

ÉRICA ARAÚJO MENDES

Dissertação de Mestrado

**Estudo da imunogenicidade das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de
Toxoplasma gondii expressas em vírus recombinantes e mapeamento de seus
epítomos protetores**

Belo Horizonte – MG
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
2006

ÉRICA ARAÚJO MENDES

Dissertação de Mestrado

**Estudo da imunogenicidade das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de
Toxoplasma gondii expressas em vírus recombinantes e mapeamento de seus
epítomos protetores**

Belo Horizonte – MG

Agosto/2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Estudo da imunogenicidade das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3
de *Toxoplasma gondii* expressas em vírus recombinantes e
mapeamento de seus epítomos protetores**

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

Aluna: Érica Araújo Mendes

Orientador: Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli (Dep. Bioquímica e Imunologia/UFMG)

Co-orientador: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (Dep. Microbiologia/UFMG)

Co-orientador: Prof. Oscar Bruña Romero (Dep. Microbiologia/UFMG)

Belo Horizonte – MG

Agosto/2006

“Os limites da ciência contemporânea são uma espécie de pessoa de duas caras. No momento em que se estabelecem os limites de um determinado universo de discurso, abrem-se novas possibilidades para a construção de novos universos...”

Ceruti, M.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, minha luz guia do dia-a-dia.

Ao Prof. Ricardo Gazzinelli pelo acolhimento em seu laboratório.

Ao Prof. Oscar Bruña Romero por ter me dado a oportunidade de trabalhar com o mundo das ciências sob um novo ponto de vista.

Ao Prof. Flávio Guimarães da Fonseca pelo auxílio e ensinamentos durante o processo de construção dos MVAs recombinantes.

Aos colegas do laboratório de Imunoparasitologia do ICB/UFMG, Mirinha, Míriam Dutra, Policarpo, Tatiana, Warrisson, Alexandre, Rafael, Roberta, Ricardo, Marcolão, Meire, Eneida, Soraia, Fernando, pelos imprecindíveis auxílios em vários momentos.

A Dra. Braúlia Caetano e Daniella Resende por terem me acolhido no laboratório de Imunoparasitologia. Brau, muito obrigada pelos ensinamentos e por toda a sua disponibilidade em me auxiliar durante a execução das técnicas.

Aos colegas do laboratório de Agentes Recombinantes do ICB/UFMG, Cristina, Leoneide, Rafael, Priscila, Tânia por tornarem o ambiente de trabalho bem discontraído.

Aos colegas do laboratório de Imunopatologia do Centro de Pesquisas Renné Rachou pela convivência.

A Daniela Peralva, técnica do laboratório de Imunologia do Centro de Pesquisas Renné Rachou, pelo auxílio com as culturas celulares.

Aos colegas da Pós-graduação por compartilharem comigo essa fase de aprendizado.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG e Centro de Pesquisas Renné Rachou.

Aos amigos dos bailes da vida pela amizade e bons momentos de descontração.

Aos amigos Biólogos da turma 2004, agora mais ocupados do que nunca, mas sempre dispostos a compartilhar pedacinhos de suas vidas.

A minha família, pela torcida e apoio em todos os momentos. Obrigada pela confiança.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
1.1 - A toxoplasmose: aspectos clínicos e epidemiológicos.....	12
1.2 - Toxoplasmose congênita	13
1.3 - Ciclo de vida e prevenção e controle da toxoplasmose	15
1.4 - Resposta imune contra <i>T. gondii</i>	18
1.5 - Antígenos de superfície e vacinas contra <i>T. gondii</i>	20
1.6 - Adenovírus como vetores vacinais	23
1.7 - Poxvírus como vetores vacinais.....	27
1.8 - Genoma e biologia dos poxvírus	29
2. OBJETIVOS	32
2.1 - Objetivo geral.....	32
2.2 - Objetivos específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 - Animais	33
3.2 - Cepas de <i>T. gondii</i>	33
3.3 - Linhagens celulares	34
3.4 - Adenovírus recombinantes	34
3.5 - Experimentos de vacinação e desafio	36
3.6 - “Western-Blot”	37
3.7 - Peptídeos Sintéticos	38
3.8 - ELISPOT	38
3.9 - Geração dos MVA recombinantes com genes <i>SAG1</i> , <i>SAG2</i> e <i>SAG3</i>	39
4. RESULTADOS	45
4.1 - Resposta imune humoral dos camundongos vacinados com adenovírus recombinantes AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3.	45
4.2 - Predição dos possíveis epítomos MHC1 restritos nas proteínas <i>SAG1</i> , <i>SAG2</i> e <i>SAG3</i> de <i>T. gondii</i>	47

4.3 - Resposta imune celular nos camundongos vacinados com adenovirus recombinantes AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3.	47
4.4 - Desafio dos animais vacinados com a cepa ME49 de <i>T. gondii</i>	51
4.5 - Geraçao dos MVA recombinates com genes SAG1 e SAG2 de <i>T. gondii</i>	53
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8. ANEXOS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad: adenovírus

CAR: receptor de Coxsackivírus e Adenovírus

CEF: fibroblastos de embrião de galinha

CTL: linfócitos T citolíticos

F3: fração antigênica de membrana de taquizoitos de *T. gondii*

HIV: síndrome da imunodeficiência humana adquirida

IFN- γ : interferon gama

IL-1/2/4/5/6/10/12: interleucinas 1/2/4/5/6/10/12

m.o.i: multiplicidade de infecção

MVA: modified Vaccinia vírus Ankara

NK: células "Natural Killer"

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

SAGs: antígenos de superfície de *T. gondii*

TCD4⁺: linfócitos TCD4⁺

TCD8⁺: linfócitos TCD8⁺

TGF- β : fator de crescimento tumoral β

Th1: linfócitos T helper produtores de citocinas pró-inflamatórias

TLA: extrato total de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*

TNF: fator de necrose tumoral

RESUMO

As proteínas de superfície (SAGs) presentes em taquizoitos de *T. gondii* encontram-se envolvidas na ativação de resposta imune contra o parasita. No presente estudo nós avaliamos a capacidade de adenovírus recombinantes codificando os genes de SAG1, SAG2 e SAG3 em induzir a ativação de resposta imune humoral e celular, além de imunidade protetora contra cepa cistogênica do parasita. A ativação de resposta imune humoral foi avaliada em camundongos C57BL/6 vacinados com adenovírus recombinantes (AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCtrl) e a resposta imune celular foi avaliada tanto em BALB/c (resistentes) quanto em C57BL/6 (susceptíveis) à cepa ME49 de *T. gondii*. Peptídeos correspondentes a epítomos MHC-I-restritos, específicos para os haplótipos H2-D^b e H2-L^d, foram determinados para cada proteína, através da análise de seqüência no programa SYFPEITHI. Tais peptídeos foram produzidos por meio de síntese em fase sólida, de acordo com a metodologia Fmoc. Camundongos BALB/c e C57BL/6 receberam duas doses de 10⁹ p.f.u. de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL, com intervalo de seis semanas. Amostras de soro obtidas dos animais C57BL/6 quatro semanas após a última imunização foram submetidas a “Western-blot” contra lisado total de taquizoítos (TLA). Os resultados demonstraram que a imunização gerou anticorpos IgG específicos contra as três proteínas nesses animais. Duas a quatro semanas após a última imunização, esplenócitos de ambas as linhagens de camundongos foram coletados para ensaios de ELISPOT. Os esplenócitos foram reestimulados “in vitro” com os peptídeos sintéticos identificados no programa SYFPEITHI. A imunização com AdSAG1 levou a ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ em ambas as linhagens. Estas células se mostraram responsivas a um epítomo previamente identificado na seqüência da proteína SAG1. Camundongos C57BL/6 vacinados foram desafiados com a cepa ME49 duas semanas após o término do protocolo de imunização. Consistente com a capacidade de induzir ativação de resposta imune celular foi observada proteção parcial em camundongos C57BL/6 vacinados com AdSAG1, os quais apresentaram maior taxa de sobrevivência e menor número de cistos cerebrais se comparado ao grupo controle.

Palavras chave: *T. gondii*, vetores virais recombinantes, vacinas

ABSTRACT

The tachyzoite SAG proteins are involved in activation of protective immune responses against the parasite *T. gondii* in infected individuals. In the present study, we have evaluated the activation of humoral and cellular immunity in mice vaccinated with recombinant adenoviruses coding for SAG1, SAG2 or SAG3 from *T. gondii*. Peptides corresponding to MHC I-binding epitopes, specific for the H2-D^b and H2-L^d haplotype, were predicted in SAG1, SAG2 and SAG3 proteins by sequence analysis on SYFPEITHI software. Those peptides were produced by solid-phase synthesis employing the Fmoc methodology. BALB/c and C57BL/6 mice received two 10⁹ p.f.u. doses of AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 or AdCTRL, six weeks apart. Serum samples obtained from C57BL/6, four weeks after the last immunization, were submitted to Western-blot assays, against total tachyzoite lysate (TLA). Two to four weeks after the last immunization, spleens from both mice lineages were collected for ELISPOT assays. Splenocytes were stimulated “in vitro” with synthetic peptides corresponding to epitopes predicted on SYFPEITHI software. Vaccinated mice were challenged with an oral dose ME49 strain two weeks after the last immunization. Results show that immunization elicited specific IgG antibodies against the three proteins in C57BL/6 mice. Also, immunization with AdSAG1 induced specific activation of IFN- γ producing CD8⁺ T cells in both mice. Those cells showed to be responsive to an epitope predicted on SAG1 sequence. The same level of activation was not observed in mice from the AdSAG2, AdSAG3 or AdCTRL groups. Further, the immune responses observed in AdSAG1-vaccinated mice were related to protection against an oral challenge with the ME49 strain. It was observed higher survival rate and less cysts numbers in that group. These results indicate that vaccination with recombinant viruses is feasible approach for development of anti-toxoplasma vaccines.

Key words: *T. gondii*, recombinant viral vectors, vaccines

1. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa. Esse protozoário encontra-se distribuído mundialmente, sendo capaz de infectar mais de 30 espécies de aves e 300 espécies de mamíferos, incluindo o homem (Dardé, 2004). Estima-se que aproximadamente um terço da população global esteja cronicamente infectada pelo mesmo (Tenter *et al.*, 2000). Apesar da alta taxa de infecção dentro da população humana, a manifestação de sinais clínicos da doença é um fato raro em indivíduos saudáveis, somente ocorrendo com maior frequência em indivíduos de grupos de risco especiais, destacando-se nesses, pacientes com AIDS e indivíduos imunossuprimidos (Switaj *et al.*, 2005). Devido ao fato do tratamento desses pacientes ser difícil, já que as drogas disponíveis são tóxicas, e pelo fato da reativação da infecção latente ocorrer rapidamente, o desenvolvimento de novas drogas ou de uma vacina é uma alternativa bastante atraente.

Além do aspecto médico, a doença também se destaca como uma parasitose veterinária importante. Anualmente os rebanhos de suínos e ovinos sofrem perdas significativas devido a mortes neonatais e abortamentos. Ainda mais, quando ingeridas cruas ou mal passadas, vísceras e carne de animais domésticos contaminadas pelo parasita são uma notável fonte de infecção, tanto para humanos quanto para outros carnívoros (Dubey *et al.*, 1998).

1.1 - A toxoplasmose: aspectos clínicos e epidemiológicos

A toxoplasmose é uma das zoonoses mais comuns em várias regiões do mundo. A soroprevalência da doença dentre humanos varia muito entre diferentes países, entre diferentes áreas geográficas dentro do mesmo país e entre diversos grupos étnicos da mesma área (Tenter *et al.*, 2000). No Brasil, a prevalência de infecção por *T. gondii* varia de 50 a 80%, com as taxas mais altas ocorrendo em alguns estados do Norte e do Sul, e os valores mais baixos em estados do Sudeste (Orefice & Bonfioli, 2000). Em um estudo epidemiológico de infecção realizado em doadores de sangue de Recife demonstrou um percentual de soropositivos de 79,0% para os indivíduos do sexo masculino e 63,4% para os de sexo feminino

dentre um grupo de 160 indivíduos, sendo 119 homens e 41 mulheres. Esta soropositividade aumentou com a idade, variando de 18,2% para os indivíduos menores de 20 anos até 92,6% para aqueles entre 40 e 50 anos de idade. Para as mulheres na idade fértil (18-40 anos) foi encontrada prevalência de 51,6% (Coelho *et al.*, 2003). Em outro estudo conduzido com 2.126 mulheres com idade entre 12 e 48 anos no estado do Rio Grande do Sul observou-se uma prevalência de 74,5% de soropositividade dentre as gestantes (n=1583), sendo que 78% das mulheres residiam na zona rural e 71,3% na zona urbana (Spaldin, *et al.*, 2005).

Apesar da alta freqüência de infecção dentro das populações humanas, a ocorrência de sinais clínicos de toxoplasmose é baixa, já que a infecção adquirida (pós-natal) em indivíduos imunologicamente competentes leva ao desenvolvimento de uma forte resposta imune celular, a qual resulta no controle eficaz do parasita. Infecções sintomáticas usualmente provocam linfadenite, a qual pode estar associada com febre, fadiga, fraqueza, dor de cabeça (Dubey, 2004).

A toxoplasmose adquirida tem maior impacto para indivíduos com comprometimento do sistema imune. Nesses indivíduos, quadros de imunossupressão e imunodeficiência moderadas ou extremas podem levar a reativação da infecção latente. Casos dessa reativação em pacientes transplantados têm se tornado cada vez mais freqüentes, sendo a fonte de reinfecção tecidos do doador ou tecidos do próprio paciente, nos quais se encontram cistos dormentes (De Medeiros *et al.*, 2001). Em adição, a toxoplasmose tem emergido nas duas últimas décadas como uma das mais comuns infecções oportunistas associadas com a AIDS, sendo a causa mais comum de morte dentre esses pacientes devido ao quadro de encefalite gerado pela doença (Dubey, 2004; Luft & Remington, 1992). Estima-se que 40% dos pacientes aidéticos desenvolvem encefalite por toxoplasma, sendo que 10 a 30% morrem (Ferreira & Borges, 2002).

1.2 - Toxoplasmose congênita

As maiores complicações da toxoplasmose decorrem da infecção congênita ou pré-natal. A transmissão transplacentária ocorre durante a fase aguda da primoinfecção materna. Se a infecção primária se der antes da gravidez, a imunidade adquirida impede a transmissão do parasita ao feto em exposições

subseqüentes. No entanto, se a gestante sofre um comprometimento da função imune, pode infectar o feto (Tenter *et al.*, 2000). A incidência de infecção do feto varia conforme a virulência da cepa e o período no qual a gestante entra em contato com o parasita. As infecções mais graves decorrem quando do contato da mãe com o toxoplasma nos dois primeiros trimestres da gestação. Nesse caso, pode ocorrer abortamento, morte do feto no útero ou anormalidades fetais que reduzem significativamente a qualidade de vida da criança que sobrevive (Montoya & Liesenfeld, 2004). As manifestações clássicas nas crianças que sobrevivem ao contato com o parasita no início da idade fetal incluem encefalite, retinocoroidite, calcificações intracranianas, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia. Essa última é uma lesão menos comum, mas é a mais dramática lesão causada pela toxoplasmose, sendo essa condição exclusiva de humanos (Dubey, 2004; Kravetz & Federman, 2005). Quando o feto se infecta nos estágios finais da gravidez, os efeitos da doença são menos graves, com a maioria dos neonatos sendo assintomáticos ao nascimento. Entretanto, essas crianças podem desenvolver problemas como estrabismo, cegueira, surdez, deficiências psico-motoras, convulsões e retardamento no desenvolvimento mental (Rey, 1991).

Como as infecções primárias de pacientes imunocompetentes geralmente são assintomáticas, o diagnóstico de infecção materna é difícil. Em gestantes assintomáticas o único sinal de infecção é a soroconversão via detecção de IgG ou IgM através de testes de imunofluorescência, ELISA, reação de aglutinação por imunoabsorção (ISAGA-IgM). Se os resultados indicarem infecção materna aguda, o estabelecimento do envolvimento fetal torna-se crítico. A avaliação ultra-sonográfica do feto, apesar de ser o ponto de partida, pode diagnosticar tardiamente a infecção. O ideal, nesse caso, é proceder-se à amniocintese para realização da reação de amplificação gênica em cadeia catalisada pela polimerase (PCR) para detecção do DNA do parasita (Montoya & Liesenfeld, 2004; Mussi-Pinhata & Yamamoto, 1999). O tratamento da gestante é realizado com espiramicina ou, se a transmissão para o feto for confirmada, com pirimetamina e sulfadiazina (Couvreur *et al.*, 1993).

1.3 - Ciclo de vida do parasita e prevenção e controle da toxoplasmose

O ciclo biológico do *T. gondii* caracteriza-se por ser heteroxeno facultativo. Apesar da ampla diversidade de hospedeiros do *T. gondii*, apenas os felídeos desenvolvem a fase sexuada do ciclo, o que leva à descrição desses mamíferos como hospedeiros definitivos do agente. O homem e outros mamíferos, juntamente com as aves, são considerados hospedeiros intermediários, pois nesses ocorre somente desenvolvimento do ciclo assexuado do parasita (Kawazoe, 2002).

