

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em**  
**Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**ANÁLISE CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL**  
**CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE SAG2A EM**  
**PACIENTES COM TOXOPLASMOSE AGUDA**

**SILAS SILVA SANTANA**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas**

**ANÁLISE CINÉTICA DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL  
CONTRA A PROTEÍNA RECOMBINANTE SAG2A EM  
PACIENTES COM TOXOPLASMOSE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

**SILAS SILVA SANTANA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JAIR PEREIRA CUNHA JÚNIOR**

**CO- ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO**

UBERLÂNDIA - MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S232a Santana, Silas Silva, 1987-  
Análise cinética da resposta imune humoral contra a  
proteína recombinante SAG2A em pacientes com  
Toxoplasmose aguda /

Silas Silva Santana. -- 2011.

80 f. : il.

Orientador: Jair Pereira Cunha Júnior.

Co-orientador: José Roberto Mineo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose - Diagnóstico -  
Teses.

3. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Cunha Júnior, Jair Pereira  
da. II.

Mineo, José Roberto. III. Universidade Federal de  
Uberlândia.

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas. IV. Título.

IV. Título.

CDU:

612.017

---



À minha mãe Hilda Silva Santana,  
Pelo amor, dedicação e carinho.

Ao meu pai Antônio Constantino de Santana,  
um grande exemplo para mim.

Ao meu irmão Salles Silva Santana, pelo apoio, confiança e amizade.

*"Há grandes homens que fazem com que todos se sintam pequenos. Mas o verdadeiro grande homem é aquele que faz com que todos se sintam grandes."*  
*(Gilbert Keith Chesterton)*

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por tudo que concedeu em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior, pela orientação e compreensão, ajuda em todos os momentos da execução deste trabalho, por abdicar vários dos momentos de descanso em prol do projeto.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos abrindo as portas do laboratório, e por todo apoio e confiança que me foram depositadas ao longo dos anos. Pela ética, profissionalismo, amizade e por ser um dos grandes modelos que eu busco seguir tanto na vida profissional como na pessoal.

A Profa. Dra. Deise A. O. Silva por ajudar com conhecimentos fundamentais para a realização deste trabalho, grande ajuda e incentivo, por ser uma MÃE científica para todos, além de ser a alma do laboratório.

Aos professores Dra. Neide Silva, Dra. Denise Von Dolinger de Brito, Dr. Marcelo José Barbosa Silva, pelas valiosas contribuições apresentadas a este trabalho durante a banca de qualificação.

Aos professores, Dr. Tiago Mineo, Dr. Marcelo José Barbosa Silva, Dr. Ernesto Taketomi e demais professores deste programa de Pós-Graduação, pelo incentivo, amizade e aprendizado.

Ao pessoal da primeira turma de Biomedicina da UFU pela amizade, em especial destaque Carol, Sabrina, Éverton, Patrícia e Marcela.

Aos meus colegas da turma de mestrado que além de colegas tornaram-se grandes amigos.

Aos amigos e companheiros de laboratório: Ana Cláudia, Celene, Murilo, Poliana, Flávia, Marley, Maraísa, Cristina, Hercílio, Álvaro, Arlindo, Fernanda, Edilge, Mateus, Tamires pela amizade, convívio e conhecimentos compartilhados.

Aos amigos do laboratório de Alergia: Leandro, Carine, Juliana, Laura, Núbia, Ana Carolina, Bárbara, Isabela, Fernando e Bia.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia: Zé (Henrique), Ana Lúcia e Nágilla.

As meninas da Histologia: Mariana, Andressinha, Loyane, Rosiane, Prsicila, Angélica e Belisa pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos meus amigos da Ecologia: Diego, Estevão, Pietro, Lorryna, Célio, Alexandra, Liliane, Guilherme, Pedro e Carol.

As minhas grandes amigas e colegas Ester e Mariana pelo convívio, amizade, companheirismo, afeto e carinho. Por serem amigas verdadeiras que sempre, cada uma a sua maneira, me ajudarem quando eu preciso.

Ao meu grande amigo Éverton por sempre estar disposto a me ajudar no que for preciso, um verdadeiro parceiro. Por ser um ótimo amigo que eu sei que posso confiar e por sempre estar presente tanto nas farras quanto nos momentos de mais seriedade.

