e enzimas de restrição
Peptídeo sinal FW	5'ATGAATTC <u>CA</u> CTTGGTGATAAAAAATGAGG3'/EcoRI
Peptídeo sinal RV	5'TATCCCGGGGTTATGCACAACAGGCGC3'/XmaI
SAG 1 FW	5'ATCCCGGGACACTGATGTCGTTCTTGC3'/XmaI
SAG 1 RV	5'TTTCTAGATCATTGCTGACCCTGC3'/XbaI
SAG 2 FW	5'ATACCCGGGGAGACGCCAGCACCCATT3'/XmaI
SAG 2 RV	5'ATTCTAGATCAGAGAGACACAGGGTCA3'/XbaI
SAG 3 FW	5'TATCCCGGGGAGAGCACGGACTGTT3'/XmaI
SAG 3 RV	5'ATTCTAGATCATTCTGTTCCAGCTTGA3'/XbaI

Todas as reações de PCR deste trabalho foram realizadas com tampão (Taq DNA polimerase) 1X, 5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs (deoxinucleotídeo trifosfato); 5 pMol de cada iniciador, 1,25 U de Taq DNA polimerase e 10ng a

50ng da amostra de DNA diluídos em água ultra-pura q.s.p. 40µl. As amplificações foram realizadas em termociclador através de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (temperatura específica para cada par de primers por 1 minuto), extensão (72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 8 minutos.

4.4.2 Clonagem dos fragmentos de SAG1 e SAG3 no vetor de expressão pECTACK99-PS

Os produtos da PCR foram clonados no plasmídeo pCR[®]2.1-Topo (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante, gerando os plasmídeos PCR-TOPO-SAG1 e PCR-TOPO-SAG3, e usados na transformação de *E. coli* XL1-blue quimicompetente (vide item 4.3.2). Os plasmídeos das bactérias transformantes foram extraídos para a triagem dos clones positivos por PCR com os iniciadores específicos para SAG1 e SAG3. Após a confirmação, os plasmídeos PCR-TOPO-SAG1, PCR-TOPO-SAG3 e pECTACK99-PS-SAG2 foram clivados com as enzimas de restrição Xmal e Xbal para a liberação dos insertos de SAG1 e SAG3 e também para a recuperação do plasmídeo pECTACK99-PS, sem o inserto de SAG2. Foi feito o fracionamento das reações de clivagem em gel de agarose (1%) e as bandas correspondentes a SAG1, SAG3 e pECTAC-K99-PS foram eluídas dos fragmentos de gel com kit de purificação comercial, de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de SAG1 e SAG3 foram então clonados de maneira orientada no plasmídeo pECTACK99-PS (figura 5). As reações de ligação dos insertos no plasmídeo linearizado foram feitas com a enzima T4 DNA ligase (invitrogen), a 4°C overnight, e a razão molar utilizada foi de 3 inserto: 1 vetor. A reação de ligação foi utilizada para a transformação de *E. coli* XL1-blue quimicompetente e a triagem de clones positivos foi feita por digestão enzimática.

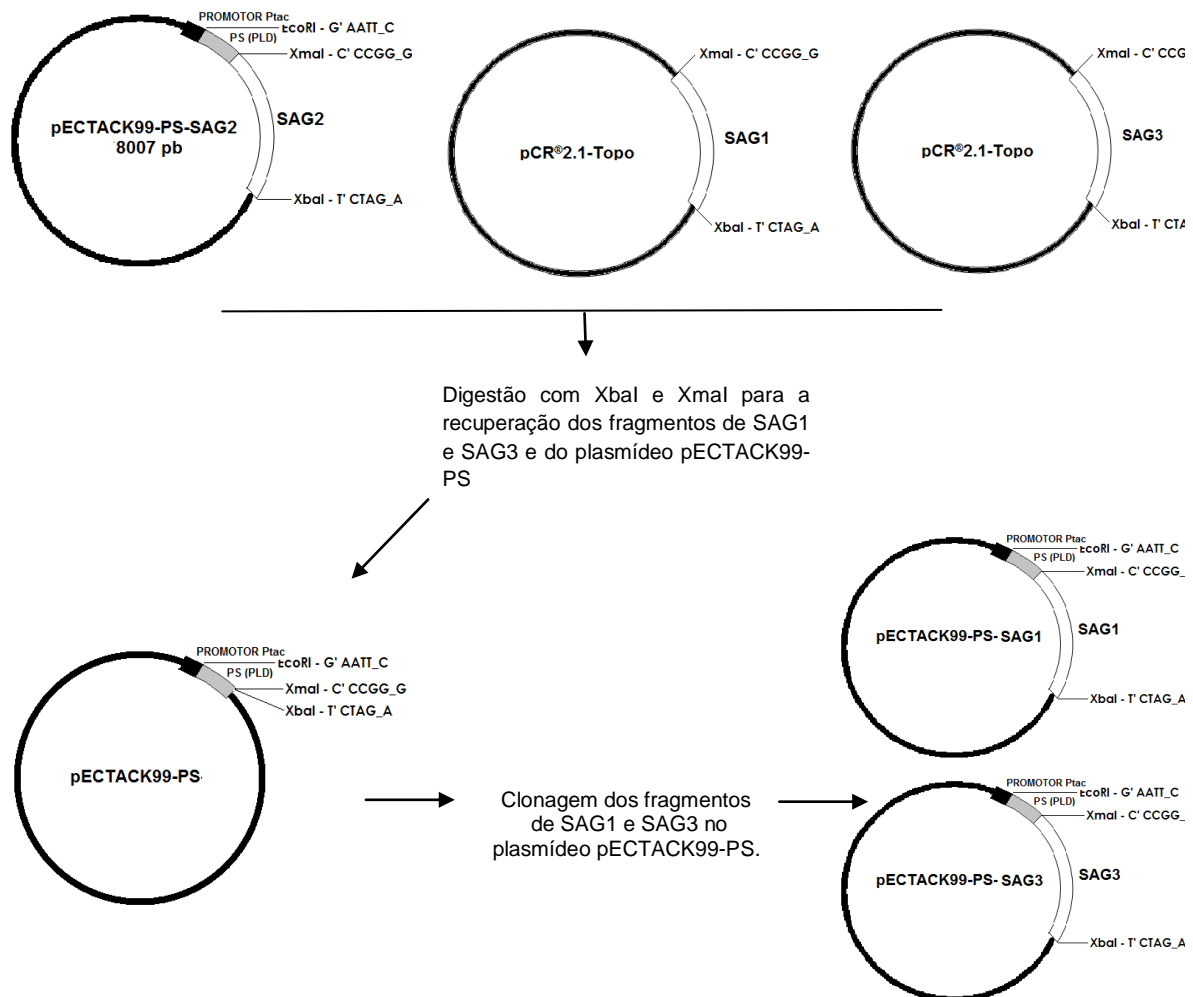


Figura 5: Representação esquemática da construção dos plasmídeo pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3.

4.5 Construção de *C. pseudotuberculosis* recombinantes

O plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 foi extraído por kit (QIAGEN® Plasmid Purification) e utilizado para a transformação de *C. pseudotuberculosis* por eletroporação de acordo com a técnica descrita por Dorella *et al*, (2006).

4.5.1 Confeção de *C. pseudotuberculosis* eletrocompetentes

Uma colônia de *C. pseudotuberculosis* crescida overnight em 5 mL de meio BHI foi diluída em 250 mL de meio BHI (1:50) e incubada a 37°C por aproximadamente 48 horas, sob agitação, até a cultura atingir uma densidade ótica a 600nm (DO_{600nm}) entre 1.0 e 1.5. A cultura foi então centrifugada a 2800

x g durante 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 40 mL de uma solução de glicerol 10% gelada e estéril. O processo foi repetido mais quatro vezes, sempre diminuindo o volume de glicerol (40mL, 20mL, 30mL e 10 mL). Após a última centrifugação, as bactérias foram ressuspensas em 1mL de solução de glicerol 10% e armazenadas em alíquotas de 100 µL a -70°C até o momento do uso.

4.5.2 Eletroporação de *C. pseudotuberculosis*

Alíquotas de células eletrocompetentes (congeladas no -70°C) foram colocadas no gelo durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 100ng de cada plasmídeo, sendo a mistura incubada no gelo por mais 5 minutos. As misturas foram transferidas para cubetas de eletroporação, previamente resfriadas, e submetidas a um pulso de 2,5 KVolts, capacitância 25 µFD e resistência de 200 Ω (OHMS). Imediatamente após o pulso, foi adicionado a cada cubeta 1,5mL de meio BHI para a ressuspensão das células, e estas foram incubadas a 37°C por 4 horas com agitação. Após este processo, alíquotas de 100 µL de cada suspensão de células eletroporadas foram plaqueadas em meio BHI ágar, suplementado com canamicina (25µg/mL), e incubadas a 37°C durante 48 horas.

4.5.3 Extração do DNA plasmidiano de *C. pseudotuberculosis*

Para a extração dos plasmídeos de *C. pseudotuberculosis* recombinantes foi utilizado o mesmo protocolo descrito para *E. coli* XL1-blue, com algumas modificações. Após a primeira centrifugação, o precipitado de bactérias foi primeiramente ressuspense em 1mL de uma solução de 50mM NaCl, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH8.0 e centrifugado a 12.000 x g por 2min. Em seguida, o precipitado foi ressuspense em 300 µL de solução I acrescida de 15mg/mL de lisozima e incubado a 37°C por 1 hora, o restante da extração seguiu de acordo com o item 4.3.3. A confirmação da presença dos insertos de SAG2 foi feita por digestão com as enzimas Xmal e XbaI.

4.6 Expressão da proteína SAG2 por *C. pseudotuberculosis* recombinantes

4.6.1 Indução

Foi feito um pré-inóculo a partir de um clone positivo de *C. pseudotuberculosis*, 10 µL da alíquota foram inoculados em 5 mL de meio BHI suplementado com 25 µg/mL de canamicina e incubado sob agitação a 37°C por 24 horas. Uma alíquota de 1 mL desta cultura foi inoculada em 50 mL de meio BHI e incubada sob as mesmas condições até a cultura atingir uma densidade óptica a 600nm (DO_{600nm}) de 0.5. Após atingir a DO foram adicionados 1mM de IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) a cultura, sendo retiradas alíquotas nos intervalos de 0, 2, 4, 6 e 8 horas após a indução para a aferição da DO e para a extração proteica.

4.6.2 Extração de proteínas secretadas e citoplasmáticas de *C. pseudotuberculosis*

As linhagens foram crescidas e induzidas como descrito no item 4.6.1. Tubos eppendorf contendo 2 mL das culturas induzidas e não induzidas foram centrifugados a 8000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado bacteriano foram tratados diferentemente para a precipitação das proteínas.

O precipitado bacteriano foi ressuspenso em 100 µL de uma solução de 10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 300 mM NaCl; 10 mg/mL Lisozima e 1mg/mL de antiproteases. A solução foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após a incubação foram acrescentados ao lisado bacteriano 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20% e tampão de carregamento (75 mM tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 15% glicerol, 0,15% azul de bromofenol e 200 mM ditioneitol-DTT) na proporção de 1:1, as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e conservadas a -20°C.

Ao sobrenadante foi acrescentado 200µl de ácido tricloroacético (TCA) 100% e 10mM de ditioneitol (DTT), sendo incubado por 1 hora no gelo. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 60 µL de NaOH 50 mM e tampão de carregamento, na proporção de 1:1. As amostras foram conservadas a -20°C até a utilização.

4.7 Detecção das proteínas recombinantes por Western Blotting

A técnica foi utilizada para a confirmação da expressão da proteína SAG2 por *C. pseudotuberculosis* recombinantes - CpSAG2 - e para a detecção de anticorpos anti-SAG2 no soro de camundongos imunizados com a bactéria recombinante. Para a realização do ensaio de Western Blotting foram utilizadas as frações proteicas extraídas de *C. pseudotuberculosis* (item 4.6.2). Também foram usados o antígeno total lisado (TLA) de taquizoítos (item 4.10.1) e o extrato de células HEK293 infectadas com adenovírus recombinantes codificando a proteína SAG2 - AdSAG2 (Caetano, 2005), que foram ressuspenso em tampão desnaturante (6 mL Tris-HCl 0,5 M; 4,8 mL glicerol; 9,6 mL SDS 10%; 2,4 mL β-mercaptoetanol; 1,2 mL azul de bromofenol 0,05% (v/v); 24 mL H₂O destilada) e aquecidos a 95°C por 5 minutos. Os extratos proteicos foram fracionados em SDS-PAGE 15% (Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio) e transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra-Amershan Biosciences). As membranas foram incubadas em tampão de bloqueio composto de PBS (Tampão fosfato salino) acrescido de 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado, durante uma noite a 4°C.

Para detecção da expressão de SAG2 por *C. pseudotuberculosis*, as membranas contendo os extratos de bactéria foram incubadas com de soro de camundongos BALB/c imunizados com AdSAG2, diluídos (1:500). Para análise da resposta imune humoral dos animais vacinados, soros de camundongos vacinados diluídos (1:50) e soro de camundongos infectados pela cepa Me49

de *T. gondii* (1:1000) (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor) foram testados individualmente contra o antígeno total de taquizoítos, o extrato de bactérias e o extrato de células HEK293. Os anticorpos primários foram incubados durante 2 horas, em tampão de bloqueio a temperatura ambiente, sob agitação. Após 3 lavagens com tampão de bloqueio, as membranas foram sensibilizadas com o anticorpo secundário Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) (ZyMAX™), na concentração 1:2000, em tampão de bloqueio por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com tampão de bloqueio, seguida de três lavagens com uma solução PBS contendo 0,1% Tween 20 e três lavagens somente com PBS. A revelação foi realizada com uma solução de 50mM Tris-HCL pH-8.0, 0,01% de peróxido de hidrogênio e 1mg/ml de DAB (diaminobenzidina).