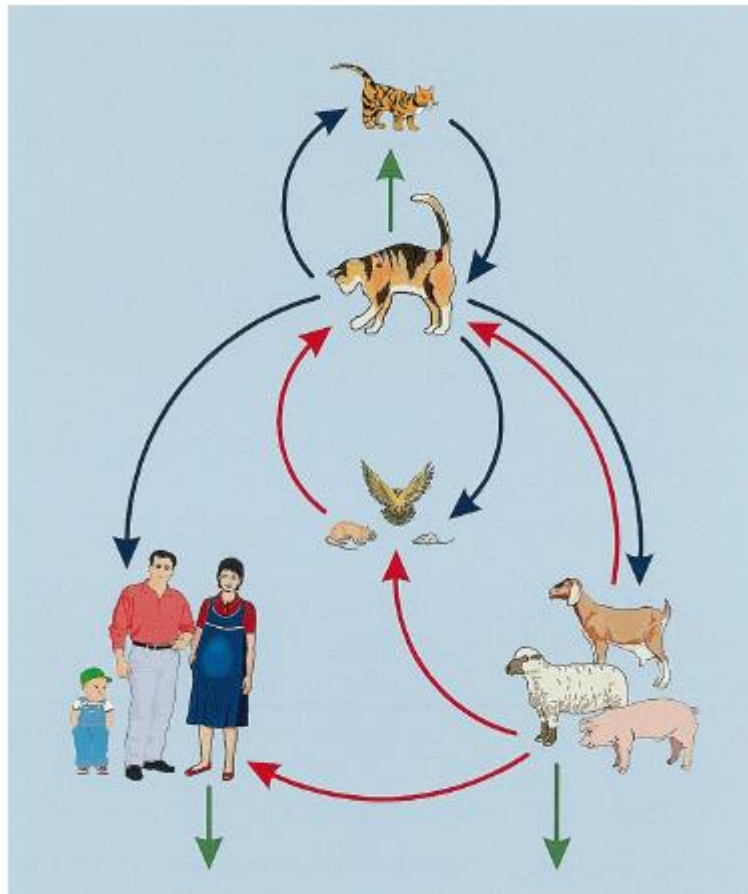
Nos hospedeiros intermediários, a infecção pelo *T. gondii* é seguida de uma rápida multiplicação de taquizoítos por endodiogenia. Os taquizoítos podem infectar qualquer célula nucleada e são altamente patogênicos, levando a lesões teciduais e desenvolvimento da toxoplasmose aguda. A multiplicação dos taquizoítos é controlada pelo desenvolvimento de uma resposta imune protetora eficaz e seguida da diferenciação do parasita em bradizoíto, resultando na formação de cistos teciduais e estabelecimento da fase crônica da doença (Dubey *et al.*, 1998; Tenter *et al.*, 2000).

Nos hospedeiros definitivos, felídeos jovens não imunes ao parasita, ocorre o desenvolvimento da fase sexuada do ciclo. Ela começa com a infecção de células epiteliais do intestino delgado por taquizoítos, esporozoítos ou bradizoítos. A multiplicação desses estágios dá origem aos merozoítos, que ficam contidos dentro de estruturas chamadas de esquizontes. Após alguns ciclos de replicação, os merozoítos se diferenciam em gametas masculinos (microgametas) e femininos (macrogametas). A fertilização, a formação do zigoto e a organização da parede do oocisto ocorrem no epitélio intestinal. A esporulação do oocisto ocorre após a liberação das fezes no meio ambiente, sob condições apropriadas de temperatura e umidade. Uma vez esporulados, os oocistos permanecem no ambiente como fonte de infecção para outros indivíduos (Dubey *et al.*, 1998).

A infecção pós-natal em humanos ocorre essencialmente de três maneiras (figura 1): (I) através da ingestão acidental de oocistos liberados nas fezes de felinos domésticos e selvagens presentes em água e alimentos contaminados; (II) através da ingestão de cistos presentes em carne mal cozida - o cozimento em temperaturas superiores a 67°C ou o congelamento em temperaturas inferiores a -13°C mata os bradizoítos presentes nos cistos e elimina o risco desse modo de contaminação - e

(III) através de transplantes ou transfusões sanguíneas, sendo essas vias menos comuns de ocorrerem (Dubey, 1996; Kravetz & Federman, 2005).

Atualmente, a prevenção e o controle da toxoplasmose adquirida dependem de medidas de vigilância epidemiológica e manejo sanitário, os quais levam à identificação e eliminação das fontes de infecção. Dentre os procedimentos que podem ser adotados para se evitar o risco de contaminação pode-se citar: instruir a população a não se alimentar de carne crua ou mal cozida; controle da população de gatos vadios; exame pré-natal e tratamento de todas as gestantes que sofrerem soroconversão (Kawazoe, 2002). Essas ações visam principalmente diminuir a exposição dos grupos de risco, como o das mulheres em idade fértil e o dos pacientes imunocomprometidos.



- Transmissão horizontal através de oocistos
- Transmissão vertical via taquizoítos
- Transmissão horizontal via cistos teciduais

Figura 1 - Principais formas de transmissão da toxoplasmose. Adaptado de Tenter *et al.*, 2000

As medidas para prevenção da infecção pelo *T. gondii* não têm sido suficientes para evitar a ocorrência da toxoplasmose. Além do mais, não existe um medicamento eficaz contra a fase crônica da doença, já que os medicamentos disponíveis são capazes de atuar somente contra as formas proliferativas do parasita. Outros fatores também têm restringido a quantidade de drogas disponíveis para o tratamento, como o fato dos medicamentos empregados serem tóxicos com o uso prolongado. Dessa forma, a utilização de vacinas antitoxoplasmose se constitui em uma alternativa importante para o controle da doença (Jenkins, 2001; Kawasoe, 2002). O desenvolvimento de imunidade prévia à infecção com o *T. gondii* impediria a liberação dos oocistos pelos felinos, preveniria a formação de cistos teciduais na carne dos animais de abate e sua transmissão por via oral, e evitaria o desenvolvimento de um estado de portador assintomático passível de reagudização nos humanos. Uma vacina também poderia impedir a toxoplasmose aguda em mulheres gestantes e em fêmeas prenhes de rebanhos de produção, impedindo a transmissão transplacentária do parasita e suas sérias conseqüências (Alexander *et al.*, 1996).

1.4 - Resposta imune contra *T. gondii*

O *T. gondii* caracteriza-se por ativar uma marcante resposta imune celular. Uma característica dessa resposta é que praticamente não existe imunopatologia associada à mesma, sendo os sintomas mais comuns febre e linfadenopatia (Denkers & Gazzinelli, 1998).

O *T. gondii* é um forte indutor de linfócitos antígeno-específicos CD4⁺ e CD8⁺, o que indica que os peptídeos do parasita são eficientemente reconhecidos e adequadamente direcionados nas vias celulares responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos. Os linfócitos T CD8⁺ são considerados os efetores mais importantes na proteção contra a doença, impedindo a reativação da infecção crônica. Essas células atuam produzindo IFN- γ e desenvolvem atividade citolítica sobre células infectadas (Brown & McLeod, 1990; Denkers, 1999). Além disso, as células T CD4⁺ também assumem um importante papel (Gazzinelli *et al.*, 1991; Gazzinelli *et al.*, 1992; Johnson & Sayles, 2002). Essas cooperam na produção de IFN- γ e auxiliam na proliferação e ativação de células T CD8⁺, possivelmente através

da produção de IL-2 e indução da expressão de moléculas co-estimulatórias (Denkers & Gazzinelli, 1998). O IFN- γ atua em macrófagos, células dendríticas aumentando a capacidade microbicida e de síntese de IL-12 (Gazzinelli *et al.*, 1994). Essa citocina ainda ativa a síntese de quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T; atua como co-fator da IL-12 na diferenciação de células Th0 em células efectoras Th1 (Gazzinelli *et al.*, 1996) e induz a expressão de receptores de IL-12 em células T (Seder *et al.*, 1993).

Na medida em que a resposta imune se desenvolve, ocorre a eliminação dos taquizoítos, aparecimento de bradizoítos e formação de cistos teciduais. Alguns trabalhos preconizam que, na transição da fase aguda para a fase crônica da toxoplasmose, a resposta imune induz ativamente a transformação do taquizoíto em bradizoíto. Uma segunda hipótese sugere que a resposta imune controla a multiplicação do taquizoíto, mas não tem efeito sobre o bradizoíto, que é essencialmente inócuo ao hospedeiro. De qualquer forma, na fase crônica, os níveis de citocinas inflamatórias caem e a manutenção do controle da infecção passa a depender do desenvolvimento de imunidade adquirida, com ativação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas (Denkers & Gazzinelli, 1998).

Além da resposta imune celular é importante ressaltar a resposta imune inata inespecífica contra o parasita que é ativada principalmente durante a fase aguda da infecção. Isso é evidenciado pelo fato de que a infecção pelo *T. gondii* limita a co-infecção com outros patógenos, tais como *Schistosoma mansoni* (Mahmoud *et al.*, 1976). Essa resposta é caracterizada pela produção de Interleucina (IL) 12 por células dendríticas, macrófagos e neutrófilos, e pela produção de IL-12 dependente de Interferon gama (IFN- γ) por células “Natural Killer” (NK). O papel da precoce ativação dessa resposta relaciona-se com a necessidade do organismo de limitar a replicação de taquizoítos, além de direcionar o adequado desenvolvimento da resposta adquirida, levando a diferenciação de células Th0 precursoras em células Th1 efectoras (Combe *et al.*, 2005; Denkers & Gazzinelli, 1998).

Enquanto a produção de citocinas próinflamatórias é requerida para o controle da infecção, o excesso das mesmas pode gerar danos imunopatológicos graves e até mesmo levar o indivíduo a morte. Dessa maneira, ao mesmo tempo em

que o contato do organismo com o parasita leva a uma alta produção de citocinas com perfil Th1, desenvolve-se também uma resposta do tipo Th2, caracterizada pela produção de IL-4, IL-10 e TGF- β , a qual regula a expressão e função das citocinas pró-inflamatórias (Gazzinelli *et al.*, 1996). Porém, ao mesmo tempo em que citocinas com perfil Th2 evitam danos ao organismo, elas também beneficiam o parasita, permitindo a persistência do mesmo e o estabelecimento de uma infecção crônica. Com isso, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de se entender melhor os circuitos das citocinas produzidas durante a infecção pelo *T. gondii*, assim como suas populações celulares alvo, visando ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes de combate ao mesmo.

A IL-10 é uma citocina que atua inibindo a síntese de IL-12 por células apresentadoras de antígenos e a produção de IFN- γ por células NK e linfócitos Th1 (D'Andrea *et al.*, 1993). Já foi demonstrado, por exemplo, que ela é requerida para a prevenção da mortalidade e necrose no intestino delgado de camundongos, tanto de BALB/c resistentes quanto de camundongos C57BL/6 susceptíveis, após infecção oral com a cepa ME49 (Susuki *et al.*, 2000). Já o papel da IL-4 é o de potencializar os efeitos da IL-10 sobre macrófagos e induzir a diferenciação de precursores Th em células efetoras com perfil Th2; e o Fator de Crescimento Tumoral beta (TGF- β), que potencializa os efeitos da IL-10 em macrófagos, inibe a síntese do IFN- γ em células NK e interfere na diferenciação dos linfócitos precursores (Denkers, 1999; Denkers & Gazzinelli, 1998; Swain *et al.*, 1990).

1.5 - Antígenos de superfície e vacinas contra *T. gondii*

O desenvolvimento de uma vacina contra o *T. gondii* é uma possibilidade viável já que indivíduos naturalmente infectados desenvolvem imunidade intensa e duradoura contra o agente, sendo essa capaz de protegê-los contra subsequentes reinfecções. Ainda mais, já foi demonstrado que o mesmo grau de resposta pode ser obtido com a administração de formas atenuadas do parasita. Esse é o caso da "Toxovax", uma vacina comercial que foi desenvolvida com a cepa S48, não formadora de cistos, que é utilizada para fins veterinários. Apesar dos altos custos, do baixo período de proteção, dos riscos de infecções humanas acidentais e dos efeitos colaterais, a imunidade conferida pela mesma é capaz de evitar a

transmissão congênita do parasita e conseqüente abortamento em ovinos (Buxton & Innes, 1995). Entretanto, o uso de vacinas atenuadas em humanos é improvável, dado o fato de que os taquizoítos presentes em sua composição estão vivos e podem estabelecer infecções crônicas ou reverter a um estado patogênico e causar doença aguda. Devido a esse fato, as pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra toxoplasmose concentram-se na identificação de imunógenos e delineamento de protocolos de imunização que utilizem somente esses componentes (Mishima *et al.*, 2001).

Nos últimos anos tem havido progresso considerável na tentativa de se identificar antígenos candidatos, capazes de gerar resposta imune protetora, para o desenvolvimento de uma vacina. Muitos desses trabalhos têm como foco antígenos de superfície dos taquizoítos, denominados SAGs (do inglês “Surface Antigens”) (Bhopale, 2003). Estas proteínas, juntamente com as SRSs (do inglês “SAG-Related Sequences”) compõem uma família de antígenos, dentre os quais SAG1, SAG2 e SAG3 se destacam como os mais abundantemente expressos na superfície de taquizoítos (Lekutis *et al.*, 2001; Manger *et al.*, 1998).

As SAGs, principais antígenos de superfície do parasita *T. gondii*, possuem um peptídeo N-terminal que sinaliza para o complexo de tradução protéica dirigindo o transporte das mesmas para o retículo endoplasmático, além de uma extremidade C terminal hidrofóbica com um motivo de adição de âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para ligação à membrana celular (Boothroyd *et al.*, 1998).

SAG1, o antígeno de membrana imunodominante em taquizoítos, apresenta peso molecular de aproximadamente 30Kd; SAG3, a terceira proteína de membrana mais abundante do parasita, apresenta peso molecular de 43Kd. SAG1 e SAG3 possuem homologia em 24% de seus aminoácidos, inclusive na conservação de todos os resíduos de cisteína nas proteínas maduras e uma similaridade nas estruturas secundárias e terciárias (Boothroyd *et al.*, 1998). Acredita-se que essas proteínas atuem interagindo com a superfície da célula hospedeira, servindo como mediadora do processo de adesão e/ou invasão. Dessa maneira, epitopos das SAG1 e SAG3 são potenciais alvos para ensaios vacinais, já que anticorpos monoclonais dirigidos contra a primeira inibiram a infecção de fibroblastos humanos e enterócitos murinos em cultura (Mineo & Kasper, 1994). Ainda mais, nocautes da

cepa RH para o gene da SAG3 tiveram redução da capacidade de adesão e invasão de macrófagos murinos J777 e fibroblastos humanos em aproximadamente 50-60%, sendo esse fenômeno revertido através de complementação gênica. Além disso, os taquizoítos mutantes foram marcadamente menos virulentos, que o tipo selvagem ou SAG3 complementados, quando administrados intraperitonealmente em camundongos BALB/c (Dzierszinski *et al.*, 2000). Já SAG2, com cerca de 22Kd, é a segunda proteína de membrana em abundância. Ainda não se sabe ao certo a sua função, mas especula-se que ela esteja envolvida com o processo de adesão/penetração na célula hospedeira, agindo sinergicamente com as SAG1/3 (Parmley *et al.*, 1994).

O potencial imunogênico das SAGs, especialmente da SAG1, foi previamente demonstrado em diversos modelos de vacinação contra *T. gondii*. A imunização com SAG1 recombinante expressa em *Escherichia coli* induz a produção de anticorpos IgG1, caracterizando o desenvolvimento de uma resposta imune tipo Th2, quando administrada sozinha ou em combinação com o adjuvante alumínio. Apesar disso, a taxa de sobrevivência dos camundongos aumentou após desafio com a cepa RH (Petersen *et al.*, 1998). Já Letscher-Bru *et al.* (1998) mostrou que a associação da SAG1r com IL-12 recombinante (IL-12r) como adjuvante alterou a resposta imune, provocando um desvio para um tipo Th1, o que resultou num efeito protetor caracterizado pela redução da contagem de cistos no cérebro dos animais vacinados. Proteção contra o desafio letal com a cepa RH em camundongos C3H e BALB/c e prevenção da formação de cistos cerebrais em BALB/c desafiados com doses sub-letais da cepa Beverley também já foi demonstrada com a imunização com plasmídeo contendo o gene SAG1 (Nielsen *et al.*, 1999; Couper *et al.*, 2003). Além disso, a proteína SAG1 já foi testada em associação com a toxina da cólera (CT), enterotoxina lábil (LT) e dois de seus derivados não tóxicos chamados LTR72 e LTK63, em esquemas de imunização intranasal em camundongos. Nesses experimentos foram observadas a ativação de resposta celular local (linfonodos mesentéricos) e sistêmica (baço), a produção de IFN- γ , IL-5 e IL-2, a produção de altos títulos de IgG2a, IgG2b (soro) e IgA (lavado nasal, pulmonar e intestinal), e a redução significativa na carga de cistos cerebrais nos animais vacinados (Bonenfant *et al.*, 2001; Debard *et al.*, 1996).

Os estudos relacionados a vacinas contra toxoplasmose apresentados anteriormente possuem resultados animadores, na medida em que demonstram a possibilidade de se obter uma proteção significativa contra a doença em modelos animais. Entretanto, as maiores limitações daqueles modelos de vacinação têm sido a manutenção de níveis ótimos de imunógenos no organismo hospedeiro e a ativação de uma resposta desviada para um tipo protetor Th1, que é dependente da associação com adjuvantes apropriados. Isto é especialmente relevante no caso das vacinas baseadas em proteínas recombinantes. Como uma extensão dessas pesquisas, o presente trabalho introduz o desenvolvimento de vacinas anti-toxoplasma baseadas em vírus recombinantes. O uso de vetores virais como o adenovírus e o MVA recombinantes é extremamente adequado para o desenvolvimento de vacinas contra *T. gondii*, tendo em vista a alta expressão de proteínas heterólogas daqueles vetores e a capacidade de indução de citocinas com perfil Th1.

1.6 - Adenovírus como vetores vacinais

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

Os adenovírus caracterizam-se por apresentarem DNA fita dupla linear com cerca de 36Kb, que se encontra empacotado em um núcleo ou core envolvido por um capsídeo protéico icosaédrico com 20 faces triangulares (Figura 2 A) (Imler, 1995). Esse é constituído de três estruturas protéicas principais, hexon, penton e fibras (Figura 2 B). Os hexons constituem as faces triangulares do capsídeo. Os pentons formam os vértices da partícula, a partir dos quais se projetam as fibras, responsáveis pela interação com os receptores celulares (Nickin *et al.*, 2005).

O ciclo dos adenovírus (Figura 2 C) tem início com a adesão das partículas virais na superfície da célula hospedeira, por meio de ligação da fibra do capsídeo ao receptor celular CAR (Receptor de Coxsackievirus e Adenovírus) (Tomko *et al.*, 1997).