Ao meu grande amigo Willian por ser uma pessoa humilde e sempre estar disposto a ajudar as pessoas. Pelos momentos de diversão e pelas farras, por ser um dos meus parceiros inseparáveis. Pelo incentivo, ajuda e amizade.

Ao meu grande amigo Vinícius por ser uma das pessoas mais confiáveis e tranquilas que eu conheço e pelos momentos de descontração, pelo incentivo, ajuda e amizade.

A minha grande amiga Letícia, pela ajuda incondicional no desenvolvimento deste projeto, pelos momentos de descontração e pela amizade verdadeira. Por ser um verdadeiro anjo da guarda.

Aos meus amigos e companheiros inseparáveis, Patrick (BLACK), Alessandro (Zezé), Douglas, Fred e Tiago (Caverna).

Aos técnicos do Laboratório de Imunoparasitologia Marley e Zilda pelo apoio na rotina laboratorial.

Aos secretários, Max, Lucileide e Lucélia pela atenção e boa vontade na solução dos nossos problemas.

Às agências brasileiras financiadoras de pesquisa, CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro fornecido à aquisição de material e reagentes para a execução deste trabalho, em especial a CAPES, pela bolsa de auxílio financeiro oferecida.

## RESUMO

Proteínas recombinantes de *Toxoplasma gondii* têm sido utilizadas em diversos modelos experimentais, assim como para o diagnóstico sorológico da infecção humana por este parasito, principalmente com o intuito de diferenciar as fases aguda e crônica da toxoplasmose. Neste estudo, foi avaliada a cinética dos anticorpos IgM, IgA, IgG e subclasses (IgG1 e IgG3) através de imunoenaios realizados em amostras seqüenciais de soros humanos, provenientes de pacientes com toxoplasmose aguda. Estas amostras foram testadas frente ao antígeno recombinante SAG2A, utilizando-se como paradigma de comparação o antígeno solúvel total de *Toxoplasma* (STAg). A avidéz do anticorpo IgG1 foi avaliada utilizando a metodologia *slot-blot*. Adicionalmente, a razão entre as subclasses IgG3 e IgG1 (IgG3:IgG1) foi determinada e avaliada quanto ao grau de associação com os níveis de IgM e IgA específicos para STAg e aos índices avidéz de IgG1 específicos para SAG2A. Os resultados demonstraram a presença de níveis decrescentes de IgM e IgA para ambos os antígenos utilizados, enquanto que para o isotipo IgG o perfil cinético demonstrou níveis crescentes para ambas preparações antigênicas. Em relação aos índices de avidéz para IgG1, foi observado que amostras de soros de uma fase inicial apresentaram baixa avidéz média de anticorpos IgG1 dirigidos para SAG2A, enquanto que as mesmas amostras demonstraram avidéz média intermediária de IgG1 quando STAg foi utilizado como antígeno. Já em uma fase mais tardia, a avidéz média observada foi alta para STAg e intermediária com SAG2A. A razão entre IgG3:IgG1 obtida no primeiro bimestre foi significativamente maior para SAG2A em comparação com STAg. Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a proteína recombinantes SAG2A pode se constituir em uma ferramenta efetiva na diferenciação das fases da infecção humana por *T. gondii*.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmose; Diagnóstico sorológico; Antígeno SAG2A; Antígeno recombinante; Anticorpos IgM e IgG; Subclasses de IgG; Avidéz de anticorpo.