4.8 Purificação e Titulação de Adenovírus recombinantes para imunização

O adenovírus recombinante (AdSAG2) utilizado codifica o antígeno de superfície SAG2 de *T. gondii*, e foi gerado por meio da co-transfecção e recombinação homóloga intracelular entre o plasmídeo pJM17, que contém o genoma do adenovírus humano tipo 5, e o vetor de transferência pAd-SAG2, pela Dra. Bráulia C. Caetano (Caetano, 2005). Para a amplificação e purificação do adenovírus, foram usadas 20 garrafas de células HEK293A (150cm²) cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB), 5mM de bicarbonato de sódio, 25mM de HEPES e 40mg/l de gentamicina, a 37°C e 5% de CO₂. Quando as células atingiram aproximadamente 60-80% de confluência, foram infectadas com AdSAG2 e cultivadas por 48 horas, quando foi observado o efeito citopático em mais de 50% da monocamada celular. As células foram centrifugadas a 3.500 x g por 15 minutos e o precipitado celular e sobrenadante foram submetidos ao processo de purificação utilizando o Kit Vivapure®AdenoPACK™500 (VivaScience), de acordo com instruções do fabricante. Os adenovírus purificados foram armazenados a -70°C em alíquotas de 200 µL.

Para a titulação, células HEK293 foram semeadas em placas de 6 poços, as células foram quantificadas em câmara de Neubauer, ajustadas para uma densidade de 6×10^5 células por poço e cultivadas em DMEM completo durante 24 horas. Os estoques de vírus foram diluídos (10^6 a 10^{11}) em DMEM sem SFB e 500 μ L de cada diluição foram utilizados para infectar as células, em duplicata. Após 1 hora de infecção, foram adicionados 2,5mL de meio DMEM 2% SFB em cada poço. Os cultivos foram mantidos a 37°C e 5% de CO₂ por 6 dias, quando foram observadas placas de lise isoladas na monocamada de células. O título foi calculado e expresso em número de unidades formadoras de placa de lise (p.f.u.) por mililitro de estoque viral.

4.9 Imunização de animais experimentais

Os camundongos da linhagem BALB/c foram obtidos do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

4.9.1 Cultivo de *C. pseudotuberculosis* recombinantes

As bactérias recombinantes (CpSAG2) foram cultivadas e induzidas (conforme o item 4.6.1), após 4 horas de indução a cultura foi centrifugada a 2800 x g por 5 minutos, o precipitado celular foi lavado uma vez e ressuspenso em PBS estéril. Foi feita a aferição da densidade óptica a 600nm (DO_{600nm}) e o cálculo do número de células viáveis por mL (UFC) para a diluição da suspensão bacteriana na concentração de 10^6 UFC.

4.9.2 Experimento de vacinação

Foram empregados protocolos de vacinação do tipo iniciação/reforço. Cada grupo vacinal foi constituído de 4 camundongos BALB/c fêmeas com idade de 12 semanas, os animais foram imunizados com 100 μ l das suspensões de CpSAG2 (10^6 UFC) ou de AdSAG2 (10^8 p.f.u), por via intraperitoneal e subcutânea na base da cauda, respectivamente. Os grupos receberam doses

de AdSAG2 ou de CpSAG2 (protocolo homólogo), ou doses dos dois vetores (protocolo heterólogo), com intervalos de 4-8 semanas entre as imunizações (Tabela 5). O grupo controle recebeu doses de PBS estéril. Amostras de soro foram obtidas por punção retro-orbital com pipeta de Pasteur um dia antes do início do protocolo de vacinação e duas semanas após cada imunização para serem empregadas nos ensaios de ELISA, Imunofluorescência e Western Blotting.

Tabela 5: Protocolos de vacinação.

Protocolo	Grupos	Iniciação*	Intervalo (semanas)	2ª Dose	Intervalo (semanas)	Reforço**
		Vetor		Vetor		Vetor
Homólogo	G1	AdSAG2	4	AdSAG2	4	AdSAG2
	G2	PBS	4	PBS	4	AdSAG2
	G5	CpSAG2	4	CpSAG2	4	CpSAG2
	G6	PBS	4	PBS	4	CpSAG2
Heterólogo	G3	AdSAG2	4	CpSAG2	4	CpSAG2
	G4	CpSAG2	4	CpSAG2	4	AdSAG2
Controle	G7	PBS	4	PBS	4	PBS

* Os animais receberam doses de 10^6 UFC de CpSAG2 ou 10^9 p.f.u de AdSAG2. Na iniciação todos animais foram vacinados por via intraperitoneal. ** No reforço os animais que receberam AdSAG2 foram vacinados com por via subcutânea na base da cauda.

4.10 Análise da resposta imune humoral

4.10.1 Preparo do antígeno total lisado (TLA) de taquizoítos.

A cepa RH de *T. gondii* foi utilizada nos ensaios de imunofluorescência e no preparo do antígeno total de taquizoítos, usado nos ensaios de ELISA e Western Blotting. Esta cepa é mantida por passagens sucessivas de taquizoítos em camundongos Suíços no Laboratório de Toxoplasmose, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG. Os taquizoítos são obtidos por meio de lavagem peritoneal dos animais infectados com PBS e foram cedidos pelo Prof. Dr. Ricardo Wagner de Almeida Vitor. Os parasitas foram recuperados por centrifugação a 70 x g por 10 minutos, para a remoção de debris celulares, e então precipitados a 590 x g por

10 minutos, ressuspensos em PBS e armazenados no -70°C. Para o preparo do TLA foi acrescentado 0,1% de Triton à suspensão de taquizoítos, que foi submetida a 3 ciclos de choque térmico, com congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

4.10.2 Imunofluorescência

O ensaio foi realizado com taquizoítos vivos da cepa RH ressuspensos em uma densidade de 10^6 parasitas/mL em PBS. Lâminas de imunofluorescência foram sensibilizadas com 10µl da suspensão de taquizoítos, secas e fixadas com metanol por 10 minutos. Logo após, foram incubadas com 10µl do soro de animais vacinados, diluídos (1:16 a 1:256) em PBS, a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Após 3 lavagens com PBS, as lâminas foram secas e incubadas novamente com 10 µl do conjugado FITC- goat anti-Mouse IgG (ZyMAX™) diluído 1:200 em solução PBS com 0,01% de azul de Evans, a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. As lâminas foram lavadas três vezes com PBS e montadas com uma gota de solução de glicerol 40% diluído em PBS, cobrindo-se com lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência.

4.10.3 Ensaio Imunoenzimático - ELISA

A resposta imune induzida pelas vacinações foi analisada empregando-se Elisa. Amostras de soro foram testadas contra o antígeno total lisado (TLA) de taquizoítos. Placas de 96 poços (Nunc Maxisorp) foram sensibilizadas com 0,2 µg por poço de TLA diluído em tampão carbonato (15mM de carbonato de sódio e 34mM de bicarbonato de sódio, pH=9,6), a 4°C por 16 a 18 horas, e bloqueadas com 200 µl/poço de PBS acrescido de 0,05% Tween 20 e 10% de SFB a 37°C por 4 horas. Após duas lavagens com PBS (0,05% Tween 20), as placas foram incubadas com 100 µl/poço dos soros de animais imunizados diluídos em PBS (0,05% Tween 20 e 10% de SFB) a 37°C por 2 horas. As placas foram lavadas novamente por três vezes e incubadas com 100 µl/poço

do anticorpo secundário Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) (ZyMAX™) diluído 1:10000 em PBS (0,05% Tween 20 e 10% de SFB) a 37°C durante 1 hora. Após seis lavagens, as reações foram reveladas com 50 µl/poço de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e interrompidas com 50 µl/poço de uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da absorbância das reações foi realizada a 450nm. O soro pré-imune dos animais foi utilizado para calcular o cut-off através da fórmula: Cut-off = Média das absorbâncias do controle negativo + 3 X (Desvio padrão do controle negativo).

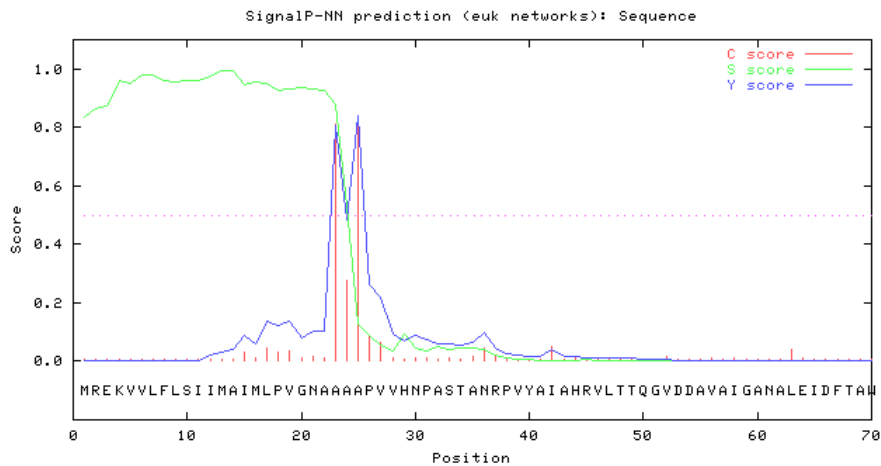
5. RESULTADOS

5.1 Construção de *C. pseudotuberculosis* recombinantes

5.1.1 Construção do gene sintético de SAG2 e clonagem no vetor pECTACK99

Para garantir a expressão adequada da proteína pela bactéria recombinante a sequência codificadora de SAG2 foi desenhada com os códons preferenciais para *C. pseudotuberculosis*. Outra modificação consistiu na troca do peptídeo sinal de direcionamento ao retículo endoplasmático (PS) nativo da SAG2 pelo peptídeo sinal da fosfolipase D (PLD) de *C. pseudotuberculosis*. A sequência de nucleotídeos da PLD foi submetida a uma análise *in silico* através programa signalP 3.0 (figura 6), o qual permitiu identificar a sequência do peptídeo sinal que foi inserido na extremidade 5' da sequência de SAG2, para a secreção da proteína.

A tradução da proteína recombinante é dirigida pela sequência de reconhecimento ribossomal (TGGTGA) (Hodgson *et al*, 1989) e pelo códon ATG presentes na sequência do peptídeo sinal da PLD (figura 7). As sequências que codificam a proteína SAG2 e o peptídeo sinal (PS) da PLD de *C. pseudotuberculosis* foram sintetizadas e clonadas no vetor de expressão pECTACK99 pela empresa GenOne Biotecnologia, gerando o plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2.



[data](#)

```
>Sequence length = 70
# Measure Position Value Cutoff signal peptide?
max. C 25 0.821 0.32 YES
max. Y 25 0.842 0.33 YES
max. S 13 0.992 0.87 YES
mean S 1-24 0.923 0.48 YES
D 1-24 0.883 0.43 YES
# Most likely cleavage site between pos. 24 and 25: AAA-AP
```

Figura 6: Predição do peptídeo sinal da sequência da fosfolipase D (PLD) de *C.pseudotuberculosis* usando o programa SignalP 3.0, com provável sítio de clivagem entre os resíduos AAA-AP.

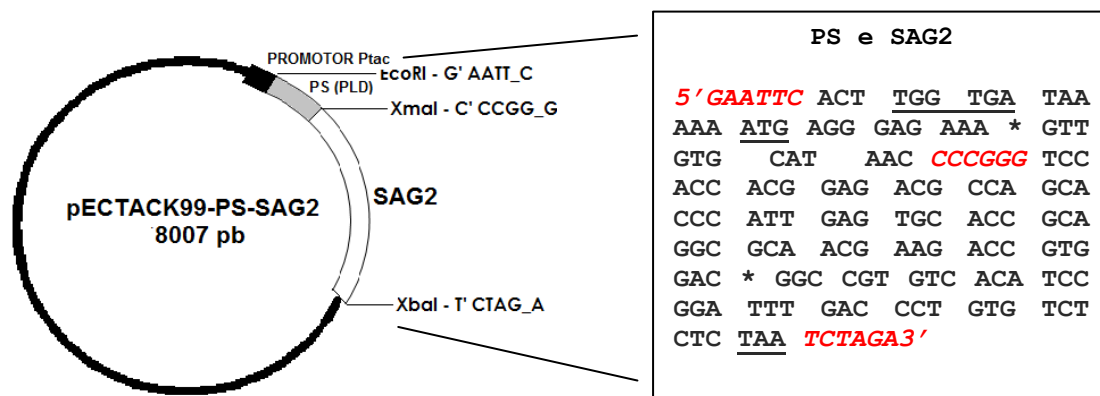


Figura 7: Construção contendo a sequência do peptídeo sinal da PLD e a sequência de SAG2. Sítios de enzimas de restrição – EcoRI (GAATTC), XmaI (CCCGG) e XbaI (TCTAGA). Sequência de reconhecimento ribossomal (TGGTGA), códon de iniciação (ATG) e códon de parada (TAA).

5.1.2 Detecção da expressão de SAG2 através de Western Blotting.

O plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2 foi inserido em *C. pseudotuberculosis* por eletroporação e para confirmar a presença do inserto foi realizada a digestão com as enzimas XmaI e XbaI. A figura 8 mostra a presença de bandas na altura aproximada de 440 pb, que corresponde a sequência de SAG2. A capacidade de expressão da proteína por *C. pseudotuberculosis* recombinante foi verificada por meio de Western-blotting, no qual o extrato bacteriano foi testado contra soro o de camundongos BALB/c imunizados com adenovírus recombinantes que expressam SAG2 (AdSAG2). É possível observar na figura 9, bandas na altura aproximada de 22kDa, correspondentes a SAG2, no extrato de bactérias com 2, 4, 6 e 8 horas de indução, que estão ausentes no extrato de bactérias induzidas transformadas com plasmídeo controle (pECTACK99 vazio).