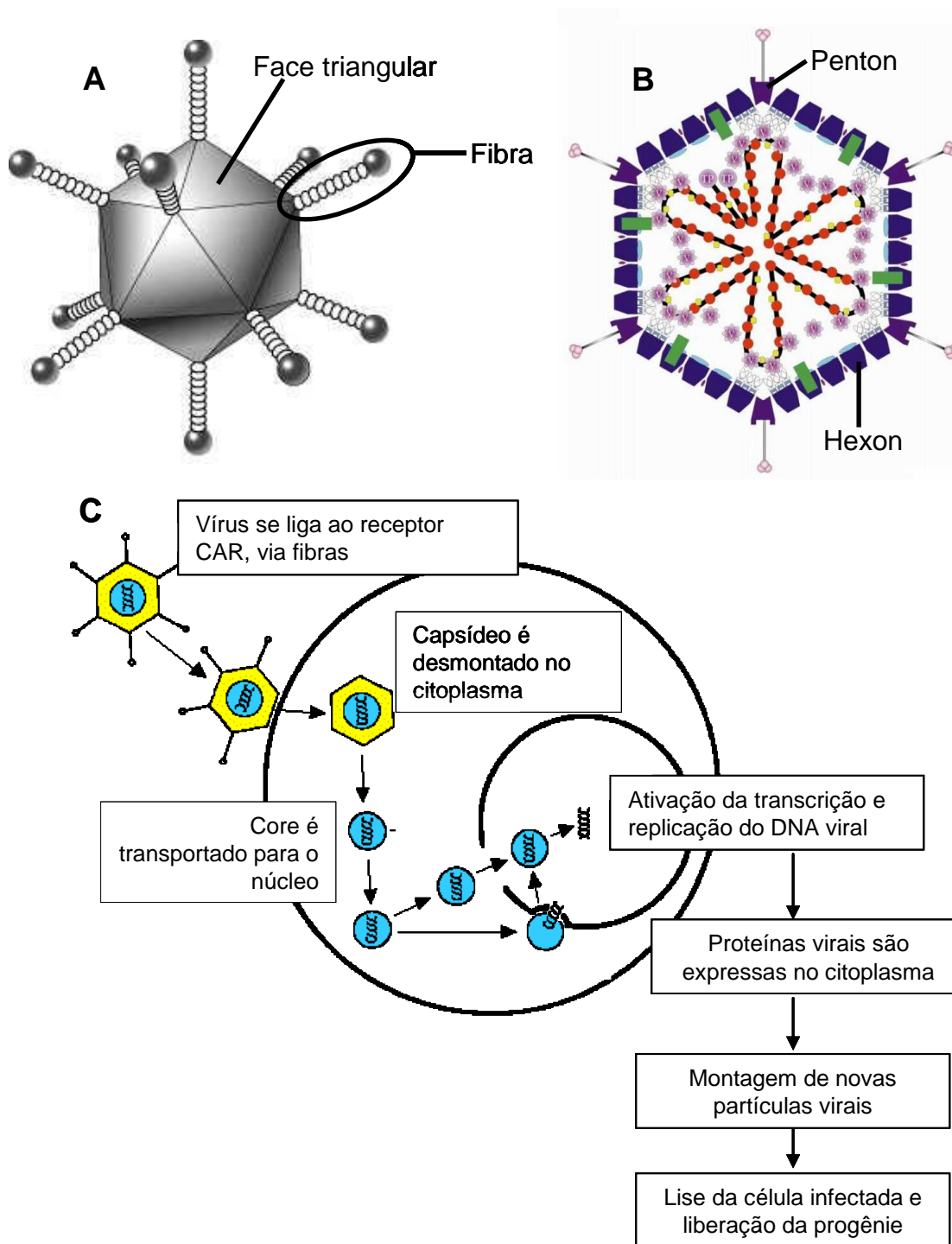


Figura 2 – Biologia dos adenovírus. A, representação de uma partícula viral, com suas faces triangulares e fibras. B, representação de um corte transversal de uma partícula viral, mostrando a posição dos pentons e hexons e o DNA dentro do core, associado a proteínas semelhantes a histonas. Adaptado de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

Uma vez ligado à superfície celular, o motivo RGD na base dos pentons interage com integrinas, o que ativa a internalização do vírus via vesículas recobertas por clatrininas (Varga *et al.*, 1991). Após internalização, as partículas virais escapam para o citoplasma por meio da ruptura do endossomo primário, sendo ativamente transportadas para o núcleo via microtúbulos. À medida que são movidas pelo citoplasma, as partículas vão sendo desmontadas de maneira organizada e seqüencial de forma que somente o genoma viral alcança o núcleo celular, onde ocorre ativação transcricional do mesmo. A replicação do genoma viral e a produção de grandes quantidades de moléculas estruturais do capsídeo propiciam a montagem de novas partículas virais. Hexons, pentons e fibras são montados separadamente no citoplasma e transportados para o núcleo onde serão reunidos para formar o vírion. Uma vez que novas partículas virais são montadas, ocorre a liberação da progênie através da ruptura da célula infectada (Shenk, 2001).

Os primeiros relatos de adenovírus humanos ocorreram há mais de quatro décadas e desde então, cerca de 50 sorotipos já foram identificados. Esses vírus têm sido descritos como agentes etiológicos de patologias do trato respiratório superior, síndromes gastro-intestinais como diarréia e conjuntivites (Zhang & Bergelson, 2005). Em geral, as infecções manifestam-se na forma de doenças benignas e auto-limitantes, com os indivíduos infectados desenvolvendo uma resposta imune eficiente no controle da replicação viral e re-infecção.

A popularidade do uso dos adenovírus como vetor de vacinação deveu-se ao sucesso e segurança alcançados após a imunização de milhares de militares do exército americano com os sorotipos Ad4 e Ad7 com o objetivo de prevenir a síndrome respiratória aguda (ARD) (Howell *et al.*, 1998). Desde então, diversas metodologias tem sido trabalhadas com o intuito de tornar o vetor mais eficaz, capacitando-o para ser empregado como uma poderosa ferramenta de expressão de proteínas heterólogas. Com isso, novas construções com seqüências de patógenos importantes como vírus Ebola (Sullivan *et al.*, 2000; Sullivan *et al.*, 2003), HIV (Cassimiro *et al.*, 2003; Mooij & Heeney, 2001), *Plasmodium* (Bruna-Romero *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2002) têm sido utilizadas com grande sucesso na indução de imunidade em modelos experimentais.

Dentre as características dos adenovírus algumas foram decisivas na escolha destes vírus como ferramenta de vacinação. Entre elas, (I) baixa patogenicidade, o que permite o desenvolvimento de vetores de imunização praticamente inócuos aos hospedeiros; (II) habilidade de infectar uma ampla variedade de células, além de células pós-mitóticas; (III) estratégias de replicação e genoma já foram bastante caracterizados, sendo o material genético viral incapaz de integrar-se ao da célula hospedeira; (IV) eles são relativamente estáveis e fáceis de manipular, dispensando refrigeração quando liofilizados; (V) fácil propagação, podendo ser obtidos em altos títulos ($>10^9$ unidades formadoras de placas/mL), o que permite sua produção em larga escala (Babiuk & Tikoo, 2000; Souza *et al.*, 2005).

Devido ao extensivo conhecimento acumulado das características genéticas e da biologia, dentre os vários sorotipos de adenovírus existentes, os mais utilizados como vetores recombinantes pertencem ao subgrupo C. No presente trabalho foi utilizado um vetor de primeira geração, baseados no adenovírus humano pertencente ao sorotipo 5. Esse vetor é caracteristicamente incompetente para replicação (Imler, 1995).

Além das características anteriormente citadas, a imunogenicidade desse vetor foi outro aspecto que chamou a atenção do nosso grupo de pesquisa para a utilização do mesmo como uma ferramenta para o desenvolvimento de protocolos de imunização contra parasitas intracelulares. Tipicamente, infecções com adenovírus induzem uma resposta inflamatória caracterizada por infiltrado inflamatório rico em células, com a liberação local de TNF- α , IL-1, IL-6, sendo ativados tanto mecanismos imunes inatos quanto células T CD4⁺ e CD8⁺ (Gisenberg *et al.*, 1990; Gisenberg *et al.*, 1991; Yang *et al.*, 1995).

1.7 - Poxvírus como vetores vacinais

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

os membros dos gêneros *Orthopoxvirus* e *Avipoxvirus* são amplamente utilizados como vetores recombinantes com fins vacinais (Moss, 2001).

O emprego do vírus vaccinia como ferramenta vacinal começou a partir de 1980, quando a Organização Mundial de Saúde declarou a varíola erradicada e recomendou a descontinuidade da vacinação. Esta vacinação, a qual havia sido realizada por aproximadamente dois séculos, consistia na inoculação intradérmica do vírus vaccinia, o que promovia imunidade cruzada contra o vírus da varíola (Moss, 1996). De maneira interessante, o período de descontinuidade da vacinação coincidiu com os primeiros relatos da aplicação da tecnologia do DNA recombinante para a geração de vírus vaccinia recombinante (Mackett *et al.*, 1982; Paoletti *et al.*, 1984).

Numerosas abordagens têm sido utilizadas para aumentar a segurança dos vírus vaccinia. Dentre elas, a identificação e deleção de seqüências gênicas relacionadas com a virulência do vírus e a atenuação através da passagem seriada em cultivos celulares. Historicamente, o MVA (do inglês “modified vaccinia vírus Ankara”) foi gerado através da atenuação por passagem seriada em cultura primária de fibroblastos de embrião de galinha (CEF) com a finalidade de servir como uma vacina segura contra a varíola (Sutter, 2003). Após mais de 570 passagens em cultura de tecidos, os MVAs perderam diversos genes do vírus vaccinia responsáveis pela virulência, o que os incapacitou de gerarem infecções produtivas em células de mamíferos. Mesmo em experimentos utilizando animais imunossuprimidos e em humanos constituintes de grupos de risco, o MVA mostrou-se avirulento e incapaz de produzir partículas virais infectivas. Devido a esse aspecto e pelo fato de que a vacinação de mais de cem mil indivíduos ter sido realizada com alto grau de segurança e sem nenhum efeito colateral notificado, o MVA tem se estabelecido como um potente candidato para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (Drexler, 2004; Ramírez *et al.*, 2000). Além disso, já foi demonstrado que o defeito no programa morfogênético que acontece nos últimos passos do ciclo replicativo desse vírus não altera a capacidade e o nível de expressão de antígenos recombinantes em células de mamíferos se comparado ao vírus vaccinia competente em replicação (Sutter & Moss, 1992). Ainda mais, como a expressão das proteínas desse vírus ocorre em nível citoplasmático, isso elimina a

possibilidade de integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (Moss, 2001).

A construção de MVA recombinante para vacinação tem sido utilizada experimentalmente contra doenças de diversas etiologias, como tuberculose (McShane *et al.*, 2001), Malária (Schneider *et al.*, 1998), HIV (Hanke *et al.*, 1999), sendo bastante imunogênica tanto em murinos quanto em humanos e sendo capaz de gerar uma potente resposta imune levando a ativação tanto de células TCD4⁺ quanto TCD8⁺ contra o transgene (Hodge *et al.*, 2003). Dessa maneira, a utilização de MVAs recombinantes em protocolos de imunização contra parasitas intracelulares é bastante atraente.

1.8 - Genoma e biologia dos poxvírus

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

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

O ciclo infeccioso dos Poxvírus (figura 3) inicia-se após a ligação das partículas virais à superfície celular e liberação do core viral no interior do citoplasma. Inicialmente, somente os genes imediatos são transcritos pelo complexo da RNA polimerase viral. Esses codificam proteínas envolvidas com a replicação do

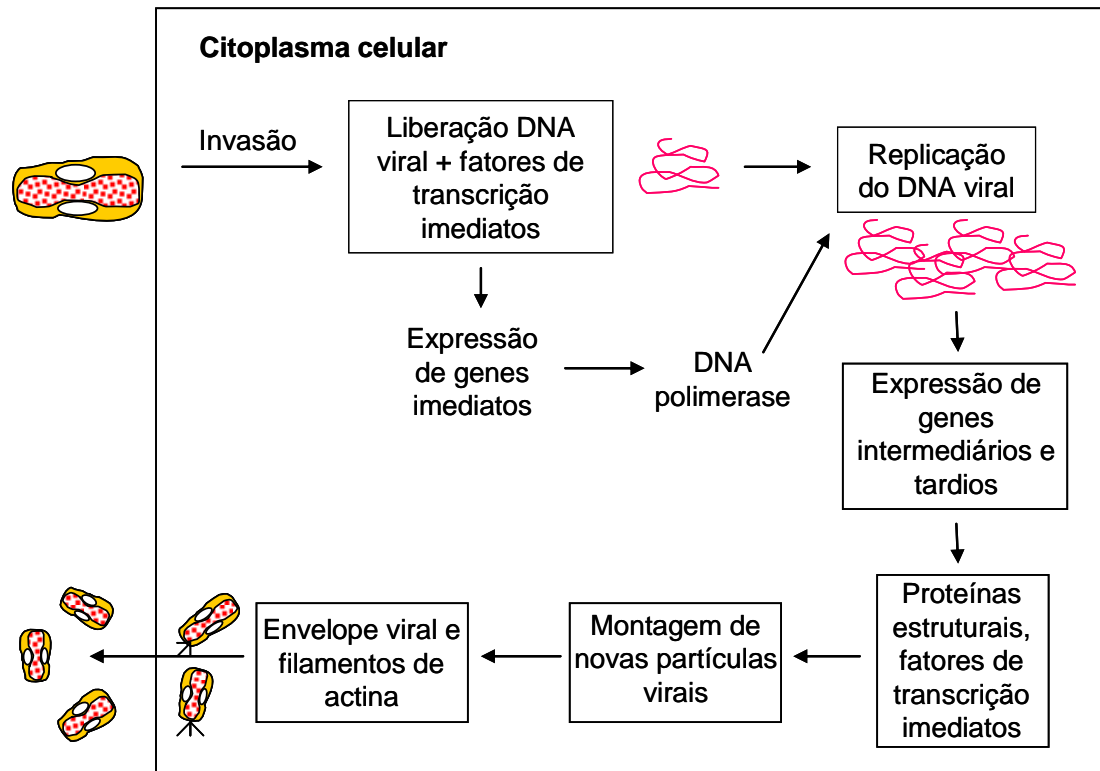


Figura 3 – Representação simplificada dos principais eventos do ciclo de replicação dos Poxvírus.

genoma viral, com a imunomodulação da resposta imune do hospedeiro, fatores de crescimento parácrinos, fatores de transcrição intermediários e tardios.

Tipicamente, as moléculas de DNA da progênie viral servem como moldes para a expressão das classes de genes intermediários e tardios. Após a síntese das proteínas estruturais tardias, as partículas virais infecciosas são montadas, sendo que algumas são liberadas com uma membrana adicional derivada do Complexo de Golgi. Após a montagem, as partículas virais são transportadas para a periferia da célula com auxílio de caudas de actina que se ligam aos microtúbulos celulares, podendo ser liberadas para o meio extracelular ou permanecer ligadas à superfície (Moss, 1991; Moss, 2001).

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

2. OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Estudar a capacidade de apresentação antigênica de vetores virais recombinantes contendo os genes das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii* para determinar sua possível utilização como vacina contra a toxoplasmose.

2.2 - Objetivos específicos

Empregar adenovírus recombinantes como agentes de imunização de camundongos BALB/c e C57BL/6 em protocolos do tipo iniciação/reforço (“prime/boost”) homólogo.

Estudar o tipo de resposta imune gerada nos camundongos imunizados, verificando a ativação do sistema imune humoral e celular.

Mapeamento dos epítomos de células T CD8⁺ presentes nas proteínas estudadas que poderiam induzir produção de IFN- γ .

Avaliar a capacidade protetora da resposta imune gerada em camundongos C57BL/6 imunizados, mediante o desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*, causadora de infecção crônica (cistogênica).

Produzir MVA recombinantes contendo seqüências dos genes que codificam os antígenos de superfície de SAG1, SAG2 em versões truncadas, sem as seqüências correspondentes à âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI), visando sua futura aplicação em protocolos do tipo iniciação/reforço heterólogo com o intuito de se melhorar a eficiência do protocolo de imunização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Animais

Para manutenção das cepas de *T. gondii* utilizadas nos experimentos, foram empregadas fêmeas de camundongos Suíços, com 6 a 8 semanas de idade, obtidas no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou (BIOTEX-CPqRR), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ou do Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais (cBio).

Nos experimentos de imunização com os adenovírus e/ou desafio com *T. gondii* foram empregadas fêmeas de camundongos BALB/c e C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, obtidas no cBio/UFMG ou BIOTEX-CPqRR.

3.2 - Cepas de *T. gondii*

Nos experimentos de desafio dos camundongos imunizados foi empregada a cepa ME49 de *T. gondii*. Esta cepa foi isolada a partir de ovelhas, em 1965, nos Estados Unidos (Lunde & Jacobs, 1983). Essa cepa é classificada como tipo II, e estabelece infecções crônicas em camundongos, com formação de cistos. A sua manutenção tem sido realizada no Laboratório de Toxoplasmose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, através da passagem sucessiva de cistos teciduais em camundongos Suíços. Os cistos obtidos através da maceração do cérebro de animais infectados em PBS foram empregados para desafio dos animais vacinados com adenovírus recombinantes.

A cepa RH é classificada como tipo I, e causa infecção aguda letal em camundongos. Ela foi isolada pela primeira vez em um paciente com encefalite, em 1939, em Cincinnati, EUA (Sabin, 1941). A cepa RH foi empregada para obtenção de antígeno total de lisado de taquizoítos (TLA) e fração antigênica F3 de membrana de taquizoítos de acordo com protocolo descrito por Giraldo *et al.* (2000). Essa cepa tem sido mantida no Laboratório de Toxoplasmose, através da passagem sucessiva de taquizoítos livres em camundongos Suíços.