## ABSTRACT

Recombinant proteins from *Toxoplasma gondii* have been used in several experimental models, as well as for serodiagnosis of human toxoplasmosis, particularly to differentiate acute from chronic phases of the infection. In the present study, we evaluated the kinetics of IgM, IgA, and IgG isotypes, in addition to IgG1 and IgG3 subclasses, by testing sequential serum samples from patients with acute toxoplasmosis. It was carried out immunoassays by using SAG2A recombinant antigen and soluble antigen of Toxoplasma (STAg). The avidity of IgG1 antibody was assessed using slot blot assay. Additionally, a ratio between IgG1 and IgG3 subclasses (IgG3:IgG1) was determined and evaluated its degree of association with levels of IgM and IgA specific for STAg and the avidity index of IgG1 specific for SAG2A. The results showed a decreasing kinetic profile for SAG2A and STAg for IgM and IgA. The kinetic profile for the IgG antibody was increasing for both antigens. Compared to the avidity for IgG1, it was observed that sera from an early stage showed a low average avidity of IgG1 for SAG2A while the same samples showed intermediate mean avidity of IgG1 when STAg was used as antigen. In a later phase, the average avidity observed was high for STAg and intermediate for SAG2A in the same tested sera suggesting that SAG2A may be a promising tool for the detection of avidity. Associations between IgG3/IgG1 and specific IgM and IgA levels for STAg and the avidity index of specific IgG1 for SAG2A were found, and together these parameters could be used as valuable tools in the diagnosis of human toxoplasmosis, especially in situations when the determination of different phases is critical.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; Toxoplasmosis; Serological diagnosis; SAG2A molecule; Recombinant antigen; IgM and IgG isotypes; IgG subclasses; Antibody avidity;

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	12
1.2 Ciclo parasitário e transmissão.....	13
1.3 Invasão parasitária.....	14
1.4 Resposta imune.....	18
1.5 Perfis sorológicos e sinais clínicos.....	21
1.6 Diagnóstico.....	22
1.7 Utilização de proteínas recombinantes.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
3.1 Amostras de soros.....	27
3.2 Obtenção do antígeno solúvel de <i>T. gondii</i> (STAg).....	28
3.3 Produção do antígeno recombinante SAG2A.....	29
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	31
3.5 <i>Immunoblot</i> .....	32
3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	33
3.6.1 ELISA indireto para anticorpos IgM e IgA específicos para SAG2A ....	33
3.6.2 ELISA captura para IgM e IgA específico para STAg.....	34
3.6.3 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e subclasses específicas para STAg e SAG2A.....	35
3.7 <i>Slot- blot</i> para avidéz de IgG1.....	36
3.8 Análises estatísticas.....	37
4. RESULTADOS.....	38
4.1 Expressão da proteína recombinante SAG2A.....	38

4.2 Purificação da proteína recombinante SAG2A.....	40
4.3 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal A4D12 contra a proteína recombinante purificada.....	42
4.4 Análise cinética dos anticorpos IgM, IgA e IgG.....	44
4.5 Análise cinética de anticorpos IgG1 e IgG3.....	47
4.6 Análise de avidéz de anticorpos IgG1 utilizando <i>slot-blot</i> .....	50
4.7 Associação entre a razão IgG3: IgG1 e níveis de anticorpos IgM, IgA ou avidéz de IgG1.....	54
4.8 Reatividade de anticorpos e índices avidéz para STAg e SAG2A.....	56
5. DISCUSSÃO .....	59
6. CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO I.....	79
ANEXO II.....	80

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* é um parasito intracelular obrigatório que tem capacidade de infectar todas as células nucleadas presentes em todos os animais de sangue quente, incluindo humanos. Dependendo da espécie do animal infectado variados sintomas clínicos podem ocorrer. Em mamíferos do mar e marsupiais a infecção pode ser fatal, enquanto que para humanos e alguns animais domésticos umas das formas de infecção de grande importância é a congênita (INNES, 2009). Em relação aos humanos, estima-se que aproximadamente um terço da população humana já tenha entrado em contato com este parasito (TENTER et al, 2000; BLADER E SAEIJ, 2009; FERGUNSSON, 2009; KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

O parasito *T. gondii* pertence ao Filo Apicomplexa, o qual abriga vários parasitos de relevância médica e veterinária, como o *Plasmodium*, causador da malária, e *Eimeria* que causa coccidiose em animais domésticos (ROOS et al., 1994). Este filo é caracterizado por parasitos que apresentam um conjunto de organelas na porção apical do parasito, com relevante funcionalidade durante o processo de adesão e invasão celular (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011).