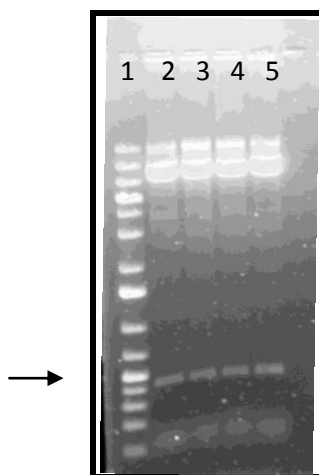


Figura 8: Transformação de *C. pseudotuberculosis* com o plasmídeo pECTACK99-PS-SAG2. Digestão da construção com XmaI e XbaI confirma a presença do gene. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1-Marcador de peso molecular 1Kb (DNA Ladder - Invitrogen); 2, 3, 4 e 5 – clones positivos, produto da digestão do plasmídeo (440pb) .

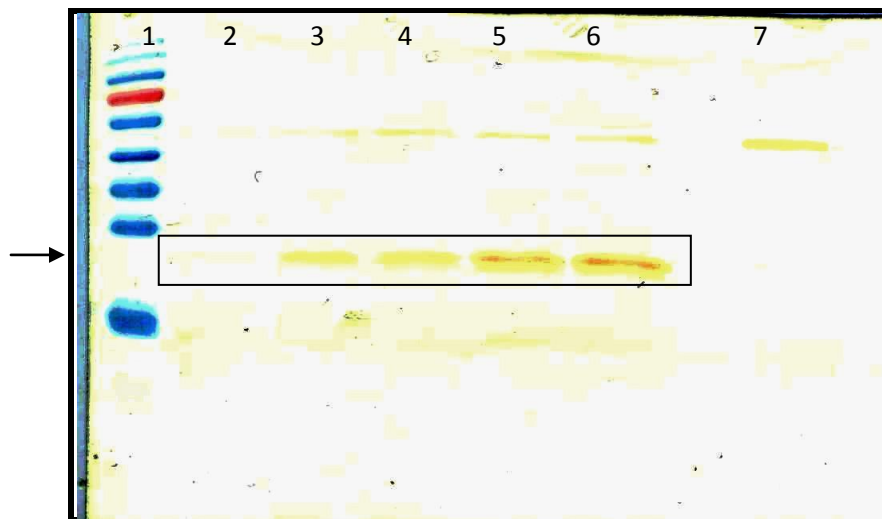


Figura 9: Reação positiva do extrato de bactérias com soro de camundongos imunizados com AdSAG2 em Western-blotting confirma a expressão do antígeno SAG2 (22kDa). 1- Marcador de peso molecular (BenchMark™ - Invitrogen); 2, 3, 4, 5 e 6 – *C. pseudotuberculosis* transformadas com pECTACK99-PS-SAG2 com 0, 2, 4, 6 e 8 horas de indução, respectivamente; 7 - indução de 8 horas de *C. pseudotuberculosis* transformadas com o plasmídeo pECTACK99 vazio, controle negativo.

5.2 Construção dos plasmídeos pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3

5.2.1 Amplificação de SAG1 e SAG3

Os iniciadores para a amplificação dos genes de interesse foram desenhados com os sítios de restrição para EcoRI, XmaI e XbaI (tabela 4). Os genes que codificam as proteínas SAG1 e SAG3 de *T. gondii* foram amplificados a partir dos plasmídeos padCMV-link-SAG1 e padCMV-link-SAG3 por meio de PCR (figura 10) e clonados no pCR®2.1-Topo, que foi usado na transformação de *E. coli* quimiocompetentes para a construção de *C. pseudotuberculosis* recombinantes.

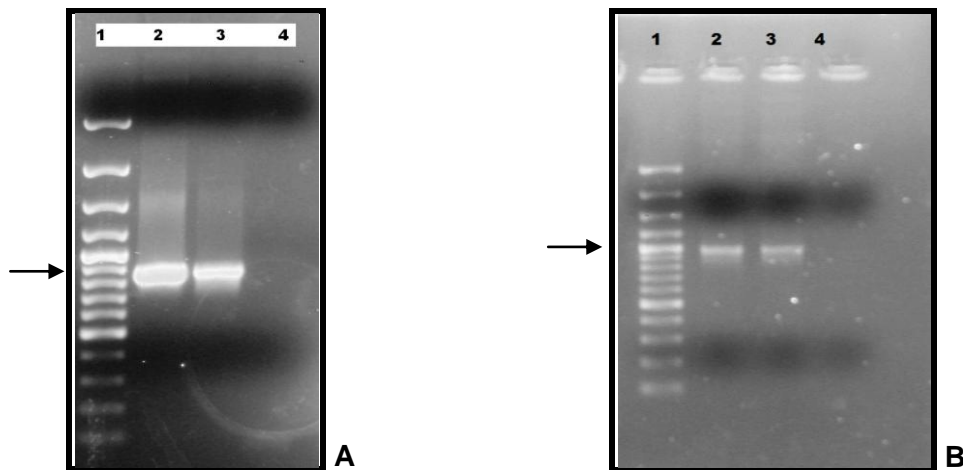


Figura 10: PCR de SAG1 e SAG3 a partir dos plasmídeos padCMV-link-SAG1 e padCMV-link-SAG3. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. **A-** 1-Marcador de peso molecular 100pb (DNA Ladder - Invitrogen), 2 e 3- produtos de PCR SAG1 (~830pb) e 4-controle da reação; **B** - 1-Marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder (Invitrogen), 2 e 3- produtos de PCR SAG3 (~1000pb) e 4-controle da reação.

5.2.2 Clonagem de SAG1 e SAG3 no vetor de expressão pECTACK99-PS.

As sequências de SAG1 e SAG3, previamente clonadas no topo, foram clivadas e inseridas entre os sítios de XmaI e XbaI do vetor de expressão pECTACK99-PS. Este vetor é proveniente da clivagem de pECTACK99-PS-SAG2 com as mesmas enzimas (XmaI e XbaI), o que proporcionou a liberação da sequência de SAG2. Para verificar se os genes haviam sido corretamente inseridos no vetor de expressão, procedeu-se à digestão de vários clones com enzimas de restrição. Para a construção pECTACK99-PS-SAG1 foram utilizadas as enzimas EcoRI e XbaI, originando o fragmento de 907 pb, e para pECTACK99-PS-SAG3 empregou-se EcoRI e ClaI, o que gerou o fragmento de 2097 pb (figura 11).

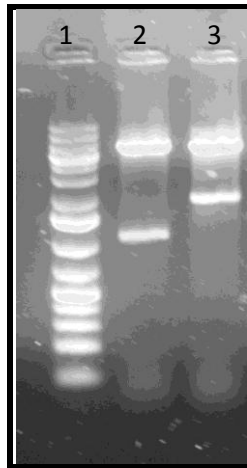


Figura 11: Digestão das construções de pECTACK99-PS-SAG1 e pECTACK99-PS-SAG3 confirma a presença dos genes. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. 1- Marcador de peso molecular 1Kb (DNA Ladder - Invitrogen); 2–produto da digestão do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG1 com EcoRI e XbaI (907pb); 3–produto da digestão do plasmídeo pECTACK99-PS-SAG3 com EcoRI e ClaI (2097pb).

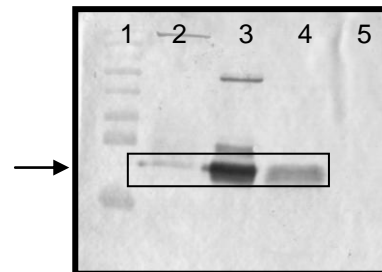
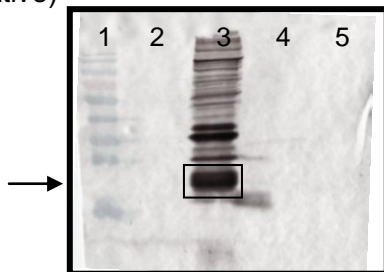
5.3 Análise da resposta imune humoral

Para os ensaios de vacinação foram empregados protocolos do tipo iniciação/reforço homólogos. Também foram realizados ensaios de imunização heterólogos, usando *C. pseudotuberculosis* recombinantes (CpSAG2) e adenovírus recombinantes (AdSAG2) que expressam a proteína SAG2. Esta abordagem visou melhorar os níveis de IgGs anti-SAG2, já que em protocolos homólogos a resposta imune contra o vetor na segunda dose pode diminuir a intensidade da resposta contra a proteína recombinante. Para a imunização os adenovírus foram amplificados em células HEK293, purificados e seu título estimado. Camundongos BALB/c receberam doses de 1×10^8 pfu de adenovírus por via subcutânea e de 1×10^6 UFC de *C. pseudotuberculosis* por via intraperitoneal (tabela 5), com intervalo de quatro semanas entre cada imunização, e a indução da resposta imune humoral foi analisada por Western Blotting, Imunofluorescência e ELISA.

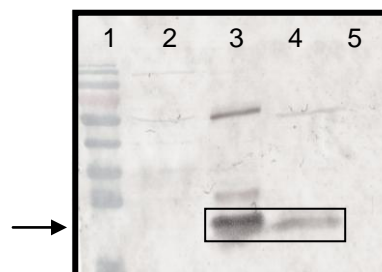
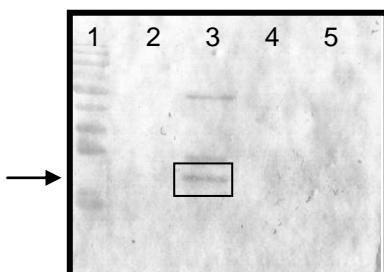
5.3.1 Detecção da resposta imune humoral induzida nos camundongos imunizados

Para verificar se os camundongos imunizados com os vetores recombinantes produziram anticorpos específicos contra a proteína foi realizado um ensaio de Western-blotting, no qual as amostras de soros de cada grupo, coletadas duas semanas após a última dose das vacinas, foram testadas contra antígeno total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA) e contra o extrato proteico da bactéria recombinante. Podemos observar bandas na altura de 22kDa (figura 12), tamanho esperado para a SAG2, indicando que os soros de camundongos imunizados com AdSAG2 e com CpSAG2 reagiram especificamente com a proteína SAG2 presente no extrato total de taquizoítos de *T. gondii*.

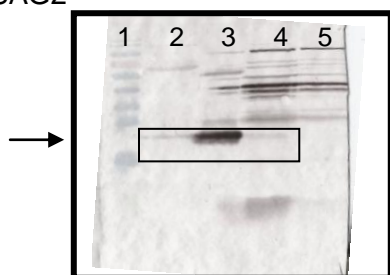
A – soro de animais imunizados com taquizoítos da cepa Me49 (controle positivo) **B** – G1 - soro de animais imunizados com duas doses de AdSAG2



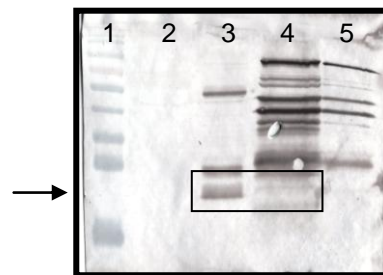
C - G2 - soro de animais imunizados com uma dose de AdSAG2 **D** – G3 - soro de animais imunizados com uma dose de AdSAG2 e uma de CpSAG2



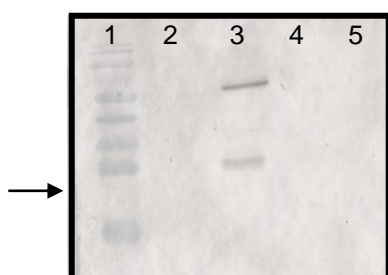
E – G4 - soro de animais imunizados com duas doses de CpSAG2 e uma dose de AdSAG2



F – G5 - soro de animais imunizados com três doses de CPSAG2



G – G6 - soro de animais imunizados com uma dose de CpSAG2



H – G7 - soro de animais imunizados com PBS (controle negativo)

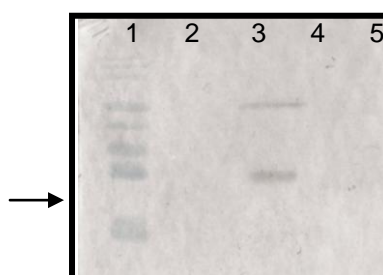
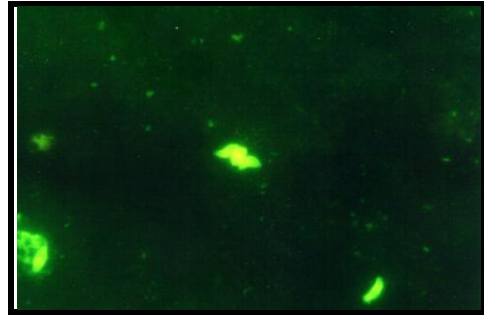
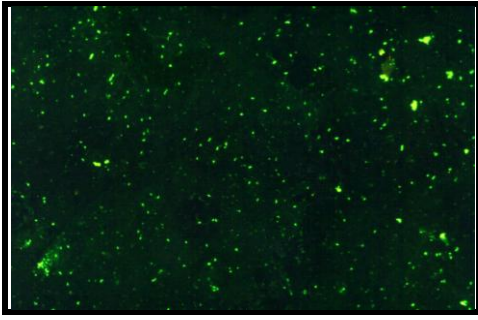


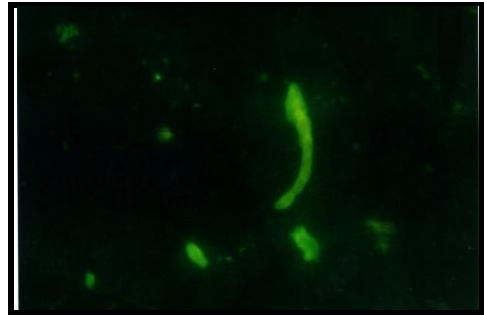
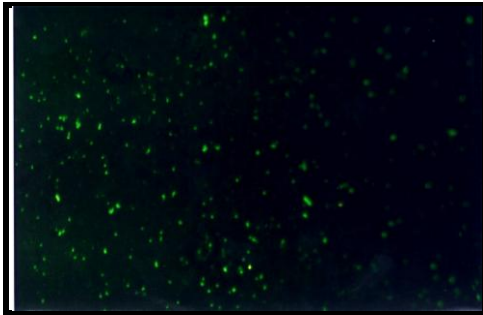
Figura 12: Resposta imune humoral dos animais vacinados - Western-blotting realizado com soros de camundongos BALB/c obtidos após a última dose dos vetores recombinantes. Canaletas: 1- Marcador de peso molecular (BenchMark™ - Invitrogen); 2 – Sobrenadante de células HEK293 infectadas com AdSAG2; 3 – Antígeno total lisado de taquizoítos (TLA); 4 - Extrato de CpSAG2 induzida; 5 – *C. pseudotuberculosis* transformadas com o plasmídeo pECTACK99 vazio e induzida. É possível observar a produção de anticorpos específicos que reagiram com as frações proteicas de SAG2 (22kDa) em todos os grupos vacinais, exceto em G6 e G7.