3.3 - Linhagens celulares

Para os experimentos de amplificação dos adenovírus, bem como para os testes de expressão dos genes recombinantes, foram empregadas células HEK293. Essa linhagem é composta de células de rim embrionário humano, as quais foram transformadas com fragmentos de DNA derivados da região E1 do genoma de adenovírus humano tipo 5 (Ad5). Essas células expressam fatores de transcrição E1 e são permissivas a replicação de adenovírus E1Δ de primeira geração (Shaw *et al.*, 2002). As células foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂, em Dullbeco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab), 5mM de bicarbonato de sódio, 25mM de HEPES e 40mg/l de gentamicina (DMEM completo).

Para os experimentos de geração e amplificação dos MVAs foram utilizados fibroblastos primários de embrião de galinha (CEF – do inglês “chicken embryo fibroblast”). As CEFs foram obtidas a partir de ovos embrionados de galinha com 9 - 11 dias de idade. O cultivo foi realizado a 35°C e 5% de CO₂ em Modified Eagle Medium (EMEM, Sigma) suplementado com 10% de SFB (Gibco) 10% de L-glutamina e 10% de solução comercial de penicilina/estreptomicina 100X (Sigma).

3.4 - Adenovírus recombinantes

Os adenovírus recombinantes utilizados nesse trabalho foram gerados pela Dra. Bráulia Costa Caetano durante o seu doutorado no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG. Esses codificam três antígenos de superfície de *T. gondii*, denominados SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2) e SAG3 (AdSAG3). As seqüências dos genes inseridos nos adenovírus sofreram algumas modificações para promover adequada expressão em células de mamíferos. As modificações incluíram a remoção dos motivos de ancoramento de glicofosfatidilinositol (GPI), nos três genes, e no caso de SAG3, a mudança do peptídeo sinal nativo pela seqüência sinal da hemaglutinina do vírus influenza (Caetano *et al.*, 2006).

Purificação e titulação dos adenovírus recombinantes

Para purificação de cada estoque concentrado de adenovírus, células HEK293 foram semeadas em 12 garrafas de cultivo de 175 cm², em DMEM completo, e cultivadas até atingirem 90-95% de confluência. Para infecção, 20ml de sobrenadante infectado, previamente preparado, foram misturados a 520ml de DMEM completo e distribuídos entre as garrafas, as quais foram incubadas por 48 horas a 37°C, sem ventilação, até o aparecimento do efeito citopático e descolamento das células. O conteúdo das garrafas foi coletado e centrifugado a 300g durante 10 minutos. As células foram ressuspensas em tampão Tris 100mM pH=8,0 e congeladas a -70°C. Para extração dos adenovírus, os estoques de células infectadas foram descongelados rapidamente a 37°C e incubados com 0,5% de deoxicolato de sódio durante 30 minutos em banho de gelo. Em seguida, os extratos de células foram homogeneizados, misturados com solução saturada de cloreto de cério (5,8ml de cloreto de cério para cada 10ml de extrato), e centrifugados a 100.000g durante 16 horas para bandamento das partículas de adenovírus. Os vírus foram coletados e dializados contra 2 litros de tampão Tris 10mM durante 4 horas, a 4°C, com uma troca de tampão. Os vírus purificados foram mantidos congelados com 10% de glicerol a -70°C até sua utilização.

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

3.5 - Experimentos de vacinação e desafio

Os animais foram imunizados de acordo com um protocolo de vacinação do tipo iniciação/reforço (“prime/boost”) homólogo, no qual camundongos BALB/c e C57BL/6 receberam duas doses de 10^9 p.f.u. de adenovírus, com um intervalo de 6 a 8 semanas entre as aplicações. Os grupos vacinais foram constituídos individualmente de 10-12 animais, os quais receberam adenovírus que codificam para SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2), SAG3 (AdSAG3). O grupo de controle vacinal (AdCTRL) recebeu adenovírus recombinantes que codificam a proteína β -galactosidase de *E. coli* (AdlacZ) (Bruña-Romero *et al.*, 1997). A vacinação foi feita por via subcutânea, na base da cauda, utilizando adenovírus diluídos em PBS estéril acrescido de 1% de soro de camundongo normal, num volume final de 100 a 200 μ l por animal.

Amostras de soro de camundongos C57BL/6 foram obtidas um dia antes do início do protocolo de vacinação e 30 dias após cada imunização, para serem empregadas posteriormente na análise da resposta imune humoral dos animais.

Para avaliação da resposta imune celular, esplenócitos totais dos animais vacinados foram obtidos entre 2 a 4 semanas após a administração da primeira ou segunda dose de adenovírus recombinantes. Dois animais de cada grupo foram separados e sacrificados para coleta dos baços e isolamento dos esplenócitos, os quais foram empregados em ensaios de ELISPOT para detecção de células T produtoras de IFN- γ .

Para analisar a capacidade protetora dos adenovírus recombinantes em camundongos C57BL/6, os animais vacinados foram submetidos ao desafio com a cepa ME49 de *T. gondii*, 12 dias após o término do protocolo de imunização. Os animais de cada grupo vacinal e controle receberam uma dose de 10 cistos, preparados em 200 μ l de PBS e aplicados por meio de gavagem gástrica. Quarenta e cinco dias após a infecção, estes animais foram sacrificados para isolamento dos cérebros e determinação da carga de cistos. Os cérebros de cada animal sobrevivente foram macerados em 1ml de PBS e, em seguida, duplicatas de 10 μ l de extrato cerebral foram aplicadas sob lamínulas de 22x22cm. A contagem dos cistos foi feita em aumento de 400X, percorrendo-se a área das lamínulas.

3.6 - “Western-Blot”

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

Para bloqueio, as membranas foram incubadas, durante uma noite, a 4°C, em tampão composto de PBS acrescido de 0,1% de Tween 20 e 5% de leite desnatado. Todos os soros e anticorpos secundários foram diluídos no tampão de bloqueio. Entre as incubações, as membranas foram lavadas sob agitação, três vezes, 5 minutos cada vez, no mesmo tampão. Para análise da resposta imune humoral dos animais vacinados, amostras de soros de camundongos vacinados diluídas 1:1000 foram testadas contra extrato total de taquizoitos de *T. gondii* (TLA) e para detecção da expressão de proteínas pelos vetores virais, as membranas contendo extratos de CEFs infectadas com os vírus recombinantes foram incubadas com amostras de soro de camundongos BALB/c vacinados com adenovírus recombinantes, codificando para as proteínas SAG1 ou SAG2, diluídas 1:1000, durante 120 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação. Para detecção dos complexos antígeno-anticorpo, as membranas foram incubadas com anti-IgG de camundongo (Sigma) diluído 1:3000, durante 60 minutos, a temperatura ambiente, sob agitação. As membranas foram então lavadas seis vezes em PBS acrescido de 0,1% de Tween e duas vezes em PBS puro. A revelação foi realizada por meio da incubação das membranas com reagente quimioluminescente (ECL-Plus Western-

Blot Analysis System[®], Amersham Biosciences) e exposição das mesmas a filme de raios X (Hiperfilm; Amersham Biosciences).

3.7 - Peptídeos Sintéticos

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

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

3.8 - ELISPOT

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

Os esplenócitos totais, alvos da re-estimulação "in vitro", foram obtidos de camundongos vacinados com uma ou duas doses de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL. Baços de dois animais de cada grupo foram coletados, e macerados em conjunto. Os extratos totais obtidos foram centrifugados a 300g, por 5 minutos,

ressuspendidos em tampão de lise de hemácias (ACK), composto de 150mM de NH_4Cl , 1mM de KHCO_3 e 100 μM de $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, e incubados durante 3 minutos em banho de gelo. Após três lavagens, os esplenócitos foram ressuspendidos em RPMI contendo 10% SFB. Para a reestimulação dos linfócitos foram utilizados peptídeos sintéticos H2-L^d e H2-D^b restritos (10mM e 50mM); uma fração antigênica de membrana de taquizoítos de *T. gondii* (fração F3, a 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$), a qual é rica em proteínas com ancôra GPI, especialmente SAG1, SAG2 e SAG3; e extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA a 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$).

Após a reestimulação, as células foram descartadas e as placas lavadas quatro vezes com PBS acrescido de 0,01% de Tween 20 (PBS/T20). A detecção do IFN- γ foi feita com um anticorpo monoclonal anti-IFN- γ conjugado com biotina (clone XMG1.2; BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), o qual foi diluído a 2 $\mu\text{g/ml}$ em PBS/T20, adicionado às placas a 50 μl por poço e incubado por 2 horas em temperatura ambiente. A detecção do IFN- γ complexado ao anticorpo específico foi feita com conjugado de estreptoavidina-peroxidase (BD Biosciences Pharmingen), diluída 1:2000 em PBS/T20 e incubada nas placas a 50 μl por poço, durante 1 hora a temperatura ambiente. Os “spots” foram revelados com solução de 2mM de DAB (3,3’ diaminobenzidine, Sigma) e 1,5 $\mu\text{l/ml}$ de H_2O_2 em tampão Tris-HCL 100mM pH 7.5.

3.9 - Geração dos MVA recombinantes com genes SAG1 e SAG2.

Vetores empregados na geração dos MVA recombinantes

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

Nesse trabalho utilizamos como vetor de transferência o plasmídeo pLW44 (Dr. Bernard Moss, Laboratory of Viral Diseases, NIAID-NHI, EUA). Esse plasmídeo apresenta o gene repórter GFP (do inglês, “Green Fluorescent Protein”) sob controle do promotor p11 (“Vaccinia virus late promoter”) e um cassete de expressão adaptado a células eucariotas flanqueado por regiões de homologia ao DNA do MVA (figura 4).

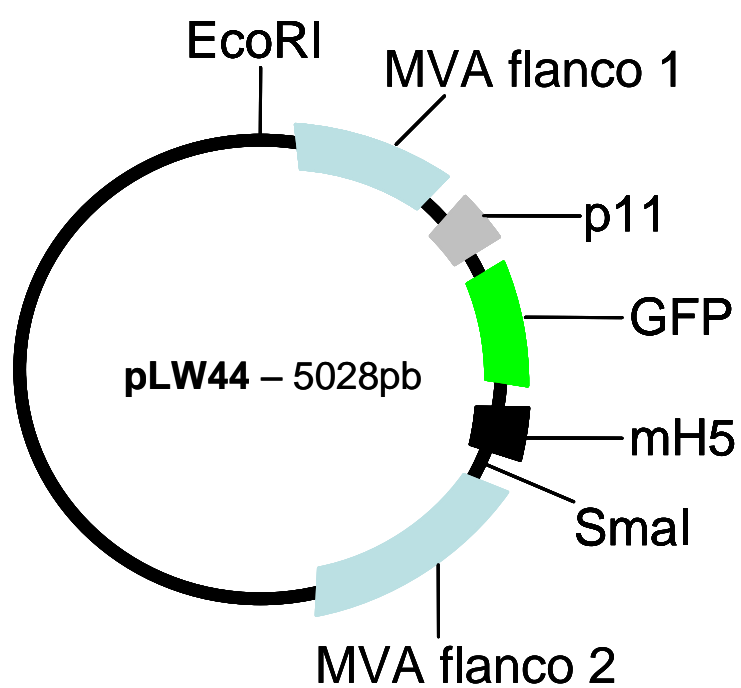


Figura 4 – Esquema representativo do vetor pLW44.

Clonagem dos genes SAG1 e SAG2 no vetor de transferência

Como os genes de interesse utilizados nesse trabalho já haviam sido anteriormente clonados em nosso laboratório (Caetano *et al.*, 2006), o primeiro passo para a construção dos vetores de transferência para a geração dos MVAs foi a excisão daqueles genes dos plasmídios nos quais eles se encontravam. Os genes *SAG1ΔGPI* e *SAG2ΔGPI* foram retirados da construção pAd-SAG1 e pAdSAG2 utilizando-se as enzimas de restrição *Bgl*II e *Hind*III. Para as clonagens, os produtos obtidos a partir das digestões acima foram tratados com a enzima T4 DNA polimerase (Promega) durante 5 minutos a 37°C. A inativação da enzima foi realizada durante 10 minutos a 75°C. Subseqüente a esse passo, os insertos acima obtidos foram inseridos no vetor de transferência pLW-44 no sítio de *Sma*I, sob o controle do promotor mH5 (“Vaccinia vírus early/late promoter”). As reações de ligação foram realizadas com a proporção molar 3:1 de inserto e plasmídio e 1U de T4 ligase (Promega) em 20µl de volume final, a 16°C durante 3 horas. Os produtos obtidos foram utilizados para a transformação de *E. coli* XL1-Blue quimiocompetentes. As bactérias mantidas a -70°C foram descongeladas em banho de gelo e transformadas com os plasmídios contendo os insertos. As bactérias transformadas foram então semeadas em meio LB sólido contendo 100µg/mL de ampicilina e mantidas a 37°C por 18 horas. Os transformantes obtidos foram verificados quanto à presença dos insertos através de reações digestão com enzimas de restrição.

Para determinar se as seqüências estavam completas procedeu-se ao sequenciamento dos plasmídios obtidos no Núcleo de Análises Genômicas (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG. Os plasmídios recombinantes obtidos foram posteriormente amplificados e purificados de cultivos bacterianos com “Kits” comerciais de Maxipreps[®] (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante e empregados para a construção dos vírus recombinantes.

Protocolo de geração de MVA recombinante

A construção dos MVAs recombinantes com os genes que codificam as SAGs foi realizada por meio da infecção de células CEF com um vírus auxiliar, seguida de co-transfecção com o vetor de transferência com cada um dos genes de

interesse. Os vírus transgênicos foram gerados pela recombinação homóloga intracelular entre o vírus auxiliar e os vetores de transferência. Nesse processo, o cassete de expressão contendo o gene SAG foi transferido para o genoma do MVA. As células CEF, nas quais ocorre montagem de novas partículas virais, foram utilizadas para a geração e seleção dos vírus recombinantes, já que as mesmas são permissivas a replicação viral. Placas fluorescentes foram clonadas sucessivamente, o que permitiu a exclusão dos vírus auxiliares contaminantes (figura 5).

Para gerar os MVAs recombinantes utilizando as construções pLW44-SAG1 Δ GPI e pLW44-SAG2 Δ GPI utilizou-se um protocolo de transfecção de células CEF com lipossomas (LipofectAMINE 2000 Reagent[®], Gibco). As células foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços, numa densidade de 5×10^5 células por poço, em EMEM/10% SFB, e cultivadas até atingirem confluência de 90%. Antes dos ensaios, as células foram lavadas uma vez com meio de transfecção (Optimem[®], Gibco). Primeiramente as células eram infectadas com 0,1 m.o.i (multiplicidade de infecção) de vírus auxiliar. Após 2h de incubação a 35°C e 5% de CO₂, a solução de transfecção era adicionada. Para cada reação de transfecção, 3 μ l da solução de lipossomas e 2 μ g de plasmídeo foram diluídos, separadamente, em 50 μ l de meio de transfecção e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. As soluções de lipossomas e plasmídeo foram então misturadas, incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e adicionadas às células. Essa solução era mantida em contato com as células infectadas durante um intervalo de 5h a 35°C e 5% de CO₂. Findo esse período, o meio foi retirado e acrescentou-se EMEM 2.5% SFB. O extrato de células transfectadas foi coletado após 48 horas de incubação a 35°C e 5% de CO₂.

Seleção dos MVA recombinantes

A seleção dos clones de MVA recombinantes foi realizada 5 vezes em placas de cultivo de 6 poços com 5×10^5 células CEF por poço. Uma alíquota de vírus foi diluída em série, com um fator de 10, e utilizada para infectar os cultivos. Depois de 2h de incubação, 2ml de EMEM sem indicador de pH acrescido de 1% de agarose fundida foram adicionados em cada poço. Após a solidificação da agarose

em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 35°C e 5% de CO₂ até o desenvolvimento de fluorescência.

Os cultivos que apresentavam poucas células fluorescentes, sem confluência, foram utilizados para coleta dos clones de MVA, através da punção e aspiração da agarose. Os fragmentos de gel foram transferidos para 0,5ml de EMEM 2,5% SFB. Quatrocentos microlitros de cada alíquota de EMEM contendo os clones de MVA foram empregados para infecção de novas placas contendo CEFs. Os extratos das células eram coletados 48 horas após a infecção e utilizados para infectar novas placas de cultivo.

Após a seleção dos recombinantes com o intuito de se eliminar os possíveis vírus selvagens contaminantes, uma alíquota de cada clone viral selecionado foi utilizado para infectar placas de 6 poços de CEFs com 5×10^5 células. Após 48h de cultivo, as células coletadas foram submetidas a ensaios de “Western blot” para verificação da expressão das proteínas. Após esse passo, os clones positivos entraram em processo de expansão através da infecção de cultivos com números crescentes de células, com intuito de se obter um título de 10^9 unidades formadoras de placa/mL (p.f.u.) de cada vírus.