*T. gondii* foi primeiramente descrito no ano de 1908 por Nicole e Manceaux na Tunísia estudando o pequeno roedor *Ctenodactylus gondi*, do qual foi isolado, e por Splendore estudando formas evolutivas presentes em coelhos no Brasil (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2008). *T. gondii* começou a ser tratado como um patógeno humano de relevância quando, em 1923, foi isolado de material conseguido a partir de biopsia de retina de uma criança infectada pelo parasito (ZENNER et al., 1998).

A infecção pelo protozoário *T. gondii* é largamente difundida em humanos e animais no mundo todo, sendo considerada uma infecção de caráter oportunista em seres humanos. A toxoplasmose apresenta importância médica por poder causar doença clinicamente grave em pessoas imunossuprimidas, e ainda, poder causar infecções congênitas (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; BUFFOLANO et al., 2004; FERGUSSON, 2009).

## 1.2 Ciclo parasitário e transmissão

*T. gondii* é um parasito que pode infectar vários hospedeiros, tendo um ciclo de vida facultativamente heteroxeno. A maioria dos animais de sangue quente, incluindo o homem podem ser hospedeiros intermediários deste parasito. Os hospedeiros definitivos são membros da família Felidae, sendo que o principal representante é o gato doméstico (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; INNES, 2009). No ciclo de vida do *T. gondii* ocorrem replicações utilizando tanto o ciclo sexuado, que ocorre nos hospedeiros definitivos, quanto o ciclo assexuado que ocorre em hospedeiros intermediários (BOOTHROYD; GRIGG, 2002; SUKTHANA, 2006; FERGUSON, 2009).

No ciclo de *T. gondii* existem três formas infecciosas deste parasito. São elas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (WEISS; KIM, 2000; DUBEY, 2004). No ciclo assexuado, as duas formas parasitárias predominantemente encontradas nos hospedeiros intermediários, são a taquizoíta e a bradizoíta. Os taquizoítas apresentam importante capacidade de invasão e da multiplicação por endodiogenia, sendo, este, encontrado em alta quantidade na fase aguda de infecção. Os taquizoítas se diferenciam em bradizoítas, no indivíduo infectado, em função da resposta imunológica, de modo que ocorre a formação de cistos teciduais. O desenvolvimento destes cistos marca a fase crônica da infecção, de modo

que estes permanecem por toda a vida do hospedeiro (BLACK; BOOTHROYD, 2000; DUBEY, 2008).

Nos hospedeiros definitivos ocorre, após a ingestão dos cistos, a liberação das formas bradizoítas e infecção das células epiteliais intestinais, onde ocorre a reprodução assexuada inicial e formação de esquizontes e merozoítas. Após divisões rápidas, ocorre o ciclo sexuado, e liberação de oocistos não-esporulados para o ambiente. Em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigenação os oocistos presentes no ambiente tornam-se esporulados, e permanecem infectantes por longos períodos (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000).

A via de infecção horizontal pode acontecer por ingestão de oocistos infectantes do ambiente presentes em vegetais e caixas de areia infectadas; ingestão de carne mal cozida ou crua contendo cistos teciduais ou sobras de hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; PFREPPER et al., 2005; INNES, 2009). A água contaminada com oocistos também é considerada uma importante fonte de infecção (HILL; DUBEY, 2002). A via de transmissão por *T. gondii* mais freqüente em seres humanos é a oral. A infecção por meio da ingestão de oocistos eliminados nas fezes de gatos infectados ou por ingestão de carne crua ou mal cozida (suíno, ovino e caprino) contendo cistos teciduais está estritamente relacionada com hábitos culturais, alimentares e de higiene, evidenciando então esta rota como a responsável pela maior taxa de transmissão (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000 ; HILL; DUBEY, 2002).

Quando estes parasitos são ingeridos, paredes dos cistos de bradizoítas ou oocistos são rompidas, liberando as formas infectantes, primeiramente na interface com as células epiteliais, o que leva posteriormente à infecção parasitária em outros órgãos do hospedeiro, como músculos e sistema nervoso central (KASPER et al.,2004).