5.3.2 Imunofluorescência

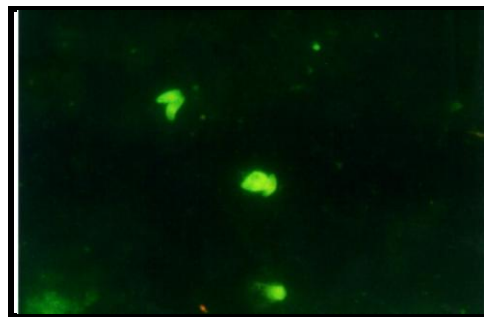
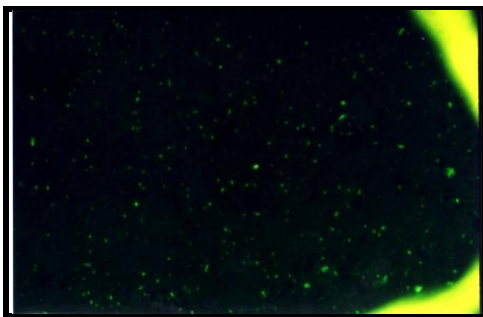
A reatividade dos anticorpos contra a forma nativa de SAG2 pode ser confirmada em experimentos de Imunofluorescência (Figura 13). Amostras de soro de animais infectados com a cepa Me49 (controle positivo), vacinados com AdSAG2 (grupo 1), com CpSAG2 + AdSAG2 (grupo 4), com CpSAG2 (grupo 5) e o soro de animais não imunizados (controle negativo), foram testados contra taquizoítos vivos de *T.gondii* da cepa RH fixados em lâminas de imunofluorescência e revelados com anticorpos conjugados com isoticianato de fluoresceína (FITC).



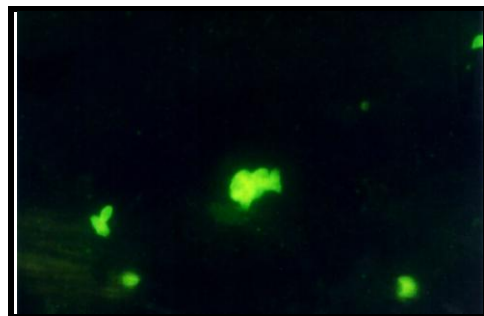
A



B



C



D

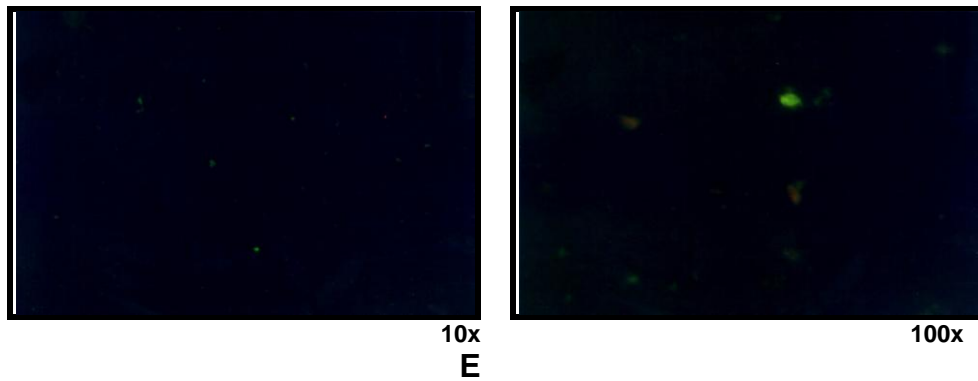
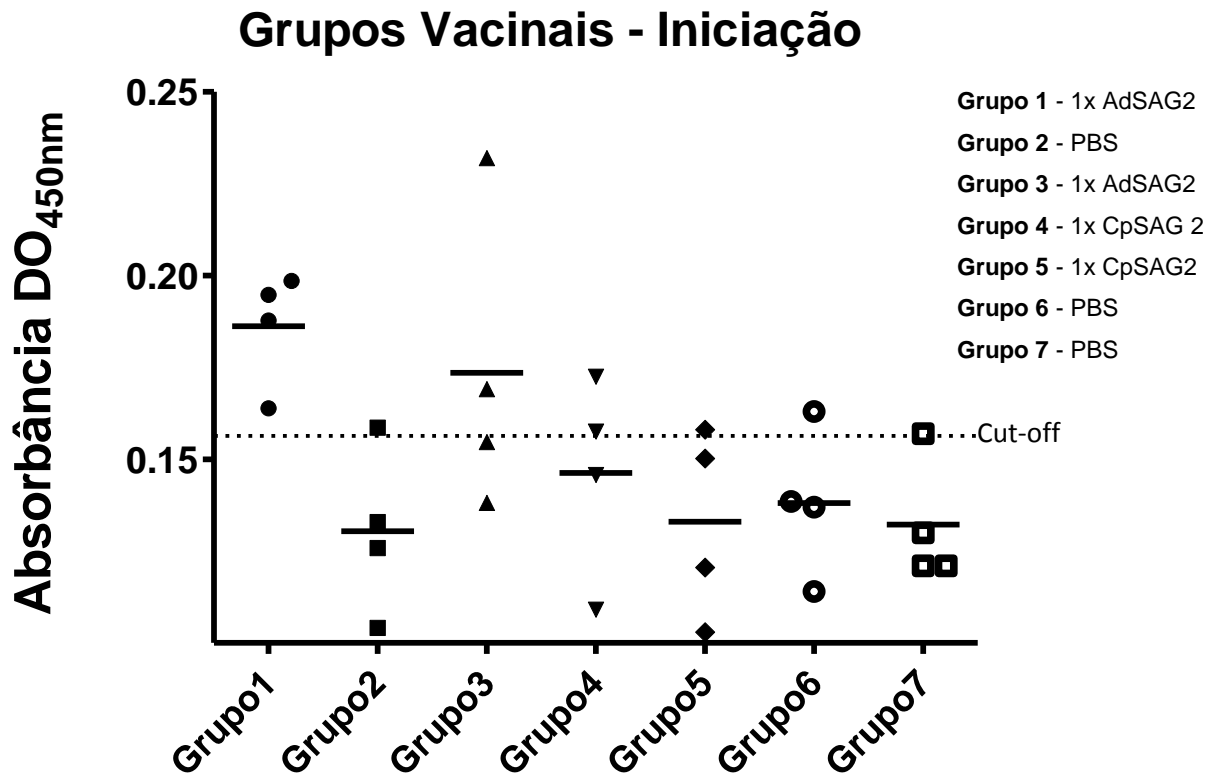


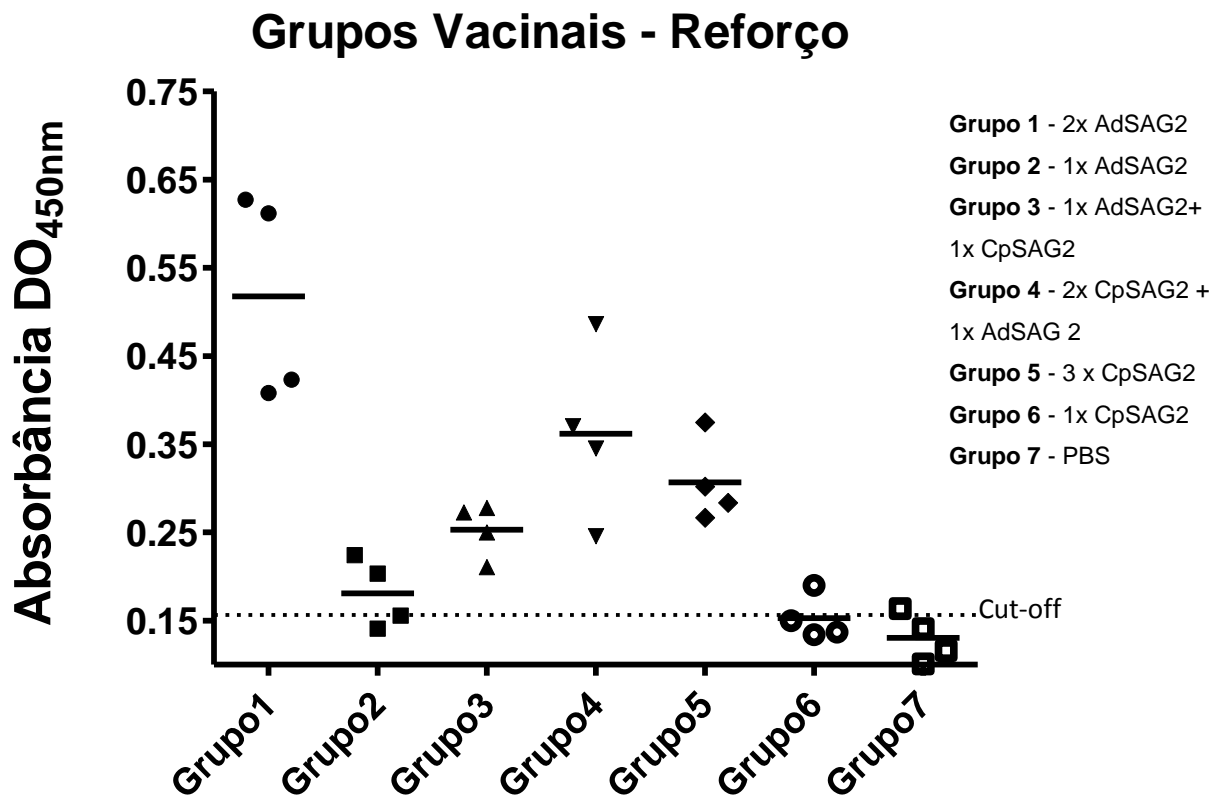
Figura 13: Imunofluorescência. **A** – Soro de animais infectados com Me49; **B** – G1 – animais imunizados com duas doses de AdSAG2; **C** – G4 – animais imunizados com duas doses de CpSAG2 e uma de AdSAG2; **D** – G5 – animais imunizados com três doses de CpSAG2; **E** – G7 – animais não imunizados.

5.3.3 Ensaio Imunoenzimático ELISA

Este ensaio foi realizado para verificar o desenvolvimento de resposta humoral após a imunização de camundongos BABL/c com os vetores recombinantes expressando a proteína SAG2 de *T. gondii*. Amostras de soro de todos os grupos vacinais (tabela 5) foram coletadas 15 dias após cada dose e os níveis de anticorpos IgG foram detectados por testes de ELISA com o antígeno total lisado de taquizoítos (TLA) (figuras 14 e 15). Após a primeira dose, somente os animais imunizados com o adenovírus recombinante AdSAG2 apresentaram um aumento nos níveis de IgG total (grupo 1 e grupo 3), evidenciado pela comparação dos valores médios de absorvância (\bar{x} DO_{450nm}) de cada grupo em relação ao soro pré-imune dos animais (Cut-off) e ao controle negativo (grupo 7). Os níveis de IgG anti-SAG2 aumentaram significativamente após o reforço, sendo possível detectar a produção de anticorpos nos grupos de animais imunizados com três doses de CpSAG2 (grupo 5), entretanto, a produção foi mais intensa nos animais que receberam duas doses de AdSAG2 (grupo 1). Também foi possível detectar anticorpos nos protocolos de imunização heteróloga, com duas doses de CpSAG2 e uma de AdSAG2 (grupo 4) e com uma dose de AdSAG2 e uma de CpSAG2 (grupo 3).