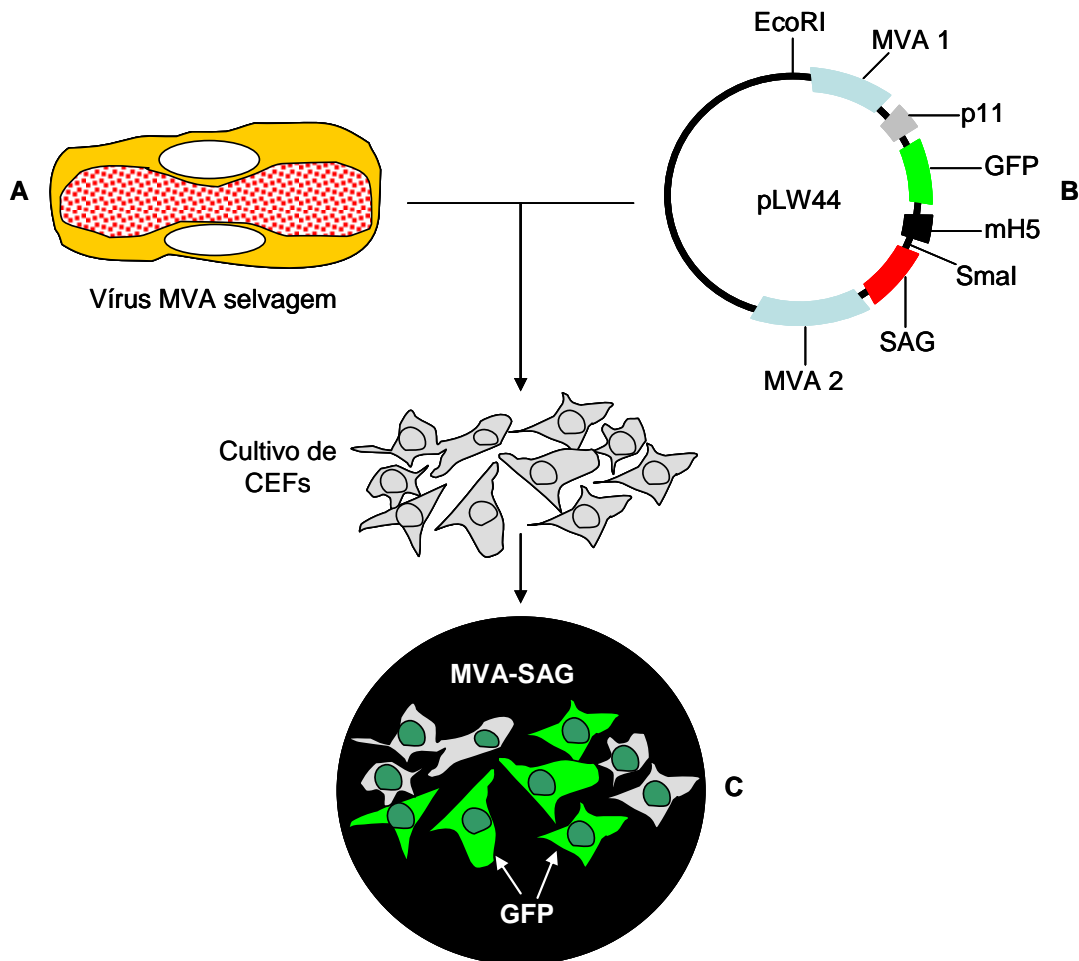


Figura 5 - Para geração dos MVAs recombinantes, um cultivo de CEFs era infectado com o MVA selvagem (A) e posteriormente transfectado com plasmídio contendo o transgene de interesse (B). A recombinação homóloga entre o genoma viral e o cassete de expressão contendo o transgene de interesse era verificada através do aparecimento de fluorescência devida à expressão do gene repórter GFP (C).

4. RESULTADOS

4.1 - Resposta imune humoral dos camundongos vacinados com adenovirus recombinantes AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3.

Os adenovirus recombinantes codificando as proteínas SAG1 (AdSAG1), SAG2 (AdSAG2) e SAG3 (AdSAG3) purificados a partir de cultivos de células HEK293 foram empregados em ensaios de vacinação de camundongos BALB/c e C57BL/6, de acordo com um protocolo do tipo iniciação/reforço homólogo, no qual os animais recebem duas doses subcutâneas com 10^9 p.f.u. com intervalo de seis a oito semanas entre as aplicações.

Esse protocolo foi previamente padronizado em experimentos de vacinação com adenovirus recombinantes com genes de *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium falciparum*, Citomegalovirus (Bruña-Romero e colaboradores, manuscrito em preparação), *Trypanosoma cruzi* (Machado *et al.*, 2006).

Para verificar se os camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses de adenovirus recombinantes produziam anticorpos específicos contra as proteínas SAG, foi realizado um ensaio de “Western-blot”, no qual o soro coletado 4 semanas após a última dose de virus foi testado contra o extrato total de taquizoítos de *T. gondii* (TLA). A figura 6 mostra que os soros testados dos animais imunizados com AdSAG1 e AdSAG3 reagiram especificamente com as proteínas SAG1 e SAG3 presentes no TLA. No caso dos animais vacinados com AdSAG2, verificou-se 50% de reação positiva dentre os animais testados.

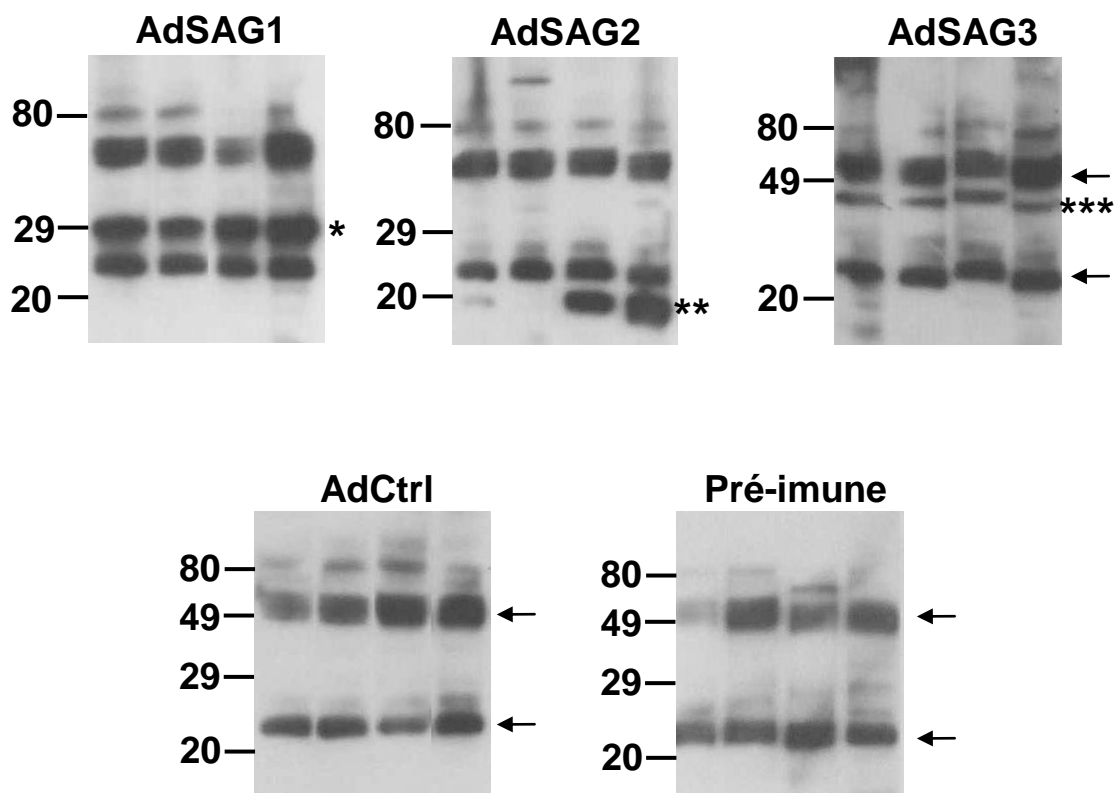


Figura 6 – Resposta imune humoral em camundongos C57BL/6 vacinados com adenovírus recombinantes. Os animais foram vacinados com duas doses de 10^9 p.f.u. de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL, com oito semanas de intervalo entre as doses. Soros coletados 30 dias após a dose vacinal de reforço ou soro coletado antes da imunização foram testados em “Western-blot” contra antígeno total de taquizoítos (TLA). (*), indica banda da proteína SAG1, (**), banda de SAG2, (***) , banda de SAG3. Dados de 4 animais/grupo representativos de dois experimentos de imunização realizados separadamente, nos quais resultados semelhantes foram observados para todos os animais individuais. As setas indicam bandas inespecíficas.

4.2 - Predição dos possíveis epítomos MHC I restritos nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii*.

A doutora Braúlia Costa Caetano durante o seu doutorado no Departamento de Bioquímica e Imunologia dessa instituição havia demonstrado que as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 expressas em adenovírus recombinantes eram imunogênicas para camundongos BALB/c. Entretanto, até o momento, não havia sido realizado o mapeamento de possíveis epítomos presentes nas proteínas estudadas capazes de se ligar ao MHC I e estimular linfócitos T CD8⁺, ativando a produção de IFN- γ . Para avaliar se o protocolo de imunização estava sendo capaz de ativar linfócitos T CD8⁺ de animais das linhagens BALB/c e C57BL/6 foi feito o mapeamento de epítomos MHC I-restritos para os haplótipos H2-L^d, H2-K^d, H2-D^b e H2-K^b, empregando-se o programa de predição SYFPEITHI. Os epítomos contendo nove aminoácidos e que alcançavam “score” superior a 21 foram selecionados para síntese, sendo considerados possíveis ligantes para MHC I nessas linhagens, como demonstrado na tabela 1 abaixo. Nota-se que o programa SYFPEITHI não detectou possíveis peptídeos específicos para o haplótipo H2-D^b ou H2-K^b na proteína SAG2.

Tabela 1 – Epítomos MHC I específicos mapeados nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii*.

Peptídeo	Proteína	Haplótipo	Seqüência	SCORE
SP0534	SAG1	H2-L ^d	TPTENHFTL	22
SP0534	SAG1	H2-D ^b	TPTENHFTL	24
SP0535	SAG2	H2-L ^d	GPSSGSVVF	25
SP0536	SAG3	H2-L ^d	YPESGPVNL	26
SPO537	SAG1	H2-L ^d	DSTLGPVKL	22
SP0540	SAG3	H2-D ^b	SKDANFIEI	25
SP0541	SAG3	H2-D ^b	SGPVNLEVD	23

4.3 - Resposta imune celular nos camundongos vacinados com adenovírus recombinantes AdSAG1, AdSAG2 e AdSAG3.

Para avaliar a capacidade dos adenovírus recombinantes SAG1, SAG2 e SAG3 em ativar células T produtoras de IFN- γ nos animais submetidos ao protocolo de vacinação homólogo foi empregado o ensaio de ELISPOT. Esplenócitos obtidos a partir do isolamento do baço de 2 animais por grupo 2 a 4 semanas após a última dose de adenovírus recombinantes foram submetidos a reestimulação com peptídeos sintéticos MHC I restritos derivados das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3. Os peptídeos SP0534, SP0540 e SP0541 (haplótipo H2-D^b), foram selecionados para os ensaios com camundongos C57BL/6 e os peptídeos SP0534, SP0535, SP0536 e SPO537 (haplótipo H2-L^d) foram utilizados para ensaios com camundongos BALB/c.

Como controles negativos foram empregados esplenócitos reestimulados com o peptídeo H2-L^d-específico TPHPARIGL (SP0542) derivado da β -galactosidase (*lacZ*) de *E. coli* (Ramirez *et al.*, 2000) e esplenócitos sem reestimulação. Não foram identificados peptídeos ligantes de MHC I para haplótipo H2-D^b na proteína SAG2. Sendo assim, para estimulação de esplenócitos dos animais vacinados com AdSAG2 e para estabelecimento de um controle positivo para o ensaio de ELISPOT, foram empregados o TLA e a fração antigênica de membrana F3 como estímulos “in vitro” adicionais.

Os resultados dos ensaios com os peptídeos nos camundongos C57BL/6 (figura 7) mostram que a imunização de animais com AdSAG1 levou a ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ específicas para o epítipo de SAG1 em níveis significativos. Não foi possível detectar uma resposta significativa aos epítopos de SAG3 após a vacinação com AdSAG3. Na tentativa de se realizar uma avaliação mais ampla da resposta de células T (com uma detecção de atividade CD4⁺ e CD8⁺) foram realizados ensaios de ELISPOT empregando o TLA ou fração F3 de membrana como estímulo. No entanto, esse tipo de estímulo gerou uma reação intensa com as concentrações de proteína utilizadas, o que impossibilitou a contagem dos “spots” específicos.

Já os ensaios com camundongos BALB/c demonstraram que o peptídeo SPO534 derivado da proteína SAG1 é capaz de induzir a produção de IFN- γ em níveis significativos nos animais vacinados com AdSAG1. Além disso, tanto a fração

F3 quanto TLA foram capazes de ativar células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ nos três grupos vacinais (Figura 8).

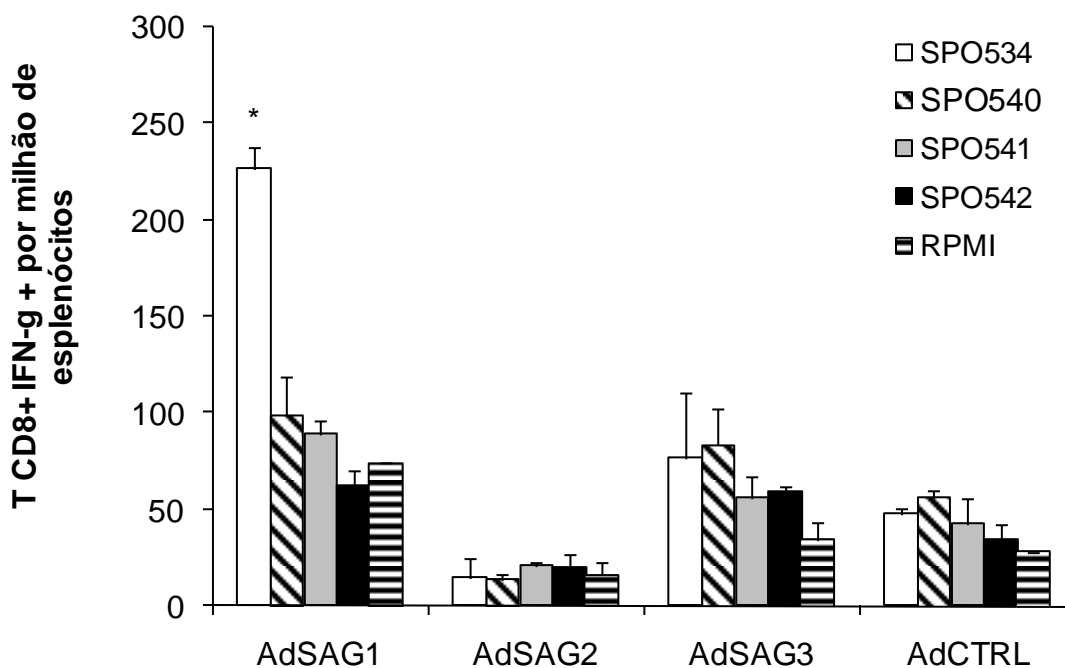


Figura 7 - Resposta imune celular dos animais vacinados com adenovirus recombinantes. Células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ avaliadas através de ensaio de Elispot. Esplenócitos de camundongos C57BL/6 imunizados com duas doses (10^9 pfu, cada) de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL foram coletados após 2 semanas da última imunização e reestimulados “in vitro” com peptídeos sintéticos MHC I restritos. Dados representativos de dois experimentos de vacinação realizados independentemente com resultados semelhantes. As barras verticais representam a média \pm desvio padrão de duplicatas de um “pool” de esplenócitos de dois animais por grupo. Os asteriscos indicam diferença em relação aos grupos controle negativo.

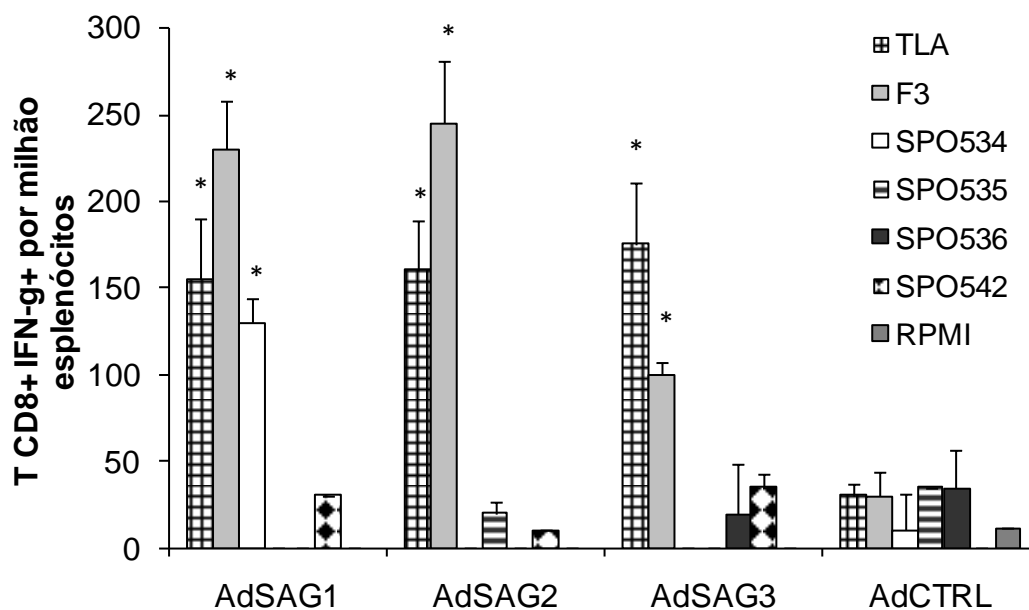


Figura 8 - Resposta imune celular dos animais vacinados com adenovirus recombinantes. Células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ avaliadas através de ensaio de Elispot. Esplenócitos de camundongos BALB/c imunizados com duas doses (10^9 pfu, cada) de AdSAG1, AdSAG2, AdSAG3 ou AdCTRL foram coletados após 2 semanas da última imunização e reestimulados “in vitro” com peptídeos sintéticos MHC I restritos. Dados representativos de dois experimentos de vacinação realizados independentemente com resultados semelhantes. As barras verticais representam a média \pm desvio padrão de duplicatas de um “pool” de esplenócitos de dois animais por grupo. Os asteriscos indicam diferença em relação aos grupos controle negativo.

4.4 - Desafio dos animais vacinados com a cepa ME49 de *T. gondii*.