A via de infecção vertical é responsável pela infecção congênita, caracterizado pela passagem transplacentária de taquizoítas (NAZAN, 2008). A transmissão congênita ocorre em

aproximadamente 1 em cada 1000 nascidos vivos nos Estados Unidos (CARRUTHERS, 2002; RORMAN et al., 2006). O risco de transmissão para o feto está associado com muitos fatores como o semestre de gravidez, da competência imunológica materna, da carga parasitária e a virulência da cepa (TREES; WILLIAMS, 2005; RORMAN et al., 2006). A gravidade das infecções congênicas depende do semestre de gravidez em que a mãe se encontra e quando entra em contato com o parasito (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Neste contexto, a transmissão vertical apresenta relevância, uma vez que pode causar graves danos ao concepto, incluindo, em algumas condições, abortamentos em mulheres grávidas não imunes. Este tipo de infecção é visto geralmente quando formas taquizoítas do parasito atravessam a placenta durante uma primoinfecção materna. (MOMBRO et al., 2003; MONTOYA; LIESENFELD, 2004; GOLKAR et al., 2007; INNES, 2009).

O Brasil é um país que apresenta importante diferença em qualidade sanitária e hábitos culturais em cada região. Inquéritos soroepidemiológicos realizados evidenciaram uma prevalência de anticorpos específicos para *T. gondii* em gestantes em torno de 50 a 76%, com ocorrência de toxoplasmose congênita entre 0,2 e 2% (CANTOS et al., 2000; TENTER, HECKERITH; WEISS, 2000; SEGUNDO et al., 2004; CARMO et al., 2005); em Uberlândia (MG) foi verificada percentagem de 0,5% de infecção congênita (SEGUNDO et al., 2004).

A transmissão para o feto é mais freqüente no último semestre de gravidez, porém com sintomas mais brandos. A doença grave no feto é mais freqüente no primeiro trimestre de gravidez, tendo em vista que o feto ainda encontra-se em formação, entretanto, a ocorrência de transmissão congênita é menor nesta etapa (WEISS; KIM, 2000). Uma infecção pré-existente antes da gravidez pelo *T. gondii* geralmente previne a transmissão para o feto, sendo que essas mulheres que tiveram um contato prévio com o parasito são geralmente imunes, por induzir uma resposta protetora para o feto (SIACHOQUE et al., 2006). A transmissão congênita quando a infecção materna é adquirida antes da gestação, é menos comum, mas

pode ocorrer em algumas situações, tais como, quando a gestante apresenta doenças imunossupressoras ou está sob uso de drogas imunossupressoras. Tais situações levam à reativação de uma infecção crônica, com a conversão de bradizoítas presentes em cistos teciduais em taquizoítas, que podem atravessar a placenta. Esta forma de transmissão caracterizada pela reativação de uma infecção crônica tem sido denominada como transmissão transplacentária endógena (TREES; WILLIAMS, 2005; RORMAN et al., 2006) .

### **1.3 Invasão parasitária**

O estabelecimento da infecção pelo toxoplasma ocorre quando o parasito ativamente penetra na célula e inicia o ciclo proliferativo resultando na lise celular e subsequente infecção em novas células do hospedeiro. O sucesso no processo de invasão celular, é garantido por um conjunto de proteínas de superfície antigenicamente distintas e uma série de proteínas liberadas consecutivamente por organelas específicas que inclui as roptrias, micronemas e grânulos densos do parasito. Estas proteínas são de importância nos eventos de adesão, invasão e manutenção do *T. gondii* no interior da célula hospedeira (MANGER; HEHL; BOOTROYD, 1998;; JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

Grupos de antígenos expressos diferencialmente em diferentes estágios de vida do parasito, incluindo as formas taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas, são importantes na modulação da resposta imune e nas variações da virulência parasitária (LEKUTIS et al., 2001).