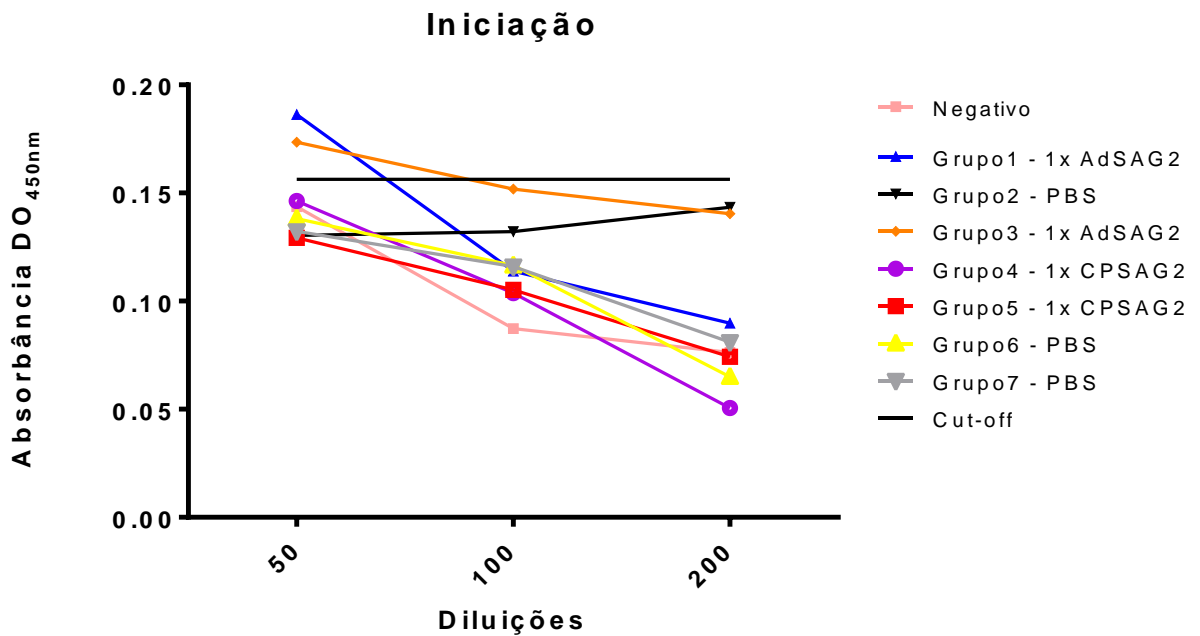


A

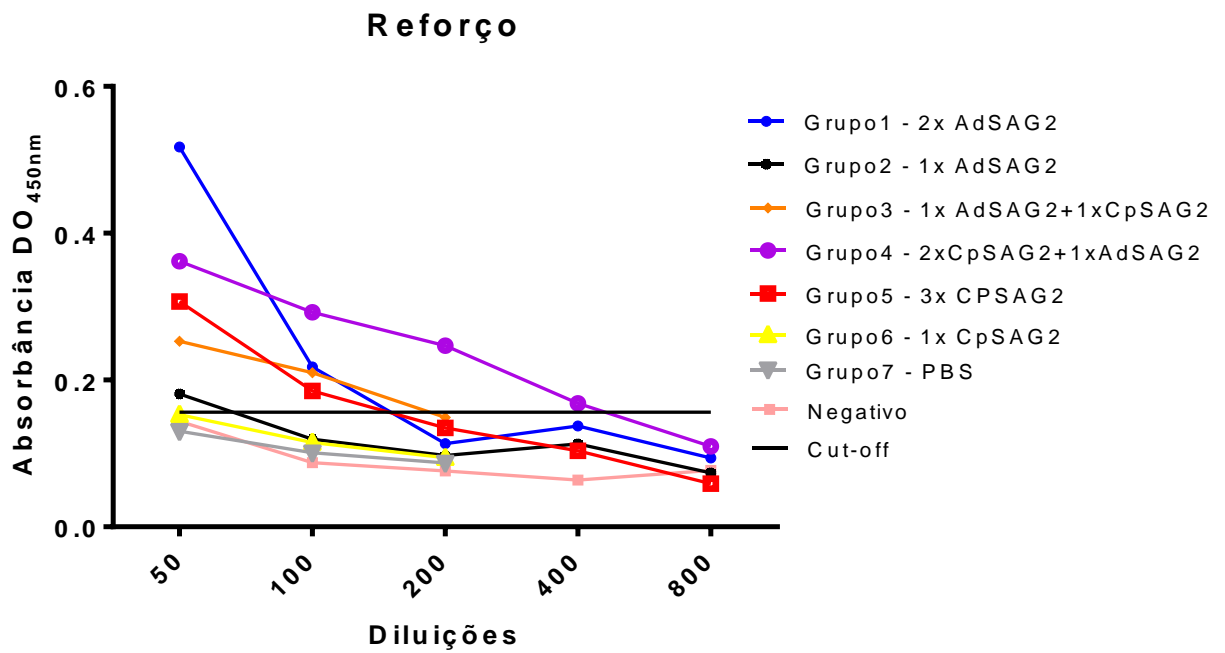


B

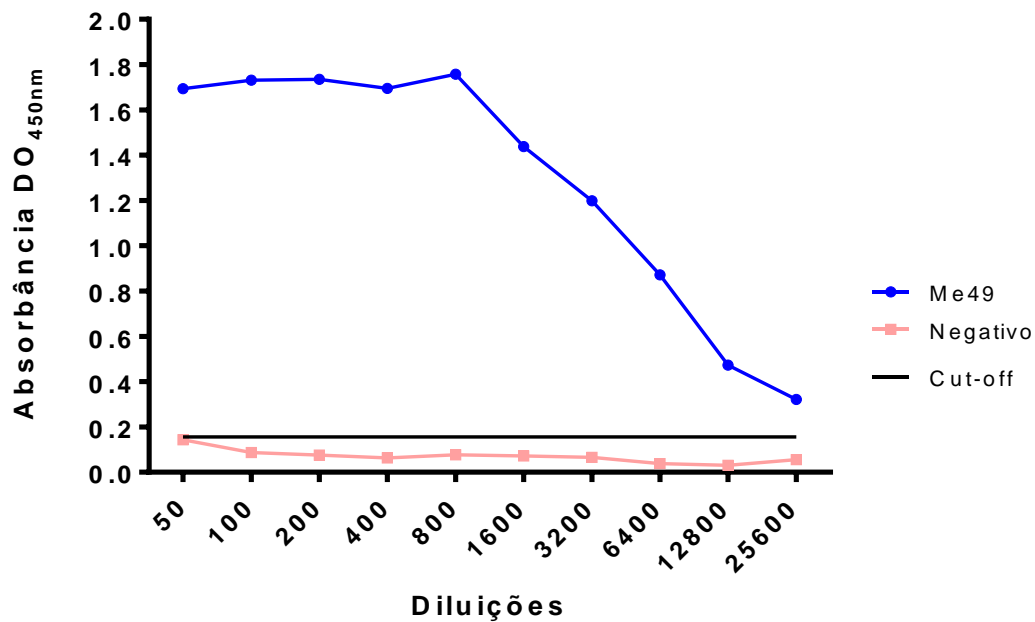
Figura 14 – Resposta imune humoral em camundongos vacinados com vetores recombinantes. Amostras de soro foram coletadas de cada grupo, duas semanas após cada imunização, e foram testadas em ensaios de ELISA contra o antígeno total lisado de taquizoítos (TLA) para a detecção dos níveis de IgG total anti-SAG2. Os gráficos demonstram os resultados obtidos para cada grupo vacinal (média de 4 animais e o desvio padrão) na diluição de 1:50 dos soros. **A** - Após a dose inicial - G1 (0,1862 ± 0,0156), G2 (0,1304 ± 0,0224), G3 (0,1735 ± 0,041), G4 (0,1462 ± 0,0271), G5 (0,1330 ± 0,0257), G6 (0,1381 ± 0,02), G7 (0,1323 ± 0,017); **B** - dose reforço - G1 (0,5175 ± 0,1180), G2 (0,1809 ± 0,0392), G3 (0,253 ± 0,0305), G4 (0,3619 ± 0,0988), G5 (0,3068 ± 0,0477), G6 (0,1528 ± 0,0258), G7 (0,1304 ± 0,0276). Como controles negativos foram empregados animais imunizados com PBS e o Cut-off (0,156378) foi calculado a partir do soro pré-imune dos animais.



A



B



C

Figura 15: Diluições seriadas dos soros de animais vacinados com vetores recombinantes após a dose inicial (A) e o reforço (B). Diluições dos soros pré-imune e do soro de animais imunizados com a cepa Me49 utilizados como controle negativo e positivo nos testes de ELISA, para o cálculo do Cut-off e para testar a concentração do antígeno total de taquizoítos (0,2µg) que foi usado para sensibilizar as placas de ELISA (C).

6. DISCUSSÃO

Atualmente, proteínas recombinantes produzidas por microrganismos geneticamente modificados já são amplamente empregadas na produção de hormônios, em imunodiagnósticos e como potenciais vacinas contra diversas doenças em humanos e animais. No entanto, para que um sistema de expressão (bactérias, leveduras ou vírus) seja realmente viável, este deve apresentar algumas características que o tornam adequado para a utilização em larga-escala, como facilidade de cultivo e manipulação genética, alta taxa de expressão e baixo custo de produção. As bactérias recombinantes além de apresentarem as características citadas, já sendo usadas industrialmente na produção de proteínas heterólogas, podem também ser usadas no desenvolvimento de vacinas atuando como vetores vivos na entrega de antígenos heterólogos.

A vacinação é a medida com melhor custo-benefício para prevenção de doenças infecciosas e para ser eficiente deve estimular uma forte e duradoura resposta imune. As vacinas de subunidades recombinantes (proteínas e adjuvantes, vacinas de DNA e vetores vivos recombinantes) assim como a utilização de vacinas com formulações que contenham antígenos capazes de gerar proteção contra várias doenças são uma tendência atual (Bruna-Romero *et al*, 2012), também aplicável ao desenvolvimento de uma vacina contra Toxoplasmose. A substituição pelo ministério da Saúde da vacina tetravalente (DTP-Hib) pela vacina pentavalente (DTP-HBV-Hib), que protege contra difteria, tétano, pertussis, hepatite B (recombinante) e meningites causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (conjugada), com a perspectiva de transformar a vacina pentavalente em heptavalente num período de 4 anos, com a inclusão das vacinas inativada poliomielite (IPV) e meningite C conjugada (Ministério da Saúde, 2012), confirmam estas propensões. Vacinas hexavalentes, que combinam seis antígenos em uma única dose, também já estão disponíveis, a imunogenicidade da DTPa-HBV-IPV/Hib (Infanrix)hexa já foi estabelecida (Aristegui *et al*, 2003, Zepp *et al*, 2004, Lim *et al*, 2007). Estudos demonstram que estas vacinas multivalentes oferecem uma proteção adequada, são bem

toleradas e seguras quando comparadas a vacina administrada separadamente (Merchant & Waldrop, 2012).

A imunização com antígenos peptídicos purificados frequentemente induz uma fraca resposta imune e a sua administração deve ser associada a adjuvantes, que aumentam a sua imunogenicidade (Pashine *et al*, 2005). O uso de bactérias como vetores vivos é uma ideia atrativa, já que alguns componentes da parede ou da membrana celular (lipossacarídeos, polissacarídeos e fosfolipídios) e toxinas secretadas pelo próprio microrganismo poderiam desempenhar o papel de adjuvante vacinal ao serem capazes de estimular diversos receptores da imunidade inata (TLRs, NODs e outros). Este sistema também pode direcionar corretamente o antígeno para alvos específicos do sistema imune, como as células apresentadoras de antígenos (APCs). Nesse sentido, *C. pseudotuberculosis* atenuadas apresentam características para se tornar um potente vetor vacinal vivo, como a secreção de fatores de virulência com atividade adjuvante e a habilidade de infectar APCs. Os aspectos biológicos da infecção, como a capacidade de sobreviver em nichos que variam do ambiente extracelular aeróbico, no início da infecção, ao ambiente intracelular, com a replicação dentro de macrófagos (Moore *et al*, 2007), sugerem também a sua capacidade de induzir uma resposta imune humoral e celular.

A linhagem atenuada de *C. pseudotuberculosis* Toxminus já foi utilizada como vetor vivo, e foi capaz de expressar os genes que codificam o antígeno 18-KDa de *Mycobacterium leprae*, o antígeno ApH de *Anaplasma marginale*, a protease (bprV) de *Dichelobacter nodosus*, o antígeno 11C5 de *Babesia bovis*, e o gene 45W de *Taenia ovis*, no entanto, dos cinco genes testados, somente os três primeiros foram capazes de gerar anticorpos específicos após a imunização de ovelhas, apesar da expressão do antígeno 11C5 ter sido considerada alta, a explicação para a falta de resposta imune é que mesmo com a indução por IPTG *in vitro*, anterior a inoculação, sem o indutor *in vivo* a expressão foi rapidamente reprimida, e no caso do gene 45W de *T. ovis* a expressão da proteína recombinante parece não ter sido tolerada pela bactéria (Moore *et al*, 2000). Em um estudo posterior, a mesma linhagem (Toxominus), expressando

a bprV de *D. nodosus* fusionada com o antígeno de 18-KDa de *M. leprae*, foi usada na imunização de animais experimentais e embora não ter sido possível a proteção contra a pododermatite, a vacina foi capaz de estimular uma resposta imune humoral contra a proteína recombinante (Moore *et al*, 2001).

Neste trabalho foram construídas *C. pseudotuberculosis* recombinantes codificando o antígeno de superfície SAG2 de *T. gondii* e a bactéria recombinante foi testada como vetor vivo na imunização de camundongos BALB/c. A proteína SAG2 de *T. gondii* foi escolhida como antígeno vacinal devido a suas características imunogênicas e um estudo recente demonstrou que a imunização de camundongos com os antígenos SAG2 + ROP2, em associação com o adjuvante completo de Freund, foi capaz de induzir a produção de IFN- γ e também de níveis significantes de anticorpos neutralizantes (Yan *et al*, 2012). Adenovírus recombinantes expressando as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 também foram utilizados na imunização de camundongos BALB/c, a produção de anticorpos foi mais intensa nos animais imunizados com AdSAG2, também foi possível detectar a ativação de células T CD8+ produtoras de IFN- γ específicas para os epítomos de SAG2 em níveis significativos e uma redução de 60 a 70% na quantidade de cistos cerebrais após o desafio com a cepa P-Br de *T. gondii* nestes animais (Caetano *et al*, 2006).

As sequências de SAG1, SAG2 e SAG3 foram clonadas no vetor de expressão pECTAC-K99 (Tauch *et al*, 2002), e para otimizar a apresentação das proteínas ao sistema imune foi adicionado a sua sequência nucleotídica o sinal de secreção da fosfolipase D PLD, visando a secreção da proteína recombinante codificada por *C. pseudotuberculosis*. Já foi demonstrado que para alguns antígenos a secreção ou a ligação à membrana bacteriana pode potencializar a resposta imune.