Para verificar se a resposta imune contra SAG1, SAG2 e SAG3 induzida pela vacinação com adenovírus recombinantes foi capaz de gerar proteção contra a infecção com *T. gondii*, um grupo de seis camundongos C57BL/6 imunizados foi desafiado com a cepa ME49. A infecção dessa cepa, nessa linhagem de camundongos, é caracterizada por uma fase aguda, na qual pode ocorrer uma alta taxa de mortalidade; e por uma fase crônica em que se observa a formação de cistos teciduais em vários órgãos, inclusive no cérebro. O desafio com a cepa ME49 foi realizado pela administração de 10 cistos por meio de gavagem gástrica duas semanas após a dose reforço. Cerca de quarenta e cinco dias após desafio, os animais sobreviventes da fase aguda foram sacrificados para contagem da carga de cistos cerebrais.

A figura 9 A mostra que a vacinação com adenovírus recombinantes resultou numa sobrevivência de 77% dos animais vacinados com AdSAG1, 37% dos animais que receberam AdSAG2, 33% dos imunizados com AdSAG3 e 14% dos animais do grupo AdCTRL. A vacinação com AdSAG1 também levou a uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de cistos cerebrais desses animais em relação ao grupo controle AdCTRL, o mesmo não ocorrendo para os animais vacinados com AdSAG2 e AdSAG3 (figura 9 B).

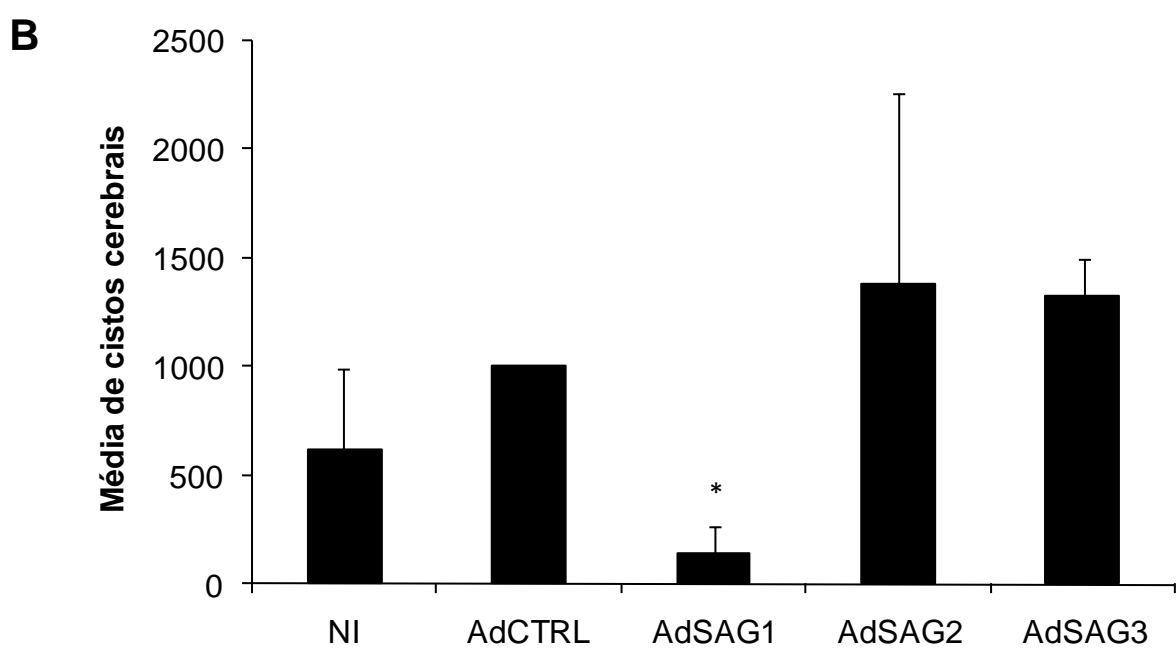
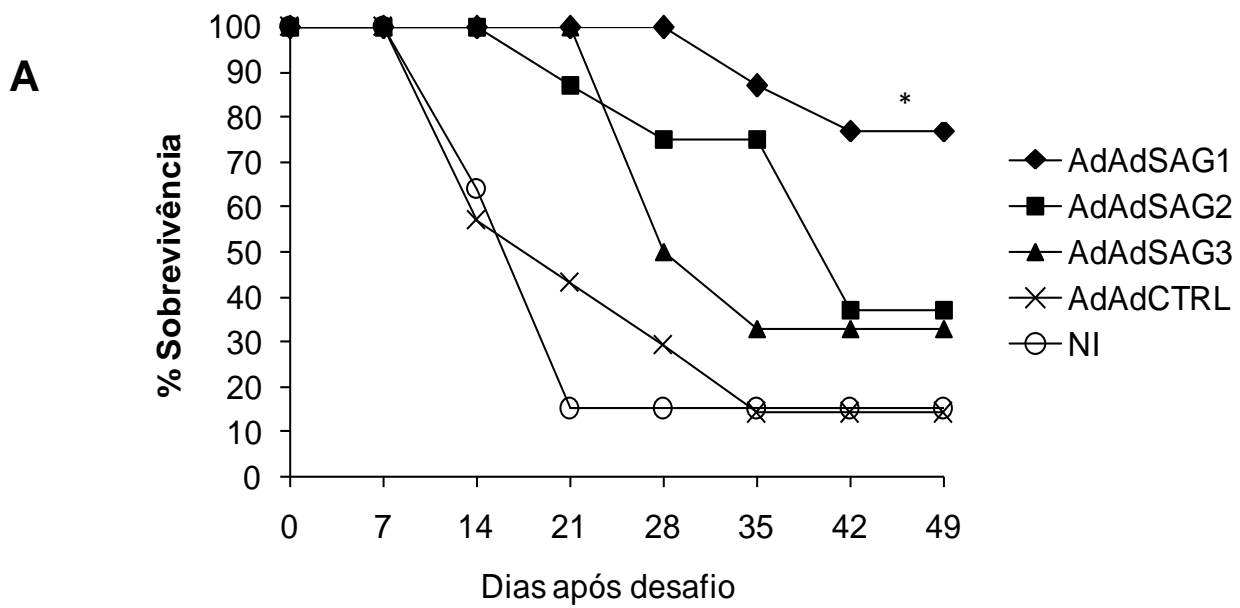


Figura 9 – Ensaio de proteção com camundongos C57BL/6 vacinados com duas doses de adenovírus recombinantes e desafiados com a cepa ME49 de *T. gondii*. A, curva de sobrevivência; B, média de cistos cerebrais. Representativo de dois experimentos realizados independentemente com sete animais/grupo e com resultados semelhantes.

4.5 - Geração dos MVA recombinantes com genes SAG1 e SAG2 de *T. gondii*.

Os genes que codificam para as proteínas SAG1 e SAG2 de *T. gondii* sem a porção correspondente à âncora de glicosilfosfatidilinositol responsável pelo ancoramento dessas proteínas na membrana do parasita (*SAG1ΔGPI*, *SAG2ΔGPI*) foram clonados no vetor de transferência pLW44 para construção dos MVAs recombinantes. Os genes *SAG1ΔGPI* e *SAG2ΔGPI* foram retirados dos vetores pAdSAG1 e pAdSAG2 utilizando-se as enzimas de restrição *Bgl*II e *Hind*III. Em seqüência, os fragmentos acima obtidos foram tratados com enzima T4 polimerase e inseridos no pLW44 dentro do sítio de *Sma*I. Para verificar se os genes haviam sido corretamente inseridos no pLW44, procedeu-se à digestão de vários clones dos construtos com enzimas de restrição. Para a construção pLW44-SAG1 foram utilizadas as enzimas *Xho*I e *Bam*HI originando os fragmentos de 5169, 527 e 262pb. Para o recombinante pLW44-SAG2 empregou-se *Eco*RI e *Bgl*II o que gerou os fragmentos de 3756 e 1797pb (figura 10).

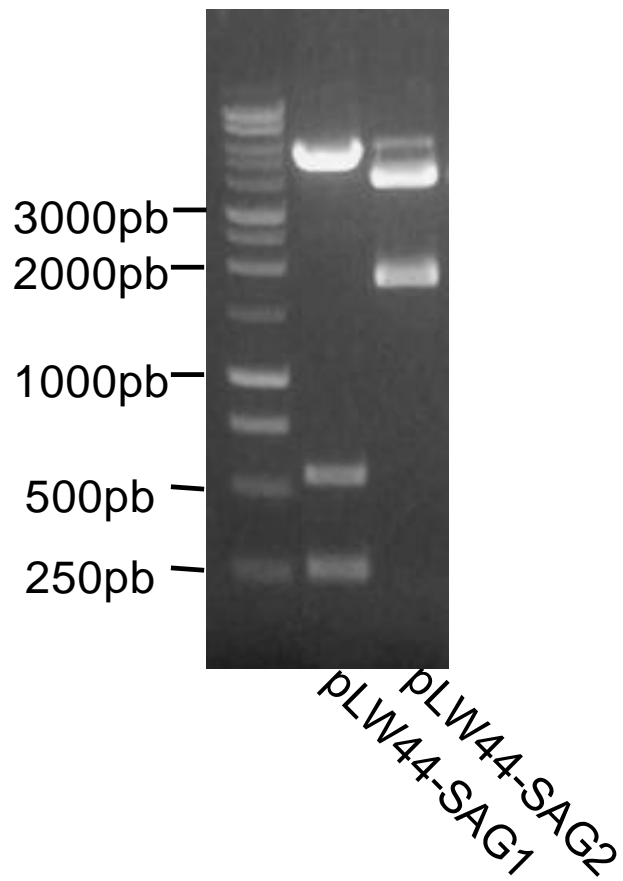


Figura 10 - Clonagem dos genes *SAG1* e *SAG2* no vetor pLW44 para construção dos MVAs recombinantes. Perfil de digestão das construções pLW44-SAG1 e pLW44-SAG2 para confirmar a presença dos insertos.

A capacidade dos MVA recombinantes em induzir a expressão das proteínas foi verificada por meio de “Western-blot”, no qual extratos de células CEF infectadas com os vírus MVA-SAG1 ou MVA-SAG2 durante 48 horas, com uma m.o.i. mínima de 1, foram testados contra soro de camundongos BALB/c imunizados com adenovírus recombinantes para as respectivas proteínas. A infecção com os dois recombinantes levou a uma intensa expressão das proteínas, que reagem prontamente e com grande especificidade com o soro do animal (figura 11).

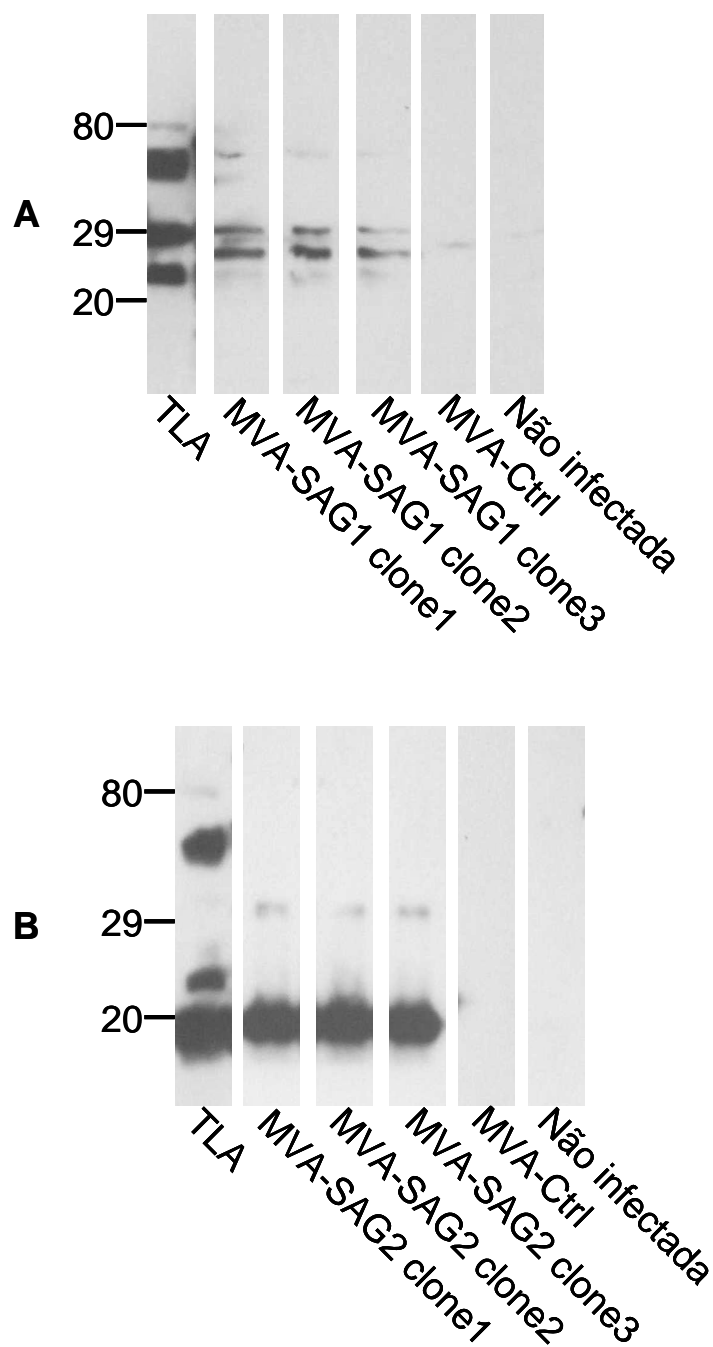


Figura 11 – Expressão dos antígenos SAG1 (A) e SAG2 (B) de *T. gondii* em MVA recombinante. Amostras de CEFs infectadas com diferentes MVAs recombinantes foram testadas em “Western-blot” contra soro de camundongos vacinados com adenovírus recombinantes expressando os respectivos antígenos.

5. DISCUSSÃO

Diversos modelos experimentais têm sido gerados na tentativa de se obter um protocolo de imunização eficiente e seguro contra a toxoplasmose. Alguns desses propõem a utilização de vetores plasmidiais ou proteínas do *T. gondii* expressas de forma recombinante (Couper *et al.*, 2003; Letscher-Bru *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 1999). A maioria desses modelos é capaz de gerar níveis significativos de proteção contra a infecção, no entanto, muitos desses protocolos possuem determinados inconvenientes que limitam sua utilização. Com relação às vacinas de DNA, existe a possibilidade de integração do mesmo no genoma do hospedeiro ou o desenvolvimento de doenças auto-imunes devido à indução de resposta anti-DNA (Isagulians *et al.*, 2004). Por outro lado, as proteínas recombinantes têm capacidade limitada de indução de respostas imunes, e a maioria dos protocolos que as empregam necessitam de adjuvantes para a ativação do sistema imune em níveis significativos (Leclerc, 2003; Letscher-Bru *et al.*, 1998).

Nesse contexto, em que se procura aliar a alta imunogenicidade com utilização segura, os adenovírus recombinantes aparecem como uma alternativa viável para desenvolvimento de uma vacina contra toxoplasmose. Já foi observado em outros modelos como o Ebola (Sullivan *et al.*, 2003), HIV (Cassimiro *et al.*, 2003; Mooij & Heeney, 2001) e *Plasmodium* (Bruna-Romero *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2002) que os adenovírus são capazes de ativar uma forte resposta mediada por células T CD8⁺ com atividade citotóxica, o que torna esses vetores ideais para indução de proteção contra parasitas intracelulares tais como o *T. gondii*. Os adenovírus utilizados como vetores de vacinação são modificados para se tornarem deficientes em replicação e incapazes de se propagarem em células de mamíferos. Além disso, já foi demonstrado que o genoma viral não se integra ao genoma celular e que as infecções por adenovírus podem ser eliminadas em até 30 dias (Yang *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995). Ainda mais, esses vírus são capazes de induzir alta expressão do transgene, tanto “in vivo” quanto “in vitro”, sendo capazes de superar os níveis de expressão dos transgenes se comparados com outros métodos de vacinação, como plasmídios (Mittal *et al.*, 2001).

No presente trabalho, três adenovírus codificando as proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 de *T. gondii* foram empregados para vacinação de camundongos BALB/c e C57BL/6. Reações de Western-blot mostraram que os recombinantes contendo os genes SAG1 (AdSAG1) e SAG3 (AdSAG3) foram capazes de gerar resposta imune humoral, com produção de IgG anti-SAG específica em todos os animais da linhagem C57BL/6 analisados. No caso dos animais vacinados com AdSAG2 apenas 50% dos animais analisados apresentaram reatividade específica. Esse último resultado difere do observado em estudo anterior realizado em nosso laboratório (Caetano *et al.*, 2006), no qual a vacinação de camundongos BALB/c com a mesma dose do AdSAG2 resultou em 100% de reatividade dos soros testados. Esse fato poderia estar relacionado com a capacidade diferencial dos camundongos C57BL/6 em responder a proteína SAG2 ou a uma falha do protocolo ao se imunizar os animais desse grupo.

A indução de anticorpos específicos não parece ser um mecanismo essencial para proteção contra a toxoplasmose aguda, tendo em vista que, em vários estudos de vacinação, a presença de anticorpos específicos contra proteínas de *T. gondii* não se correlaciona com a proteção contra a infecção com a cepa RH – que causa infecções agudas com alto nível de proliferação de taquizoítos (Liu *et al.*, 2006). No entanto, alguns estudos indicam que a presença de anticorpos pode auxiliar no controle da patologia durante a fase crônica da toxoplasmose, sendo que esses possivelmente atuam opsonizando os parasitas que são liberados a partir dos cistos (Kang *et al.*, 2000). De fato, no presente estudo, a presença de anticorpos anti-SAG1 pode estar relacionada com a redução na carga parasitária (número de cistos cerebrais) em animais vacinados com AdSAG1.

O desenvolvimento de uma resposta imune celular, com ativação de células T CD8⁺ e T CD4⁺ é o requisito essencial para se obter proteção contra a infecção por *T. gondii*. Os linfócitos T CD8⁺ são responsáveis pelo reconhecimento e eliminação das células parasitadas (Denkers, 1999), enquanto que as células CD4⁺ participam da ativação e manutenção da população de células CD8⁺ mediante a secreção de citocinas, como IL-2 e IFN- γ (Denkers & Gazzinelli, 1998). O IFN- γ ativa a síntese de quimiocinas envolvidas no recrutamento de linfócitos T; atua como cofator da IL-12 na diferenciação de células Th0 em células efetoras Th1 (Gazzinelli *et*

al., 1996) e induz a expressão de receptores de IL-12 em células T (Seder *et al.*, 1993).

Para a avaliação da ativação de linfócitos T CD8⁺ nos animais vacinados com adenovírus recombinantes foi feito um mapeamento de possíveis epítopos ligantes de MHC I nas proteínas SAG1, SAG2 e SAG3 tanto para camundongos BALB/c quanto C57BL/6. Aplicando o programa de predição de epítopos SYFPEITHI, e obedecendo ao “score” mínimo de 21 para seleção de um peptídeo, foram encontrados dois nãoâmeros candidatos a epítopos na proteína SAG1, sendo um deles comum para as duas linhagens de camundongos (SP0534), um possível ligante em SAG2 em camundongos BALB/c (SP0535) e três possíveis ligantes na proteína SAG3, sendo dois para C57BL/6 (SP0540 e SP0541) e um para BALB/c (SP0536). A proteína SAG2 não apresentou seqüências peptídicas que atingissem o score mínimo para seleção em C57BL/6.

A vacinação de camundongos C57BL/6 com o AdSAG1 promoveu a ativação de linfócitos T CD8⁺ que respondem especificamente ao epítipo identificado na proteína SAG1 para esses animais (SP0534). Entretanto, a estimulação “in vitro” de esplenócitos dos animais vacinados com AdSAG3 pelos peptídeos correspondentes a epítopos MHC I-restritos da proteína SAG3 não gerou uma resposta significativa. Esse resultado pode refletir duas possibilidades: em primeiro lugar o protocolo de vacinação falhou em ativar linfócitos T CD8⁺ específicos; em segundo lugar, a ativação de CD8⁺ ocorreu após a vacinação, mas não foi detectada no ELISPOT pela utilização de peptídeos inadequados, que não representam epítopos imunogênicos que sejam efetivamente apresentados “in vivo” nessa linhagem de camundongos. Para elucidar essa questão, pretende-se realizar ensaios em que os peptídeos serão testados contra esplenócitos de animais infectados com *T. gondii*. Em relação à vacinação dos camundongos BALB/c, foi possível detectar ativação de linfócitos e produção de IFN- γ nos três grupos vacinais, cujos esplenócitos foram reestimulados com TLA ou F3. Além disso, como demonstrado no ensaio de ELISPOT, um peptídeo SAG1 (SP0534) foi capaz de gerar resposta significativa de linfócitos T CD8⁺ no respectivo grupo vacinal, levando a produção de IFN- γ .

O mapeamento de epítomos é importante não apenas para a avaliação da resposta celular frente à vacinação. Ele também proporciona uma metodologia alternativa para criação de imunógenos. Conhecendo-se os epítomos relacionados com a ativação de células com atividade protetora, é possível criar-se novos vetores que carreguem as seqüências codificadoras de tais peptídeos, organizadas de forma a serem preferencialmente processadas e apresentadas (Rolph & Ramshaw, 1997). Dessa forma, é possível construir cadeias de poliepítomos que agreguem seqüências imunogênicas de proteínas variadas do mesmo patógeno, eliminando-se a necessidade de se gerar muitos vetores individuais, cada um carregando a seqüência de um gene completo. Estratégias como essa têm sido empregadas na tentativa de se criar vacinas contra bactérias (Olive *et al.*, 2006), contra malária (Benmohamed *et al.*, 2004; Bharadwaj *et al.*, 1998) e muitas outras doenças.

A ativação da resposta imune humoral e celular nos animais C57BL/6 vacinados com AdSAG1 relacionou-se com a proteção contra desafio com uma dose letal da cepa ME49, havendo uma redução na taxa de mortalidade e no número de cistos cerebrais. Resultados semelhantes aos observados aqui podem ser encontrados em outros modelos de vacinação que empregaram plasmídeos recombinantes contendo o gene SAG1 (Angus *et al.*, 2000; Mohamed *et al.*, 2003). Nesses modelos, a vacinação de animais C57BL/6 por via intramuscular resultou na proteção contra mortalidade após inoculação de doses letais da cepa ME49 ou na redução da carga parasitária dos animais infectados com a cepa Fukaya.

Em experimento realizado anteriormente no nosso laboratório por Caetano e colaboradores (2006) observou-se que a vacinação com os três adenovírus recombinantes, e não apenas com o AdSAG1, foi capaz de induzir resposta imune e redução da carga de cistos cerebrais em camundongos BALB/c desafiados com a cepa P-Br. A diferença entre estes dois estudos pode estar relacionada com a variedade genética das linhagens de camundongos utilizados nos experimentos de vacinação e com a capacidade destes animais em responderem a cada um dos antígenos. Como evidenciado nos ensaios de “Western-blot”, apenas a metade dos camundongos C57BL/6 produzem anticorpos anti-SAG2 após a vacinação com AdSAG2. Além disso, uma tentativa de mapear na SAG2 epítomos MHC I específicos para o haplótipo daqueles animais falhou em demonstrar a presença de peptídeos

passíveis de serem apresentados “in vivo” para a ativação de células T CD8⁺. Com relação à resposta anti-SAG3, o que se observou foi que, a despeito de uma resposta intensa de produção de anticorpos não houve detecção de células T ativadas. A falta de atividade de células T CD8⁺ poderia ser um fator preponderante para não se alcançar proteção após a vacinação. De qualquer forma, ainda fica por definir se a falta de atividade de células T CD8⁺ é uma consequência da falha no protocolo de imunização ou se é resultado de uma incapacidade intrínseca dos camundongos em responder aos antígenos SAG2 e SAG3.

Não é possível comparar os resultados dos dois estudos de vacinação com os adenovírus SAG-recombinantes em termos de eficiência de proteção contra toxoplasmose, dado que eles envolvem dois modelos desenvolvidos com duas cepas diferentes de *T. gondii* e duas linhagens de camundongos, as quais apresentam graus de susceptibilidade diferentes ao parasita. A cepa ME49 exibe alta virulência em camundongos C57BL/6, diferentemente da cepa P-Br, que é pouco virulenta, seja para camundongos BALB/c ou C57BL/6 (Fux *et al.*, 2003). O desafio oral com a cepa ME49 em camundongos C57BL/6 é seguido de uma rápida proliferação de taquizoítos no nível da mucosa do intestino delgado, o que desencadeia uma resposta inflamatória intensa, com lesões necróticas que levam a morte em torno de 2 a 3 semanas após a infecção (Liesenfeld, 2002). A infecção pela cepa P-Br é mais branda, sendo que os animais sobrevivem à fase aguda, e estabelecem infecções crônicas. Os resultados de Caetano e colaboradores (2006) mostraram que a vacinação com AdSAG1, AdSAG2 ou AdSAG3 levou a uma redução significativa no desenvolvimento de cistos cerebrais nos camundongos vacinados. A redução na quantidade de cistos variou de 50 – 60% nos grupos vacinados com AdSAG1, 60 – 70% nos vacinados com AdSAG2, 70% com AdSAG3. Dessa maneira pode-se afirmar que o AdSAG1 mostrou um maior grau de imunogenicidade, sendo capaz de induzir proteção contra a mortalidade e a formação de cistos cerebrais tanto em animais altamente susceptíveis quanto naqueles resistentes ao parasita inoculados com duas diferentes cepas de *T. gondii*.

Os resultados apresentados anteriormente e dados obtidos em literatura indicam que os adenovírus recombinantes apresentam um grande potencial para futura utilização como uma vacina contra parasitas intracelulares, inclusive o *T.*

gondii. Entretanto, algumas questões importantes relacionadas à eficiência dos protocolos de imunização devem ser levadas em consideração. Um ponto importante que é constantemente levantado no que diz respeito à aplicação de adenovírus como vetor vacinal é o fato do sorotipo 5 – o mais amplamente utilizado em protocolos de imunização – ser amplamente distribuído dentro da população humana, a qual apresenta alto índice de anticorpos neutralizantes contra o mesmo. Tais anticorpos impediriam a transdução eficiente das células hospedeiras após a administração do vetor e, conseqüentemente, a adequada expressão e apresentação de antígenos. Sendo assim, a eficácia esperada para a vacinação com um vetor recombinante é altamente variável dependendo do nível de imunidade preexistente (Bangari & Mittal, 2006).

Na tentativa de se escapar desse problema, diversas estratégias têm sido utilizadas, dentre elas, a administração de adenovírus recombinantes baseados em sorotipos raros, como o Ad35 (Barouch *et al.*, 2004); utilização de vetores adenovirais não humanos (revisado em Bangari & Mittal, 2006); construção de vetores que apresentam modificações na superfície, como nas fibras (Krasnykh *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2006).

Por outro lado, já foi demonstrado que para a ativação da resposta imune contra um determinado parasita em níveis ótimos, capazes de gerar proteção contra infecção, é necessária a utilização de protocolos de imunização com múltiplas doses do vetor recombinante. Isso traz de volta o problema da imunidade antivector que é induzida após a primeira dose. Nesse caso, a utilização de protocolos de imunização do tipo iniciação/reforço heterólogo com diferentes vetores recombinantes contendo o mesmo transgene tem sido a alternativa mais explorada para contornar esse problema. Os protocolos heterólogos mais comuns empregam DNA plasmidial combinado com vetores virais, ou usam dois tipos vetores virais diferentes como Vaccinia, o “Modified Vírus Ankara” (MVA) ou o vírus Influenza (Gilbert *et al.*, 2002; Horimoto *et al.*, 2006; Maeda *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 1989).

Os protocolos de imunização heterólogos têm sido cada vez mais utilizados devido à habilidade dos mesmos de gerarem fortes respostas imunes quando comparado àqueles protocolos homólogos. Já foi demonstrado que imunização com DNA seguida por reforço com adenovírus aumenta a resposta imune em relação à

imunização somente com DNA (Shiver, 2002; Sullivan, 2000). Experimentos de Maeda *et al.* (2005) demonstraram que a resposta imune elicitada contra a nucleoproteína do capsídio do Sin Nombre vírus foi superior quando o protocolo de imunização incluía adenovírus recombinante.

MVAs recombinantes representam uma ferramenta vacinal promissora. Já foi demonstrado que o MVA é avirulento, mesmo para animais imunocomprometidos (Moss, 1996). A utilização de estratégias de imunização do tipo dose/reforço com MVA demonstrou ser capaz de elicitar uma resposta de anticorpos e CTLs em vários testes pré-clínicos contra uma série de doenças. Alguns exemplos incluem a imunização eficaz de camundongos e macacos em modelos de vacinação contra o vírus dengue tipo 2, levando a produção de anticorpos que reduziram a viremia e protegeram os animais contra o desafio (Men *et al.*, 2000). Estudos de Wyatt *et al.* (1996) demonstraram que a inoculação de MVA recombinante expressando hemaglutinina do vírus parainfluenza 3 pelas rotas intranasal e intramuscular produziram altos níveis de anticorpos, também sendo capazes de reduzir a viremia nos pulmões e turbinas nasais de ratos. O MVA clonado com os genes CSP ou TRAP de *P. berghei* também tem sido empregado em estratégias de vacinação heteróloga de camundongos, como dose de reforço, contra a malária (revisado por Moore & Hill, 2004). A administração de uma dose de “priming” a camundongos BALB/c e C57BL/6 altamente susceptíveis, seguida de uma dose “booster” com MVA codificando os mesmos antígenos resultou em 100% de proteção dos animais, demonstrando a eficiência desse tipo de protocolo para geração de proteção contra o desafio. A análise da resposta celular contra a proteína CSP, por meio de ELISPOT, demonstrou que esse regime de imunização é o mais eficiente na ativação de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Moore & Hill, 2004).

Os dados anteriormente mostrados indicam que a utilização de MVAs recombinantes com genes que codificam proteínas de *T. gondii* pode ser uma alternativa para desenvolvimento de novos protocolos de imunização contra a toxoplasmose no modelo que tem sido estudado em nosso laboratório. Nesse contexto, dois novos recombinantes contendo os genes SAG1 (MVA-SAG1) e SAG2 (MVA-SAG2) foram gerados e estão em processo de propagação em cultivos de CEFs. Um terceiro MVA recombinante contendo o gene SAG3 se encontra em

desenvolvimento. Após a purificação e obtenção de estoques com títulos adequados, os MVAs SAG-recombinantes serão empregados em protocolos heterólogos, em combinação com os adenovírus anteriormente testados.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente trabalho mostra a utilização de adenovírus recombinantes na vacinação de camundongos BALB/c resistentes e C57BL/6 altamente susceptíveis ao *T. gondii*. Verificou-se que o AdSAG1 apresentou o maior grau de imunogenicidade, sendo capaz de ativar resposta imune humoral e celular específicas e proteger os animais da linhagem C57BL/6 contra um desafio com uma dose letal de parasitas vivos.

Os resultados aqui apresentados se mostram bastante promissores, mas algumas questões relacionadas à ativação de linfócitos T ainda permanecem a serem estudadas. Um dos objetivos futuros do trabalho seria aprofundar os estudos de definição dos epítopos MHC-I-restritos das proteínas SAG1, SAG2 e SAG3. Para isso, os peptídeos previamente identificados serão testados em ensaios de ELISPOT contra esplenócitos de animais infectados com *T. gondii*. Além disso, pode-se realizar a predição de novos epítopos MHC-I-restritos, além dos que já estão em estudo, por meio da utilização de outros programas alternativos ao SYFPEITHI.

Na medida em que forem identificados epítopos que sejam efetivamente capazes de ativar linfócitos – especialmente no caso da SAG2 – novos experimentos de ELISPOT para medição da resposta imune celular dos camundongos BALB/c e C57BL/6 vacinados com adenovírus recombinantes também poderão ser realizados. Além disso, pretende-se realizar novos ensaios de imunização para verificar se o protocolo de imunização é capaz de reduzir a carga parasitária de animais da linhagem BALB/c inoculados com a cepa ME49.

Por outro lado, pretende-se aplicar os MVAs gerados recentemente em protocolos de imunização heterólogos em combinação com os adenovírus recombinantes, no intuito de se tentar aumentar o nível de proteção observado após o desafio dos animais com cepas do parasita *T. gondii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J., JEBBARI, H., BLUETHMANN, H., SATOSKAR, A., ROBERTS, C.W. (1996). Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. *Curr Top Microbiol Immunol* **219**, 183-195.

ANGUS, C.W., KLIVINGTON-EVANS, D., DUBEY, J.P., KOVACS, J.A. (2000). Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis* **181**, 317-324.

BABIUK, L.A. & TIKOO, S.K. (2000). Adenoviruses as vectors for delivering vaccines to mucosal surfaces. *J Biotechnol* **83**, 105-113.

BANGARI, D.S. & MITTAL, S.K. (2006). Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. *Vaccine* **24**, 849-862.

BAROUCH, D.H., PAU, M.G., CUSTERS, J.J.J.V., KOUDSTAAL, W., KOSTENSE, S., HAVENGA, M.J.E., TRUITT, D.M., SUMIDA, S.M., KISHKO, M.G., ARTHUR, J.C., KORIOH-SCHMITZ, B., NEWBERG, M.H., GORGONE, D.A., LIFTON, M.A., PANICALI, D.L., NABEL, G.J., LETVIN, N.L., GOUDSMIT, J. (2004). Immunogenicity of recombinant adenovirus serotype 35 vaccine in the presence of pre-existing anti-Ad5 immunity. *J Immunol* **172**, 6290-6297.

BENMOHAMED, L., THOMAS, A., DRUILHE, P. (2004). Long-term multiepitopic cytotoxic-T-lymphocyte responses induced in chimpanzees by combinations of *Plasmodium falciparum* liver-stage peptides and lipopeptides. *Infect Immun* **72**, 4376-4384.

BHARADWAJ, A., SHARMA, P., JOSHI, S.K., SINGH, B., CHAUHAN, V.S. (1998). Induction of protective immune responses by immunization with linear multiepitope peptides based on conserved sequences from *Plasmodium falciparum* antigens. *Infect Immun* **66**, 3232-3241.

BHOPALE, G.M. (2003). Development of a vaccine for toxoplasmosis: current status. *Microbes Infect* **5**, 457-462.

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.

BOOTHROYD, J.C., HEHL, A., KNOLL, L.J., MANGER, I.D. (1998). The surface of *Toxoplasma*: more and less. *Int J Parasitol* **28**, 3-9.

BROWN, C.R. & MCLEOD, R. (1990). Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection. *J Immunol* **145**, 3438-3441.

BRUÑA-ROMERO, O., LASARTE, J.J., WILKINSON, G., GRACE, K., CLARKE, B., BORRAS-CUESTA, F., PRIETO, J. (1997). Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* **25**, 470-477.

BRUÑA-ROMERO, O., GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G., HAFALLA, J.C., TSUJI, M., NUSSENZWEIG, R.S. (2001). Complete, long-lasting protection against malaria of mice primed and boosted with two distinct viral vectors expressing the same plasmodial antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 11491-11496.

BUXTON, D., & INNES, E.A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* **110**, S11-16.

CAETANO, B.C., BRUÑA-ROMERO, O., FUX, B., MENDES, E.A., PENIDO, M.L.O., GAZZINELLI, R.T. (2006). Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Hum Gen Ther* **17**, 415-426.

CARVALHO, L.H., HAFALLA, J.C., ZAVALA, F. (2001). ELISPOT assay to measure antigen-specific murine CD8+ T cell responses. *J Immunol Methods* **252**, 207-218.

CASIMIRO, D.R., CHEN, L., FU, T.M., EVANS, R.K., CAULFIELD, M.J., DAVIES, M.E., TANG, A., CHEN, M., HUANG, L., HARRIS, V., FREED, D.C., WILSON, K.A., DUBEY, S., ZHU, D.M., NAWROCKI, D., MACH, H., TROUTMAN, R., ISOPI, L., WILLIAMS, D., HURNI, W., XU, Z., SMITH, J.G., WANG, S., LIU, X., GUAN, L., LONG, R., TRIGONA, W., HEIDECKER, G.J., PERRY, H.C., PERSAUD, N., TONER, T.J., SU, Q., LIANG, X., YOUIL, R., CHASTAIN, M., BETT, A.J., VOLKIN, D.B., EMINI, E.A., SHIVER, J.W. (2003). Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* **77**, 6305-6313.