A capacidade de expressão da proteína SAG2 por *C. pseudotuberculosis* recombinantes foi confirmada por ensaios de Western-blotting, que demonstraram a correta expressão com a detecção da proteína recombinante no extrato de células bacterianas induzidas, no entanto, no extrato de proteínas

secretadas pela bactéria não foi possível detectar a secreção da proteína recombinante.

Um dos desafios apresentados no desenvolvimento de vacinas é a indução de uma resposta imune celular eficaz contra patógenos que não são eliminados somente por resposta humoral, como *T. gondii*. A utilização de protocolos iniciação/reforço é capaz de estimular uma resposta humoral efetiva, no entanto, a presença de imunidade pré-existente contra o vetor após a segunda dose pode diminuir a intensidade de sinais inflamatórios necessários para uma resposta celular, uma abordagem para este problema é a utilização de diferentes sistemas para a entrega do antígeno, em protocolo heterólogos (Woodland, 2004). Nos ensaios de imunização, além dos protocolos homólogos, também foram testados protocolos heterólogos com a administração de *C. pseudotuberculosis* e adenovírus recombinantes expressando SAG2 (Caetano *et al*, 2006).

As bactérias recombinantes foram utilizadas em ensaios de imunização de camundongos BALB/c, de acordo com o protocolo do tipo iniciação/reforço, em diferentes combinações, sendo capazes induzir a produção de IgG total anti-SAG2, detectados em ensaios de ELISA. O P_{tac} é um promotor constitutivo em *C. pseudotuberculosis*, entretanto, a expressão basal da proteína recombinante não foi suficiente para estimular uma resposta imune contra o antígeno e não foi possível detectar a produção de anticorpos nos Western Blotting realizados após a primeira e segunda dose da vacina. Diante deste resultado, resolvemos então induzir a bactéria e aplicar uma terceira dose, e os resultados foram satisfatórios, sendo possível observar um aumento significativo na produção de anticorpos contra SAG2 após a terceira dose de *C. pseudotuberculosis* recombinante.

Através do Ensaio de imunofluorescência foi possível observar a prevalência de anticorpos anti-SAG2 no soro dos animais imunizados com adenovírus e *C. pseudotuberculosis* expressando SAG2, que se ligaram diretamente aos antígenos presentes na membrana de taquizoítos fixados em lâminas, confirmando os resultados do ELISA. A especificidade do ensaio de ELISA

também foi confirmada em experimentos de Western-blotting, no qual os soros de todos os animais vacinados com as doses reforço de AdSAG2 e CpSAG2 reagiram com a proteína SAG2 presente no extrato total de taquizoítos.

Estes resultados indicam a correta expressão da proteína *in vivo* e a liberação satisfatória do antígeno para a estimulação de linfócitos B, mas é importante ressaltar que o soro de camundongos que receberam duas doses de AdSAG2 apresentaram maior título de anticorpos, os níveis obtidos foram maiores mesmo se comparado aos protocolos de vacinação heterólogo, diferentemente do que era esperado. Dois fatores podem ter contribuído para este resultado, primeiro porque os adenovírus são vetores virais que induzem altas taxas de expressão do transgene, enquanto as sucessivas deleções de genes em seu genoma diminuem a expressão das proteínas virais e conseqüentemente a resposta imune do hospedeiro contra o vetor. Segundo, porque os animais imunizados com CpSAG2 apresentaram manifestações clínicas como prostração, anorexia, pêlos eriçados e sinais de estresse (mutilação da cauda dos camundongos debilitados) após a segunda dose, comparados aos outros grupos, o que pode indicar uma maior patogenicidade deste vetor vivo em comparação com o adenovírus (vetor mas não replicativo). Ainda que comumente a presença de inflamação ajude no processo de indução de uma resposta imune, níveis excessivos de inflamação ou estresse podem ter efeitos adversos, limitando a correta apresentação antigênica porque outras células/fatores já estão sendo mobilizados até o local para limitar os efeitos deletérios dessa inflamação ou estresse no hospedeiro. O desenvolvimento de uma forte resposta imune contra epítomos dominantes do vetor para a contenção da infecção por *C. pseudotuberculosis* pode explicar um menor nível na produção de anticorpos específicos contra SAG2, inclusive em protocolos heterólogos.

Para reverter este quadro e otimizar o protocolo de vacinação com a Corynebactéria temos três possíveis soluções: a primeira seria a inoculação de quantidades menores da bactéria de cada vez, o que evitaria parte dos efeitos deletérios; a segunda seria a inoculação de bactérias com a expressão do transgene induzida e não basal, de forma que ainda com menos bactérias por

animal, consigamos apresentar ao sistema imune uma quantidade grande de antígeno heterólogo; e a terceira consistiria na mudança desta linhagem bacteriana por outras linhagens menos patogênicas, mas igualmente imunogênicas. Futuros estudos nestas direções já estão sendo planejados como continuação desta linha de pesquisa. A utilização de cepas mais atenuadas seria uma estratégia interessante para contornar a necessidade de se utilizar um protocolo de imunização com três doses de *C. pseudotuberculosis*, pois poderia diminuir a resposta imune gerada contra o vetor e aumentar a resposta direcionada contra a proteína recombinante. Recentemente, em ensaios de imunização com mutantes da linhagem T1 de *C. pseudotuberculosis*, camundongos imunizados com 10^6 UFC do mutante CP13 apresentaram altos níveis de proteção, com a indução de níveis significativos de IgG e IgG2a, caracterizando uma resposta imune do tipo Th1, responsável pela eliminação de patógenos intracelulares, como *C. pseudotuberculosis* (Dorella, 2009). Cp13 possui o gene de uma proteína, provavelmente ligada ao sistema de transporte de ferro, interrompido pela inserção do transposon TnFuZ e apresentou viabilidade celular bastante diminuída (Dorella, 2009) comparada ao controle com a linhagem T1. Devido à inserção do transposon este mutante possui resistência a canamicina, mas com a utilização de um marcador de seleção diferente para o plasmídeo pECTAC-K99 poderia também ser testado para a expressão de SAG1, SAG2 e SAG3, pois estes resultados e a habilidade em induzir uma resposta imune humoral e celular sugerem o seu potencial como vetor vacinal.

Devido a sua importância no desenvolvimento de uma resposta protetora contra *T. gondii*, um dos objetivos propostos neste trabalho seria a análise da resposta celular estimulada pela bactéria recombinante, mediante a produção de IFN- γ . No entanto, como este foi um experimento piloto e os animais ficaram debilitados com o protocolo de imunização proposto, achamos interessante testar outro protocolo posteriormente e repetir os experimentos antes de realizar as análises da resposta celular induzida e o desafio dos camundongos.

Os protocolos heterólogos podem ter sido eficientes no desenvolvimento de uma resposta celular protetora, mesmo apresentando uma resposta humoral

com níveis de anticorpos menores comparados a imunização homóloga com adenovírus, pois estes protocolos geram altos níveis de células T CD4+ e CD8+ com maior afinidade pelo antígeno e células T de memória (Woodland, 2004). A produção de IgGs contra SAG2 já é indicativa de uma resposta mediada por células, pois as citocinas secretadas por linfócitos T CD4+ estimulam a produção de anticorpos por linfócitos B (Gray *et al*, 2007). A análise do tipo de imunoglobulina produzida, IgG2C ou IgG1, também será importante para fornecer dados sobre o perfil de resposta ativado, a maior predominância de IgG2C esta associada a uma resposta inflamatória Th1, importante para proteção contra toxoplasmose. Outros testes de imunização de camundongos com as construções de *C. pseudotuberculosis* expressando as proteínas SAG1 e SAG3 também são de grande interesse, comparando-se assim, o nível de proteção gerada por estes três antígenos após o desafio com cepas virulentas de *T. gondii* dos camundongos imunizados.

Mesmo que novas drogas menos tóxicas e mais eficazes no controle da infecção crônica sejam desenvolvidas contra *T. gondii*, uma vacina profilática ainda é a melhor opção do ponto de vista financeiro, epidemiológico e social, diminuindo os custos em diagnósticos e tratamentos, as taxas de disseminação e os impactos sociais da doença, com a perda prematura de vidas (Bruna-Romero *et al*, 2012).

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os resultados deste estudo comprovam o potencial da linhagem atenuada T1 de *C. pseudotuberculosis* em expressar SAG2 e gerar uma resposta imune humoral contra o antígeno em camundongos, mas estudos adicionais sobre a resposta imune mediada por células induzida pelo vetor recombinante serão necessários. Podemos supor, que utilização de cepas mais atenuadas, a indução da bactéria *in vitro* anterior à imunização ou a utilização de um protocolo de imunização diferente, associado a adjuvantes, por exemplo, poderão melhorar consideravelmente estes resultados e futuramente esta bactéria recombinante poderá ser usada no desenvolvimento de uma vacina bivalente contra Toxoplasmose e Linfadenite Caseosa em caprinos e ovinos. Como já foi discutido, a tendência na geração de vacinas multigênicas torna esta bactéria um promissor vetor vacinal, podendo-se testar formulações com *C. pseudotuberculosis* codificando antígenos similares que afetam caprinos e ovinos, de forma a gerar uma proteção ampla nestes animais. Além disso, esta bactéria tem um amplo espectro de hospedeiros, além de caprinos e ovinos, esta enfermidade causa linfangite ulcerativa em equídeos e abscessos superficiais em bovinos, suínos, cervos, camelos e animais de laboratório, portanto, poderia também ser utilizada para a entrega de outros antígenos que afetem estes animais. *C. pseudotuberculosis* recombinantes codificando os antígenos de superfície de *T. gondii* também poderiam ser testadas em outros ruminantes infectados pelo parasita, por exemplo, ou em suínos, já que o consumo de sua carne é uma das maiores vias de transmissão de *T. gondii* ao homem, evitando a transmissão de cistos e perdas reprodutivas (abortos, doença clínica em neo-natos, etc.).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alexander, J, Jebbari, H, Bluethmann, H, Satoskar, A, Roberts, CW. (1996). Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. *Curr Top Microbiol Immunol.* 219, 183-195.
2. Alves, CJ, Vasconcellos, SA, Navarro, IT, Barbosa, CS. (1997). Avaliação dos níveis de aglutinina anti-Toxoplasma em soros de caprinos de cinco centros de criação no nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária.* 14, 75-77.
3. Alves, FSF, Pinheiro, RR. (1997). Linfadenite caseosa – Recomendações e Medidas Profiláticas. Embrapa – comunicado técnico. 33, 1-4.
4. Alves, FSF, Santiago, LB, Pinheiro, PR. (2007). Linfadenite Caseosa: o estado da arte. Sobral: Embrapa caprinos. 60p.
5. Amaral, VDO, Santos, FM, Rebouças, MM. (1978). Sobre a prevalência de anticorpos antitoxoplasma em soros de caprinos e ovinos procedente, respectivamente dos estados da Bahia e Rio Grande do Sul, BR. *O Biológico.* 44, 331-340.
6. Anderson, SE, Bautista, SC, Remington, JS. (1976). Specific antibody dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 26, 375.
7. Aramine, JJ, Stephen, C, Dubey, JP, Engelstoft, C, Schwant, JEH, Ribble,CS. (1999). Potential contamination of drinking water whit *Toxoplasma gondii* oocysts. *Epidemiology and infection.* 122, 305-315.
8. Araújo, FAP, Silva, NSR, Chaplin, EL, Santos, EB. (1984). Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de caprinos da região da Grande Porto Alegre, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS.* 12, 35-40.

9. Aristegui, J, Dal-Re, R, Diez-Delgado, J, Mares, J, Casanovas, JM, Garcia-Corbeira, P, et al. (2003). Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of a combined diphtheria, tetanus, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated polio (DTPa-HBV-IPV) vaccine, mixed with the *Haemophilus influenzae* type b (Hib) conjugate vaccine and administered as a single injection, with the DTPa-IPV/Hib and hepatitis B vaccines administered in two simultaneous injections to infants at 2, 4 and 6 months of age. *Vaccine*. 21, 3593-600.
10. Barioni, G, Tesoline, P, Beltrame, MAV, Pereira, LV, Gumieiro, MV. (2009). Soroprevalência da toxoplasmose em ovinos da raça santa Inês nos municípios da Grande Vitória - ES. *Ciência Animal Brasileira – Suplemento 1 – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*
11. Bastos, BL, Portela, RWD, Dorella, FA, Ribeiro, D, Seyffert, N, Castro, TLP, Miyoshi, A, Oliveira, SC, Meyer, R, Azevedo, V. (2012). *Corynebacterium pseudotuberculosis*: Immunological responses in animal models and zoonotic potential. *J Clin Cell Immunol* S4:005. doi:10.4172/2155-9899.S4-005.
12. Bayarri, S, Gracia, MJ, Lázaro, R, Pérez-Arquillué, C, Herrera, A (2012). *Toxoplasma gondii* in Meat and Food Safety Implications - A Review, Zoonosis, Jacob Lorenzo-Morales (Ed.). InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/zoonosis/toxoplasma-gondii-in-meat-and-food-safety-implications-a-review>
13. Biemans, R, Gregoire, D, Haumont, M, Bosseloir, A, Garcia, L, Jacquet, A, Dubeaux, C, Bollen, A. (1998). The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *J Biotechnol* 66, 137-146.