COELHO, R. A.L., KOBAYASHI, M., CARVALHO JR., Luiz B. (2003). Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* **45**, 229-231.

COMBE, C.L., CURIEL, T.J., MORETTO, M.M., KHAN, I.A. (2005). NK cells help to induce CD8+ T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4+ T cell. *Infect Immun* **73**, 4913-4921.

COUPER, K.N., NIELSEN, H.V., PETERSEN, E., ROBERTS, F., ROBERTS, C.W., 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.

COUVREUR, J., THULLIEZ, P., DAFFOS, F., AUFRANT, C., BOMPARD, Y., GESQUIERE, A., DESMONTS, G. (1993). In utero treatment of toxoplasmic fetopathy with the combination pyrimethamine-sulfadiazine. *Fetal Diagn Ther* **8**, 45-50.

D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N.M., MA, X., KUBIN, M., TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* **178**, 1041-1048.

DARDÉ, M-L. (2004). Genetic analysis of diversity in *Toxoplasma gondii*. *Ann 1st Super Sanità* **40**, 57-63.

DEBARD, N., BUZONI-GATEL, K., 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. *Infec Immun* **64**, 2158-2166.

DE MEDEIROS, B.C, MEDEIROS, C.R., WERNER, B., LODDO, G., PASQUINI, R., BIRGGI-TORRES, L.F. (2001) Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transpl Infect Dis* **3**, 24-28.

DENKERS, E. Y. (1999). T lymphocyte-dependent effector mechanism of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microb Infec* **1**, 699-708.

DENKERS, E.Y. & GAZZINELLI, R.T. (1998). Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* **11**, 569-588.

DREXLER, I., STAIB, C., SUTTER, G. (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery sistem: how ca we best use its potential? *Curr Op Biotec* **15**, 506-512.

DUBEY, J.P. (1996). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and human. *Vet Parasitol* **64**, 65-70.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S., SPEER, C.A. (1998). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev **11**, 267-299.

DUBEY, J.P. (2004). Toxoplasmosis - a waterborne zoonosis. Vet Parasitol **126**, 57-72.

DZIERSZINSKI, F., MORTUAIRE, M., CESBRON-DELAUW, M.F., TOMAVO, S. (2000). Target disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. Mol Microbiol **37**, 574-582.

FERREIRA, M.S., & BORGES, A.S. (2002). Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz **97**, 443-457.

FUX, B., RODRIGUES, C.V., PORTELA, R.W., SILVA, N.M., SU, C., SIBLEY, D., VITOR, R.W.A., GAZZINELLI, R.T. (2003). Role of cytokines and major histocompatibility complex restriction in mouse resistance to infection with a natural recombinant strain (type I-III) of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun **71**, 6392-6401.

GAZZINELLI, R.T., HAKIM, F.T., HIENY, S., SHEARER, G.M., SHER, A. (1991). Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol **146**, 286-292.

GAZZINELLI, R., XU, Y., HIENY, S., CHEEVER, A., SHER, A. (1992). Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol **149**, 175-180.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENY, S., CASPAR, P., TRINCHIERI, G., and SHER, A. (1994). Parasite-induced IL-12

stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol **153**, 2533-2543.

GAZZINELLI, R.T., AMICHAY, D., SHARTON-KERSTEN, T., GRUNWALD, E., FARBER, J.M., 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.

GILBERT, S.C., SCHNEIDER, J., HANNAN, C.M., HU, J. T., PLEBANSKI, M., SINDEN, R., HILL, A.V.S. (2002). Enhanced CD8+ T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunization regimes. Vaccine **20**, 1039-1045.

GIRALDO, M., CANNIZZARO, H., FERGUSON, M.A., ALMEIDA, I.C., GAZZINELLI, R.T. (2000). Fractionation of membrane components from tachyzoite forms of *Toxoplasma gondii*: differential recognition by immunoglobulin M (IgM) and IgG present in sera from patients with acute or chronic toxoplasmosis. J Clin Microbiol **38**, 1453-1460.

GISENBERG, H.S., HORSWOOD, R.L., CHANOCK, R.M., PRINCE, G.A. (1990). Role of early genes in pathogenesis of adenovirus pneumonia. Proc Natl Acad Sci USA **87**, 6191-6195.

GISENBERG, H.S., MOLDAWER, L.L., SEHGAL, P.B., REDINGTON, M., KILIAN, P.L., CHANOCK, R.M., PRINCE, G.A. (1991). A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. Proc Natl Acad Sci USA **88**, 1651-1655.

GRAHAM, F.L., SMILEY, J., RUSSELL, W.C., NAIRN, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol **36**, 59-74.

HANKE, T., SAMUEL, R.V., BLANCHARD, T.J., NEUMANN, V.C., ALLEN, T.M., BOYSON, J.E., SHARPE, S.A., COOK, N., SMITH, G.L., WATKINS, D.I., CRANAGE, M.P., MCMICHAEL, A.J. (1999) Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus ankara boost vaccination regimen. *J Virol* **73**, 7524-7532.

HODGE, J.W., POOLE, D.J., AARTS, W.M., YAFAL, A.G., GRITZ, L., SCHLOM J. (2003). Modified vaccinia virus Ankara recombinants are as potent as vaccinia recombinants in diversified prime and boost vaccine regimens to elicit therapeutic antitumor responses. *Cancer Reser* **63**, 7942-7949.

HORIMOTO, T., TAKADA, A., FUJII, K., GOTO, H., HATTA, M., WATANABE, S., IWATSUKI-HORIMOTO, K., ITO, M., TAGAWA-SAKAI, Y., YAMADA, S., ITO, H., ITO, T., IMAI, M., ITAMURA, S., ODAGIRI, T., TASHIRO, M. LIM, W., GRAN. Y., PEIRIS, M., KAWAOKA, Y. (2006). The development and characterization of H5 influenza virus vaccines derived from a 2003 human isolate. *Vaccine* **24**, 3669-3676.

HOWELL M.R., NANG, R.N., GAYDOS, C.A., GAYDOS, J.C. (1998). Prevention of adenoviral acute respiratory disease in Army recruits: cost-effectiveness of a military vaccination policy. *Am J Prev Med* **14**, 168-175.

IMLER, J-L (1995). Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* **13**, 1143-1151.

ISAGULIANTS, M.G., IAKIMTCHOUK, K., PETRAKOVA, N.V., YERMALOVICH, M.A., ZUBER, A.K., KASHUBA, V.I., BELIKOV, S.V., ANDERSSON, S., KOCHETKOV, S.N., KLINMAN, D.M., WAHREN, B. (2004). Gene immunization may induce secondary antibodies reacting with DNA. *Vaccine* **22**, 1576-1585.

JENKINS, M.C. (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance. *Vet Parasitol* **101**, 291-310.

JOHNSON, L.L. & SAYLES, P.C. (2002). Deficient humoral responses underlie susceptibility to *Toxoplasma gondii* in CD4-deficient mice. *Infect Immun* **70**, 185-191.

KANG, H., REMINGTON, J.S., SUSUKI, Y. (2000) Decreased resistance of B-cell deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN-g, TNF-alpha and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* **164**, 2629-2634.

KRASNYKH, V.N, MIKHEEVA, G.V., DOUGLAS, J.T., CURIEL, D.T. (1996). Generation of recombinant adenovirus vectors with modified fibers for altering viral tropism. *J Virol* **70**, 6839-6846.

KRAVETZ, J. & FEDERMAN, D. (2005). Toxoplasmosis in pregnancy. *Am J Med* **118**, 212-216.

KAWAZOE, U. (2002). *Toxoplasma gondii*. In: *Parasitologia Humana*. NEVES, D.P. (ed). Atheneu, Rio de Janeiro, pp. 147-156.

LECLERC, C. (2003). New approaches in vaccine development. *Comp Immun Microb Infec Dis* **26**, 329-334.

LEKUTIS, C., FERGUSON, D.J., GRIGG, M.E., CAMPS, M., BOOTHROYD, J.C. (2001). Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int J Parasitol* **31**, 1285-1292.

LETSCHER-BRU, V., VILLARD, O., RISSE, B., ZAUKE, M., KLEIN, J.P., KIEN, T.T. (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.

LIESENFELD, O. (2002). Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J Infect Dis* **185**, 96-101.

LIU, K.Y., ZHANG, D.B., WEI, Q.K., LI, J., LI, G.P., YU, J.Z. (2006). Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *W J Gastroenterol* **12**, 2363-2368.

LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. (1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* **5**, 211-222.

LUKASHOK, S.A. & HORWITZ, M. S. (1998). New perspectives in adenovirus. *Curr Clin Top Infect Dis* **18**, 286-305.

LUNDE, M.N. & JACOBS, L. (1983). Antigenic differences between endozoites and cystozoites of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **69**, 806-808.

MACHADO, A.V., CARDOSO, J.E., CLASER, C., RODRIGUES, M.M. GAZZINELLI, R.T., BRUNA-ROMERO, O. (2006). Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* **17**, 898-908.

MACKETT, M., SMITH, G., MOSS, B. (1982). Vaccinia virus: A selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**, 7415-7419.

MAEDA, K., WEST, K., DAISUKE, H., ENNIS, F.A. TERAJIMA M. (2005). Recombinant adenovirus vector vaccine induces stronger cytotoxic T-cell responses than recombinant vaccinia virus vector, plasmid DNA, or a combination of these. *Viral Immun* **18**, 657-667.

MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S., STRICKLAND, G.T. (1976). Acquired resistance to infection with *Schistosoma mansoni* induced by *Toxoplasma gondii*. *Nature* **263**, 56-57.

MANGER, I.D., HEHL, A.B., BOOTHROYD, J.C. (1998). The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infect Immun* **66**, 2237-2244.

MCSHANE, H., BROOKES, R., GILBERT, S.C., HILL, A.V. (2001) Enhanced immunogenicity of CD4(+) T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun* **69**, 681-686.

MEN, R., WYATT, L., TOKIMATSU, I., ARAKAKI, S., SHAMEEM, G., ELKINS, R., CHANOCK, R., MOSS, B., LAI, C.J. (2000). Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine* **18**, 3113-3122.

MINEO, J.R. & KASPER, L.H. (1994). Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). *Exp Parasitol* **79**, 11-20.

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.

MITTAL, S.K., AGGARWAL, N., SAILAJA, G., VAN OLPHEN, A., HOGENESCH, A., NORTH, A., HAYS, J., MOFFATT, S. (2001). Immunization with DNA, adenovirus or both in biodegradable alginate microspheres: effect of route of inoculation on immune response. *Vaccine* **19**, 253-263.

MOHAMED, R.M., AOSAI, F., CHEN, M., MUN, H.S., NOROSE, K., BELAL, U.S., PIAO, L.X., YANO, A. (2003). Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine* **21**, 2852-2861.

MONTOYA, J.G. & LIESENFELD, O. (2004). Toxoplasmosis. *Lancet* **363**, 1965-1976.

MOOIJ, P. & HEENEY, J.L. (2001). Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins. *Vaccine* **20**, 304-321.

MOORE, A.C. & HILL, A.V. (2004). Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria. *Immunol Rev* **199**, 126-43.

MOSS, B. (1991). Vaccinia virus as a tool for research and vaccine development. *Science* **5013**, 1662-1666.

MOSS, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 11341-11348.

MOSS, B. (2001). Poxviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*, vol II. KNIPE, D.M. & HOWLEY, P.M. (ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2849-2883.

MUSSI-PINHATA, M.M. & YAMAMOTO, A.Y. (1999). Infecções congénitas e perinatais. *Jornal de Pediatria* **75**, S15-S30.

NICKLIN, S.A., WU, E., NEMEROW, G.R., BAKER, A.H. (2005). The influence of adenovirus fiber structure and function on vector development for gene therapy. *Mol Ther* **12**, 384-393.

NIELSEN, H.V., LAUEMOLLER, S.L., 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.

OLIVE, C., HO, M.F., DYER, J., LINCOLN, D., BAROZZI, N., TOTH, I., GOOD, M.F. (2006). Immunization with a tetraepitopic lipid core peptide vaccine construct induces broadly protective immune responses against group A streptococcus. *J Infect Dis* **15**, 1666-1676.

OREFICE, F. & BONFIOLI, A.A. (2000). Toxoplasmose. In: *Uveíte Clínica e Cirúrgica*. OREFICE, F (ed). Cultura Médica, Rio de Janeiro, pp. 619-680.

PAOLETTI, E., LIPINSKAS, B.R., SAMSONOFF, C., MERCER, S., PANICALI, D. (1984). Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: Biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 193-197.

PARMLEY, S.F., GROSS, U., SUCHARCZUK, A., WINDECK, T., SGARLATO, G.D., REMINGTON, J.S. (1994). Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **80**, 293-301.

PETERSEN, E., NIELSEN, H.V., CHRISTIANSEN, L., SPENTER, J. (1998). Immunization with *E. coli* produced recombinant *Toxoplasma gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* **16**, 1283-1289.

RAMÍREZ, J. C., GHERARDI M.M., ESTEBAN, M. (2000). Biology of Attenuated Modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation of B- and T-cell immune responses in comparison with the Western Reserve strain and advantages as a vaccine. *J Virol* **74**, 923-933.

REY, L. (1991). *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose. In: *Parasitologia Humana*. REY, L. (ed). Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 274-285.

ROBERTS, D.M., NANDA, A., HAVENGA, M.J.E., ABBINK, P., LYNCH, D.M., EWALD, B.A., LIU, J., THORNER, A.R., SWANSON, P.E., GORGONE, D.A.,

LIFTON, M.A., LEMCKERT, A.C., HOLTERMAN, L., CHEN, B., DILRAJ, A., CARVILLE, A., MANSFIELD, K. G., GOUDSMIT, J., BAROUCH, D.H. (2006). Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existent anti-vector immunity. *Nature* **441**, 239-243.

ROCHA, C.D., CAETANO, B.C., MACHADO, A.V. BRUÑA-ROMERO, O. (2004). Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. *Inter Microb* **7**, 83-94.

RODRIGUES, D., RODRIGUES, J.R., RODRIGUES, J.F., TRAUBER, D., ESTEBAN, M. (1989). Highly attenuated vaccinia virus mutants for the generation of safe recombinant viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1287-1291.

ROLPH, M.S. & RAMSHAW, I.A. (1997). Recombinant viruses as vaccines and immunological tools. *Curr Opin Immunol* **9**, 517-24.

RUSSEL, W. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* **81**, 2573-2604.

SABIN, A.B. (1941). Toxoplasmic encephalithes in children. *J Am Med Assoc* **116**, 801-807.

SCHNEIDER, J. *et al.* Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nature Med.* **4**, 397–402 (1998).

SEDER, R.A., GAZZINELLI, R., SHER, A., and PAUL, W.E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10188-10192.

SHAW, G., MORSE, S., ARARAT, M., GRAHAM, F.L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* **16**, 869-871.

SHENK, T.E. (2001). Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*, vol II. KNIPE, D.M.H. & HOWLEY, P.M., (ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2265-2300.

SHIVER, J.W. et al. (2002). Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**, 331-335.

SOUZA, A.P.D., HAUT, L., REYES-SANDOVAL, A., PINTO, A.R. (2005). Recombinant viruses as vaccines against viral diseases. *Braz J Med Biolog Res* **38**, 509-522.

SPALDIN, S.M., AMENDOEIRA, M.R.R., KLEIN, C.H., RIBEIRO, L.C. (2005). Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. *Rev. Soc Med Trop* **38**, 173-177.

SULLIVAN, N.J., SANCHEZ, A., ROLLIN, P.E., YANG, Z.Y., NABEL, G.J. (2000). Development of a preventive vaccine for ebola virus infection in primates. *Nature* **30**, 605-609.

SULLIVAN, N.J. et al. (2003). Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature* **424**, 681-684.

SUTTER, G. & MOSS, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10847-10851.

SUTTER, G. & STAIB, C. (2003). Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**, 263-271.

SUZUKI, Y., SHER, A., YAP, G., PARK, D., NEYER, L.E., LIESENFEDL, O., FORT, M., KANG, H., and GUJWOLL, E. (2000). IL-10 is required for prevention of necrosis in the small intestine and mortality in both genetically resistant BALB/c and susceptible C57Bl/6 mice following peroral infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol **164**, 5375-5382.

SWAIN, S.L., WEINBERG, A.D., ENGLISH, M., HUSTON, G. (1990). IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. J Immunol **145**, 3796-3806.

SWITAJ, K., MASTER, A., SKRYPCZAK, M., ZABOROWSKI, P. (2005). Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. Clin Microbiol Infect **11**,170-176.

TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. (2000). *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol **30**, 1217-1258.

TOMKO, R.P., XU, R., PHILIPSON, L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. Proc Natl Acad Sci USA **94**, 3352-3356.

VARGA, M.J., WELBULL, C., EVERITT, E. (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. J Virol **65**, 6061-6070.

YANG, Y., NUNES, F.A., BERENCSI, K., FURTH, E.E., GONCZOL, E., WILSON, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. Proc Natl Acad Sci USA **91**, 4407-11.

YANG, Y., XIANG, Z., ERTL, H.C.J., WILSON, J.M. (1995). Upregulation of class I major histocompatibility elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vitro. Proc Natl Acad Sci USA **92**,7257-7261.

WYATT, L., SCOTT, T.S., MURPHY, B.R., MOSS, B. (1996). Development of a replication-deficient recombinant vaccinia virus vaccine effective against parainfluenza virus 3 infection in an animal model. *Vaccine* **14**, 1451-1458.

ZHANG, Y. & BERGELSON, J.M. (2005). Adenovirus Receptors. *J Virol* **79**, 12125-12131.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Publicação "Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses coding for the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice." BRÁULIA C. CAETANO, OSCAR BRUÑA-ROMERO, BLIMA FUX, ERICA A. MENDES, MARCUS L. O. PENIDO, RICARDO T. GAZZINELLI. Hum Gen Ther, 2006