14. Bogdan, JR, Newlands-Monteith, CF, Ellis, JA. (1997). Nitric oxide production following in vitro stimulation of ovine pulmonary alveolar macrophages. *Vet Immunol Immunopathol.* 56, 299-310.
15. Bonametti, AM, Passos, JN, Silva, EMK, Bortoliero, AL. (1997). Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30, 21-25.
16. Bonenfant, C., Dimier-Poisson, I, Velge-Roussel, F, Buzoni-Gatel, D, Del Giudice, G, Rappuoli, R, Bout, D. (2001). Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 69, 1605-1612.
17. Braccini, GL, Chaplin, EL, Stobe, NS, Araújo, FAP, Santos, NR. (1992). Resultados de exames laboratoriais realizados no setor de protozoologia da faculdade de Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, nos anos de 1986 a 1990. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS.* 20, 134-149.
18. Brown, CC, Olander, HJ, Biberstein, EL, Morse, SM. (1986). Use of a toxoid vaccine to protect goats against intradermal challenge exposure to *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Am. J. Vet. Res.* 47, 1116–1119.
19. Bruna-Romero, O, Oliveira, DM, Andrade-Neto, VF. (2012). *Toxoplasmosis: Advances and Vaccine Perspectives, Current Topics in Tropical Medicine*, Alfonso J. Rodriguez-Morales (Ed.), ISBN: 978-953-51-0274-8, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/toxoplasmosis-advances-and-vaccine-perspectives>
20. Bulow, R, Boothroyd, JC. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 147, 3496-3500.
21. Buxton, D, Innes, EA. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology.* 110, S11-16.

22. Caetano, BC, Bruña-Romero, O, Fux, B, Mendes, EC, Penido, MLO, Gazzinelli, RT. (2006). Vaccination with replication-deficient recombinant adenovirus encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against Infection in Mice. *Human Gene Therapy*, 17, 415-426.
23. Caetano, Braulia Costa. (2005). Desenvolvimento de um modelo de vacinação contra *Toxoplasma gondii* empregando adenovirus recombinante. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 105 p.
24. Carneiro, ACAV. (2006). Soroepidemiologia da Toxoplasmose caprina e ovina no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Dissertação de Mestrado. 116p.
25. Casciotti, L, Ely, KH, Williams, ME, Khan, IA. (2002). CD8+-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* can be induced but not maintained in mice lacking conventional CD4+ T cells. *Infect. Immun.* 70, 434-43.
26. Cavalcante, ACR, Carneiro, M, Gouveia, AMG, Pinheiro, RR, Vitor, RWA. (2008). Risk factors for infection by *Toxoplasma gondii* in herds of goats in Ceará, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 60, 36-41.
27. Cesbron-Delauw, MF, Tomavo, S, Beauchamps, P, Fourmaux, MP, Camusn, D, Capron, A, Dubremetz, J. (1994). Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Biological Chemistry*. 269, 16217-16222.
28. Chiari, CA, Lima, JD, Antunes, CMF. (1985). Reação de imunofluorescência indireta e de Sabin-feldman na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de caprinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 37, 121-129.

29. Chiari, CA, Lima, JD, Lima, WS, Antunes, CMF. (1987). Soroepidemiologia da Toxoplasmose caprina em Minas Gerais, Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 39, 578-609.
30. Couper, KN, Nielsen, HV, Petersen, E, Roberts, F, Roberts, CW, Alexander J. (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.
31. Daubener, W, Mackenzie, C, Hadding U.(1995). Establishment of T-helper type 1- and T-helper type 2-like human *Toxoplasma* antigen-specific T-cell clone. Immunology. 86, 79-84.
32. Debard, N, Buzoni-Gatel, D, Bout, D. (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.
33. Desolme, B, Mevelec, MN, Buzoni-Gatel, D , Bout, D. (2000). Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. Vaccine. 18, 2512-2521.
34. Denkers, EY, Gazzinelli, RT. (1998). Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. Clinical Microbiology Reviews. 11, 569–588.
35. Dias, RAF, Freire, RF. (2005). Surtos de toxoplasmose em animais e seres humanos. Semina: Ciências Agrárias. 6, 239-248.
36. Dorella FA, Pacheco LGC, Oliveira SC, Miyoshi A, Azevedo V. (2006) *Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence. Vet. Res. 37, 201–218

37. Dorella, FA., Estevam, EM, Cardoso, PGC, Savassi, BM, Oliveira, SC, Azevedo, V, Miyoshi, A. (2006). An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 114, 298–303.
38. Dorella, FA, Estevam, EM, Pacheco, LGC, Guimarães, CT, Lana, UGP, Gomes, EA, Barsante, MM, Oliveira, SC, Meyer, R, Miyoshi, A, Azevedo, V. (2006). *In vivo* insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7368-7372.
39. Dorella, Fernanda Alves. (2009). Análise do potencial vacinal de linhagens recombinantes e selvagens inativadas de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 191p.
40. Dubey, JP. (1977). Toxoplasma, Hammondia, Besnitioidia, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of man and animals. In *Parasitic protozoa* (ed. J. P. Kreier). 101–237.
41. Dubey, JP. (1994) Zoonosis: Toxoplasmose. *J Am Vet Assoc*, 205, 1593-1598.
42. Dubey, JP, Thayer, DW. (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J Parasitol.* 80, 764-767.
43. Dubey, JP, Lindsay, DS, Speer, CA. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* 11, 267-99.
44. EFSA, European Food Safety Authority. (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and

monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *The EFSA Journal*. 583, 1-64.

45. Escopelli, KS. (2004). Avaliação sorológica de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em soros de ovinos da região da Grande Porto Alegre/RS, através das técnicas de Hemaglutinação indireta (HAI) e Imunofluorescência indireta (IFI). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. 86p.
46. Fang, R, Feng, H, Nie, H, Wang, L, Tu, P, Song, Q, Zhou, Y, Zhao, J. (2010). Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model. *Vaccine*. 28, 1803-1807.
47. Faria, EB, Gennari, SM, Pena, HFJ, Athayde, ACR, Silva, MLCR, Azevedo, SS. (2007). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. *Veterinary Parasitology*. 149, 126-129.
48. Fialho, CG, Teixeira, MC, Araújo, FAP. (2009). Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(1), 1-23.
49. Fligliuolo, LPC, Kasai, N, Ragoso, AMA, De Paula, VSO, Dias, RA, Sousa, SLP, Gennari, SM. (2004). Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 23, 161-166.
50. Fligliuolo, LPC, Rodrigues, A, Viana, R, Aguiar, D, Kasai, N, Gennari, SM. (2004). Prevalence of *Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Research*. 55, 29-32.
51. Figueiredo, JF, Cabral, DD, Silva, DAO. (1997). Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos da região de Uberlândia, Minas

- Gerai. In: XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Gramado, Brasil). p193.
52. Filisetti, D, Candolfi E. (2004). Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanità. 40, 71-80.
 53. Freire, RL, Giraldi, N, Vidotto, O, Navarro, IT. (1995). Levantamento soroepidemiológico da Toxoplasmose em ovinos na região de Londrina, Paraná. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 47, 609-612.
 54. Frenkel, JK, Taylor, DW. (1982). Toxoplasmosis in immunoglobulin M suppressed mice. J. Immunol. 38, 360.
 55. Fromont EG, Riche B, Rabilloud M. (2009). Toxoplasma seroprevalence in a rural population in France: Detection of a household effect. BMC Infect Dis. 9, 76.
 56. Garcia, JL, Navarro, IT, Ogawa, L, Oliveira, RC. (1999). Soroprevalência do *Toxoplasma gondii*, em suínos, bovinos, ovinos e equinos, e sua correlação com humanos, felinos e caninos, oriundos de propriedades rurais do norte do Paraná, Brasil. Ciência Rural. 29, 91-97.
 57. Gazzinelli, RT, Amichay, D, Sharton-Kersten, T, Grunwald, E, Farber, JM, Sher, A. (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.
 58. Gondim, LFP, Barbosa, HV, Ribeiro Filho, CHA, Saeki, H. (1999). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheep, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brasil. Veterinary Parasitology. 82, 273-276.
 59. Gray, D, Gray, M, Barr, T. (2007). Innate responses of B cells. Eur J Immunol. 37, 3304-3310.

60. Hard, GC. (1972). Examination by electron microscopy of the interaction between peritoneal phagocytes and *Corynebacterium ovis*. J. Med. Microbiol. 5, 483–491.
61. Harning, D, Spenter, J, Metsis, A, Vuust, J, and Petersen, E. (1996). Recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (P30) expressed in *Escherichia coli* is recognized by human *Toxoplasma*-specific immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies. Clin Diagn Lab Immunol. 3, 355-357.
62. Hodgson, ALM, Bird, P, Nisbet, IT. (1989). Cloning, Nucleotide Sequence, and Expression in *Escherichia coli* of the Phospholipase D gene from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Journal of Bacteriology. 172 (3), 1256-1261.
63. Hodgson, ALM, Tachedjian, M, Corner, LA, Radford, AJ.(1994) Protection of sheep against caseous lymphadenitis by use of a single oral dose of live recombinant *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infect. Immun. 62, 5275–5280.
64. Jolly, RD. (1966). Some observations on surface lipids of virulent and attenuated strains of *Corynebacterium ovis*. J. Appl. Bacteriol. 29, 189–196.
65. Jones, JL, Hanson, DL, Dworkin, MS, et al. (1999). Surveillance for AIDS-defining opportunistic illnesses, 1992–1997. MMWR CDC Surveill Summ. 48, 1–22
66. Jones, JL, Kruszon-Moran, D, Wilson, M, et al. (2001). *Toxoplasma gondii* infection in the United States: seroprevalence and risk factors. Am J Epidemiol. 154, 357–65.
67. Kang, H, Remington, JS, Suzuki, Y. (2000). Decreased Resistance of B Cell-Deficient Mice to Infection with *Toxoplasma gondii* Despite Unimpaired

- Expression of IFN-g, TNF-a, and Inducible Nitric Oxide Synthase1. J Immunol. 164, 2629-2634.
68. Kawazoe, U. (2005). *Toxoplasma gondii*. In: Neves, DP. Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu. 11, 494p.
69. Kotula, AW, Dubey, JP, Sharar, AK, Andrews, CD, Shen, SK, Lindsay DS. (1991). Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork. J Food Protect. 54, 687-690.
70. Kur, J, Holec-Gasior, L, Hiszczynska-Sawicka, E. (2009). Current status of toxoplasmosis vaccine development. Expert Rev Vaccines. 8, 791-808.
71. Lan, DT, Taniguchi, S, Makino, S, Shirahata, T, Nakane, A. (1998). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and gamma interferon in resistance to *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. Microbiol Immunol. 42, 863-870.
72. Lan, DTB, Makino, S, Shirahata, T, Yamada, M, Nakane, A. (1999). Tumor necrosis factor alpha and gamma interferon are required for the development of protective immunity to secondary *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in mice. J Vet Med Sci. 61, 1203-1208.
73. Larsson, LE. (1980). Prevalência de Toxoplasmose ovina determinada pela reação de sabin-feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. Revista de Saúde Pública. 14, 582-588.
74. Lau, YL, Fong, MY. (2008). *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. Exp Parasitol. 119, 373-378.
75. Lee, YH, Shin, DW, Lee, JH, Nam, HW, Ahn, MH. (2007). Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. Yonsei Med J. 48, 396-404.
76. Lekutis, C, Ferguson, DJP, Boothroyd, JC. (2000). *Toxoplasma gondii*:

identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp. Parasitol.* 96, 89-96.

77. Lekutis, C, Ferguson, DJP, Grigg, ME, Camps, M, Boothroyd, JC. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International Journal of Parasitology*.
78. Letscher-Bru, V, Villard, O, Risse, B, Zauke, M, Klein, JP, Kien TT. (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
79. Levine, ND, Corliss, JO, Cox, FEG, Deroux, G, Grain, J, Honingberg, BM, Leedale, GF, Loeblich, AR, Lom, J, Lynn, D, Merinfeld, EG, Page, FC, Poljansky, G, Sprague, V, Vavra, J, Wallace, FG. (1980). A newly revised classification of the protozoa. *The Journal of Protozoology.* 7, 37-58.
80. Lima, JT, Ahid, SMM, Barreto Junior, RA, Pena, HFJ, Dias, RA, Gennari, SM. (2008). Prevalência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum* em rebanhos caprinos do município de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Brazilian Journal Research Animal Science.* 45, 81-86.
81. Lim, FS, Han, HH, Jacquet, JM, Bock, HL. (2007). Primary vaccination of infants against hepatitis B can be completed using a combined hexavalent diphtheria-tetanus-acellular pertussis-hepatitis B-inactivated poliomyelitis-*Haemophilus influenzae* Type B Vaccine. *Ann Acad Med Singapore.* 36, 801-806.
82. Lindsay, DS, Blagburn, BL, Braund, KG. (1995). A review of *Toxoplasma gondii* and muscular Toxoplasmosis. *BAM.* 3, 255-260.
83. Liu, Q, Gao S, et al. (2008). A recombinant pseudorabies virus expressing TgSAG1 protects against challenge with the virulent *Toxoplasma gondii* RH strain and pseudorabies in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 10(12-13), 1355-1362.

84. Liu, Q, Shang, L, Jin, H, Wei, F, Zhu, XQ, Gao, H. (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.
85. Lourenco, EV, Bernardes, ES, Silva, NM, Mineo, JR, Panunto-Castelo, A, Roque-Barreira, MC. (2006). Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. Microbes Infect. 8, 1244-1251.
86. Lunden, A. (1995). Immune responses in sheep after immunization with *Toxoplasma gondii* antigens incorporated into iscoms. Vet Parasitol. 56, 23-35.
87. Machado, AV, Caetano, BC, et al. (2010). Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. Vaccine. 28(18), 3247-3256.
88. Machado, TMM, Lima, JD. (1987). Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos criados sobre diferentes formas de exploração no estado de Minas Gerais. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 39, 255-264.
89. Maciel, KP, Araújo, FAP. (2004). Inquérito sorológico para a detecção de anticorpos de *Toxoplasma gondii* em caprinos (*Capra hircus*) criados no município de Gravataí e Viamão, região da Grande Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Revista de Ciências Agroveterinárias. 3, 121-125.
90. Mainardi, RS, Stachissini, AVM, Langoni, H, Padovani, CR, Modolo, JR. (2000). Soroprevalência de *Toxoplasma gondii* em rebanhos caprinos no estado de São Paulo. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 9, 97-99.
91. Martins, JR, Hancock, R. (1991). Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos do RS: prevalência e implicações

- epidemiológicas. In: VII Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 1, 1-6.
92. Martins, JR, Hancock, R, Corrêa, BL, Caresér, VH. (1998). Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em ovinos no município de Livramento, RS: prevalência e implicações epidemiológicas. Pesquisa Agropecuária Gaúcha. 4, 27-29.
 93. Martin, V, Supanitsky, A, Echeverria, PC, Litwin, S, Tanos, T, De Roodt, AR, Guarnera, EA, Angel, SO. (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.
 94. McNamara, PJ, Bradley, GA, Songer, JG. (1994). Targeted mutagenesis of the phospholipase D results in decreased virulence of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, Mol. Microbiol. 12, 921–930.
 95. Meireles, LR. (2001). Estudo das fontes de infecção da Toxoplasmose humana em diferentes localidades do Estado de São Paulo. São Paulo: Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 141p.
 96. Mendes, EA, Caetano, BC, Penido, MLO, Bruna-Romero, O, Gazzinelli, RT. (2011). MyD88-dependent protective immunity elicited by adenovirus 5 expressing the surface antigen 1 from *Toxoplasma gondii* is mediated by CD8(+) T lymphocytes. Vaccine. 29(27), 4476-4484.
 97. Mendes, Érica Araújo (2011). Protocolo de vacinação utilizando vírus recombinantes expressando as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *Toxoplasma gondii*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. Tese de Doutorado. 99p.
 98. Merchant, N, Waldrop, J. (2012). The safety advantages of pentavalent vaccines. Nurse Pract. 37(4), 48-53.

99. MDIC - Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. (2010). Estudo de mercado externo de produtos derivados da ovinocaprinocultura. Passo Fundo: Meritos. 168p.
100. Ministério da Saúde. (2010). Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso. Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de vigilância epidemiológica. Brasil. 8, 444p.
101. Ministério da Saúde, 2012. Multivacinação com mudança no calendário de vacinação da criança. Secretária de Vigilância em Saúde. Governo da Bahia. Disponível em: [http://www.suvisa.saude.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/imunizacao/arquivo/2012/06/27/Informe%20t%C3%A9cnico%20vacina%20pentavalente%2026_06_2012%20\[revis%C3%A3o%20CEI\].pdf](http://www.suvisa.saude.ba.gov.br/sites/default/files/vigilancia_epidemiologica/imunizacao/arquivo/2012/06/27/Informe%20t%C3%A9cnico%20vacina%20pentavalente%2026_06_2012%20[revis%C3%A3o%20CEI].pdf)
102. Mishima, M, Xuan, X, Shioda, A, Omata, Y, Fujisaki, K, Nagasawa, H, Mikami, T. (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.
103. Moore, RJ, Rothel, L, Krywult, J, Radford, AJ, Lund, K, Hodgson, AL. (2000). Foreign gene expression in *C. pseudotuberculosis*: development of a live vaccine vector. Vaccine. 18, 487–497.
104. Moore, RJ, Stewart, DJ, Lund, K, Hodgson, AL. (2001). Vaccination against ovine footrot using a live bacterial vector to deliver basic protease antigen. FEMS Microbiol. Lett. 194, 193–196.
105. Moore, RJ, McKean, SC, Davies, JK. (2007). Expression of phospholipases D, the major factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death. Microbiology. 153, 2203-2211.
106. Moura, AB, Osaki, SC, Zulpo, DL, Marana, ERM. (2007). Ocorrência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* em suínos e ovinos abatidos no

município de Guarapuava, PR, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 16, 54-56.

107. Moura-Costa, Lília Ferreira. (2007). Avaliação da resposta imunológica de caprinos da raça Canindé a diferentes antígenos de *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Salvador: Universidade Federal da Bahia. Tese de Doutorado. 141p.
108. Muckle, CA, Gyles, CL. (1982). Characterization of strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Can. J. Comp. Med. 46, 206–208.
109. Nagel, SD, Boothroyd, JC. (1989). The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. J. Biol. Chem. 264, 5569-5574.
110. Nielsen, HV, Lauemoller, SL, Christiansen. L, Buus. S, Fomsgaard. A, Petersen. E. (1999). Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. Infect Immun. 67, 6358-6363.
111. Ogawa, L, Navarro, IT, Freire, RL, Oliveira, RC, Vidotto, O. (2003). Occurrence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in sheep. Semina: Ciências Agrárias. 24, 57-62.
112. Oliveira-Sequeira, TCL, Amarante, AFT, Salata, E, Sogayar, R. (1993). Serological survey for *Toxoplasma gondii* infection in sheep in São Paulo State, Brazil. Veterinária e Zootecnia. 5, 121-125.
113. Parker, SJ, Roberts, CW, Alexander J. (1991). CD8+ T cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clinical and Exp. Immunol. 84, 207–212.
114. Pashine, A, Valiante, NM, Ulme, JB. (2005). Targeting the innate immune response with improve vaccine adjuvantes. Nat.Med. 11(4), 63-68.

115. Paton, MW. (1993). Control of cheesy gland in sheep. *Wes. Aut. J. Agric.* 34, 31-37.
116. Pavia, CS. (1986). Protection against experimental Toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.* 137, 2985-2990.
117. Pépin, M, Pittet, JC, Olivier, M, Gohin, I (1994) Cellular composition of *Corynebacterium pseudotuberculosis* pyogranulomas in sheep. *J Leukoc Biol.* 56, 666-670.
118. Pépin, M, Seow, HF, Corner, L, Rothel, JS, Hodgson, AL, et al. (1997) Cytokine gene expression in sheep following experimental infection with various strains of *Corynebacterium pseudotuberculosis* differing in virulence. *Vet Res* 28, 149-163.
119. Petersen, E, Nielsen, HV, Christiansen, L, Spenter, J. (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.
120. Poisson, Isabelle Dimier. (2012). Major role for CD8+T cells in the protection against *Toxoplasma gondii* following dendritic cell vaccination, *Zoonosis*, Jacob Lorenzo-Morales (Ed.). InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/zoonosis/major-role-for-cd8-t-cells-in-the-protection-against-toxoplasma-gondii-following-dendritic-cell-vacc>
121. Prescott, JF, Menzies, PI, Hwang, YT. (2002). An interferon gamma assay for diagnosis of *Corynebacteria pseudotuberculosis* infection in adult sheep from a research flock. *Vet. Microbiolol.* 88, 287-297.
122. Qu, D, Wang, S, et al. (2008). Protective effect of a DNA vaccine delivered in attenuated *Salmonella typhimurium* against *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Vaccine.* 26(35), 4541-4548.

123. Romanelli, PP, Freire, RL, Vidotto, O, Marana, ERM, Ogawa, L, De Paula, VSO, Garcia, JL, Navarro, IT. (2007). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Parana State, Brazil. *Research in Veterinary Science*. 82, 202-207.
124. Rosa, C, Langoni, H, Silva, AV, Marinho, M, Listoni, FJP. (1997). Levantamento de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em soros de ovinos no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 6, 334-337.
125. Ruiz, JC, D'Afonseca, V, Silva, A, Ali, A, Pinto, AC, et al. (2011). Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains. *PLoS ONE* 6, e18551.
126. Sacks, JJ, Roberto, RR, Brooks, NF. (1982). Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA*. 248, 1728-32.
127. Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 1.ed. New York: Cold spring Harbor laboratory press, 1989.
128. Schreiber, RD, Feldman, HA. (1980). Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.* 141, 366.
129. Sella, MZ, Navarro, IT, Vidotto, O, Freire, RL, Shida, PN. (1994). Epidemiologia da Toxoplasmose caprina: Levantamento Sorológico do *Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros na micro-região de Londrina, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 3, 13-16.
130. Serra-Freire, NM, Norberg, NA, Gazeta, GS. (1994). Toxoplasmose caprina no Rio de Janeiro. *Parasitologia Al Dia*. 18, 77-81.
131. Shang, L, Liu, Q, et al. (2009). Protection in mice immunized with a heterologous primeboost regime using DNA and recombinant pseudorabies

expressing TgSAG1 against *Toxoplasma gondii* challenge. Vaccine. 27(21), 2741-2745.

132. Silva, AV, Cutolo, AA, Langoni, H. (2002). Comparação da reação de imunofluorescência indireta e método de aglutinação direta na detecção de anticorpos anti-Toxoplasma em soros de ovinos, caprinos, caninos e felinos. Arquivo do Instituto Biológico. 69, 7-11.
133. Silva, AV, Cunha, ELP, Meireles, LR. (2003). Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. Ciência Rural. 33, 115-119.
134. Silva, AV, Langoni, H. (2001). The detection of *Toxoplasma gondii* by comparing cytology, histopathology, bioassay in mice and the polymerase chain reaction (PCR). Veterinary Parasitology. 97, 191-198.
135. Silva, KLMV, Rue, ML. (2006). Possibilidade de transmissão congênita de *Toxoplasma gondii* em ovinos através de seguimento sorológico no município de Rosário do Sul, RS, Brasil. Ciência Rural. 36, 892-897.
136. Silva, NRS, Costa, AJ, Souza, SMG. (1980). Prevalência de anticorpos antitoxoplásmicos em ovinos, determinada pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), no município de São Lourenço do Sul, RS. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. 8, 89-92.
137. Silva, NSR, Costa, AJ, Chaplin, EL, Souza, SMG. (1981). Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em soros de ovinos, pela reação de imunofluorescência indireta (IFI), na região de Guaíba, RS. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS. 9, 101-104.
138. Sousa, OE, Sanez, RE, Frenkel, JK. (1988). Toxoplasmosis in Panama: a 10-year study. Am J Trop Med Hyg. 38, 315-22.
139. Suzuki, Y, Kobayashi, A. (1985). Requirement for calcium ions in antibody dependent complement-mediated cytolysis of *Toxoplasma gondii*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser A. 259, 426-431.

140. Suzuki, Y, Wang, X, Jortner, BS, Payne, L, Ni, Y, Michie, SA, Xu, B, Kudo, T, Perkins, S. (2010). Removal of *Toxoplasma gondii* cysts from the brain by perforin-mediated activity of CD8+ T cells. *Am J Pathol.* 176,1607-1613.
141. Tashjian, JJ, Campbell, SG. (1983). Interaction between caprine macrophages and *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.* 44, 690–693.
142. Tauch, A, Kirchner, O, Löffler, B, Gotker, S, Puhler, A, Kalinowski, J. (2002). Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtherie* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology.* 45, 362-367.
143. Tenter, AM, Heckeroth, AR, Weiss, LM. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30, 1217-1258.
144. Ueno, TEH. (2005). Prevalência das infecções por *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* em matrizes e reprodutores ovinos de rebanhos comerciais do Distrito Federal, Brasil. São Paulo: Universidade de São Paulo. Dissertação de Mestrado. 107p.
145. Ulon, SN. (1996). Inquérito sorológico da infecção toxoplásmica em ovinos abatidos em Santa Maria, RS, e sua repercussão na saúde pública. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria. Dissertação de Mestrado. 78p.
146. Uzêda, RS, Fernandez, SY, Jesus, EEV, Pinheiro, AM, Ayres, MCC, Spinola, S, Barbosa Junior, HV, Almeida, MAO. (2004). Fatores relacionados a presença de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* em caprinos leiteiros do Estado da Bahia. *Revista Brasileira de Saúde Produção Animal.* 5, 1-8.
147. Walker, J, Jackson, H, Brandon, MR, Meeusen, E. (1991) Lymphocyte subpopulations in pyogranulomas of caseous lymphadenitis. *Clin Exp Immunol.* 86, 13-18.

148. Wang, H, He, S, Yao, Y, Cong, H, Zhao, H, Li, T, Zhu, XQ. (2009). *Toxoplasma gondii*: protective effect of an intranasal SAG1 and MIC4 DNA vaccine in mice. *Exp Parasitol*. 122, 226-232.
149. Weiss, LM, Dubey, JP. (2009). Toxoplasmosis: a history of clinical observations. *Int J Parasitol*. 39(8), 895-901.
150. Williamson, LH. (2001). Caseous lymphadenitis in small ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim*. 17, 359–371.
151. Wilson, CB, Tsai, V, Remington, JS. (1980). Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. *J. Exp. Med*. 151, 328-346.
152. Woodland, David L. (2004). Jump-starting the immune system: prime–boosting comes of age. *Trends in Immunology*. 25, 98-104.
153. Xiong, C, Grieve, RB, Kim, K, Boothroyd, JC. (1993). Expression of *Toxoplasma gondii* P30 as fusions with glutathione S-transferase in animal cells by Sindbis recombinant virus. *Mol Biochem Parasitol*. 61, 143-148
154. Yan, H, Yan, H, Tao, Y, Chen, H, Li, G, Gong, W, Jiao, H, Tian, F, Ji, M. (2012). Application and expression of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) and rhoptry protein 2 (ROP2) from recombinant *Escherichia coli* strain. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 106, 356-362.
155. Zaki, MM. (1976). Relation between the toxogenicity and pyogenicity of *Corynebacterium ovis* in experimentally infects mice. *Res Vet Sci*. 20, 197-200.
156. Zhang, J, He, S, Jiang, H, Yang, T, Cong, H, Zhou, H, Gu, Q, Li, Y, Zhao Q. (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.

157. Zepp, F, Knuf, M, Heininger, U, Jahn, K, Collard, A, Habermehl, P, et al. (2004). Safety, reactogenicity and immunogenicity of a combined hexavalent tetanus, diphtheria, acellular pertussis, hepatitis B, inactivated poliovirus vaccine and *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine, for primary immunization of infants. *Vaccine*. 22, 2226-33.
158. Zonta, JC, Araújo, FAP, Stobbe, NS, Chaplin, EL, Silva, NRS. (1987). Prevalência de anticorpos toxoplásmicos em ovinos de Marau e Uruguaiana, RS. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*. 15/16, 59-61.