Na invasão celular, primeiramente, o parasito realiza o processo de adesão com a célula alvo, de modo a formar várias interações de baixa afinidade utilizando de antígenos de superfície ancorados à membrana do parasito por glicosilfosfatidilinositol (SAGs) (TOMAVO, SCHWARZ; DUBREMETZ, 1989; BLACK ; BOOTHROYD, 2001; LEKUTIS

et al., 2001; CARRUTHERS, 2002; JUNG; LEE; GRIGG, 2004; BLADER; SAEIJ, 2009). Posteriormente, ocorre um acúmulo de cálcio intracitosólico e liberação de proteínas de micronemas, que levam a uma forte adesão à célula. Com a adesão, ocorre a liberação de proteínas das roptrias, o início da formação do vacúolo parasitóforo, e a seguir a associação do vacúolo parasitóforo com organelas da célula hospedeira (mitocôndrias e retículo endoplasmático). Dentro do vacúolo ocorre liberação de proteínas de grânulos densos, que modificam a membrana do vacúolo parasitóforo, contribuindo para a remodelação e maturação deste, com a formação de uma rede intravacuolar metabolicamente ativa que sustenta o desenvolvimento e a reprodução do parasito (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011). O vacúolo parasitóforo sustenta vários ciclos de replicação assexuada do parasito (MINEO; KHAN; KASPER, 1994; LEKUTIS et al., 2001; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; SIBLEY, 2003; FERGUSON, 2009; GATKOWSKA et al., 2010).

Durante a interconversão do estágio taquizoíta para bradizoíta ocorre variação substancial na expressão dos antígenos de superfície do parasito. Deste modo, entre os antígenos considerados de superfície, SAG1 e SAG2A/SAG2B são expressos somente na fase taquizoíta enquanto SAG2C/D, BSR4 e SRS9 são encontrados somente nos bradizoítas (KNOLL; BOORTHROYD, 1998; LEKUTIS et al., 2000; CLEARY et al., 2002). As proteínas SAG1 e SAG2A são altamente imunogênicas e atraem uma forte resposta para a fase taquizoíta. Estas moléculas são protótipos de uma superfamília de antígenos de superfície, que inclui pelo menos 116 seqüências homólogas (JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

## 1.4 Resposta imune

Em indivíduos imunocompetentes, a infecção por *T. gondii* resulta em desenvolvimento de resposta imune protetora (HAUMONT et al., 2000; BARRAGAN; SIBLEY, 2002; LAU;FONG, 2008). Inicialmente na resposta imune mediada por células da imunidade inata pode ocorrer uma resposta (inicial) com produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) principalmente por células da linhagem *natural killer* (NK) com conseqüente ativação de mecanismos microbicidas de macrófagos. Esta resposta precoce tem como papel limitar a rápida replicação dos taquizoítas e dirigir a diferenciação da resposta imune para um tipo adequado, neste caso, uma resposta mediada por células Th1. (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005). Após a interação com o parasito, os macrófagos podem atuar juntamente com linfócitos B e T, para estimular a produção de citocinas, como interleucina- 1 (IL-1), IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  e interferon-  $\gamma$  (DENKERS; GAZZINELLI, 1998; BOPHALE , 2003)

A citocina interferon-  $\gamma$  tem um papel essencial na resposta imune contra o *T. gondii*. A presença desta citocina é de suma importância para induzir e manter uma resposta imune eficaz tanto na fase aguda quanto crônica (DENKERS; GAZZINELLI, 1998). Esta citocina ativa macrófagos com posterior liberação de óxido nítrico, que é responsável pelo controle microbicida, controlando o crescimento do parasito (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; ALIBERTI, 2005). Embora respostas imunes mediadas por células Th do tipo I sejam mais eficazes contra o parasito, a maquinaria de resposta não é suficiente para eliminar todos os parasitos do organismo hospedeiro. Assim, após o desenvolvimento da fase crônica da infecção, existem parasitos que conseguem escapar da resposta imune e que permanecem por longos períodos em forma de cistos tissulares de bradizoítas (ALIBERTI, 2005).

A resposta imune humoral atua no combate ao parasito, utilizando de mecanismos como neutralização e destruição de taquizoítas extracelulares (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A presença de anticorpos específicos ao parasito tem como função também inibir a adesão do parasito as células do hospedeiro.

O anticorpo IgA é produzido precocemente pelo contato inicial do parasito com a mucosa intestinal. Os linfócitos sensibilizados, no microambiente de mucosa, podem circular por outros locais do organismo, levando a produção de anticorpos IgA em outros sítios anatômicos, incluindo pontos de infecção ativa presente em diferentes regiões intestinal. (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). Este isótipo é característico da fase aguda da infecção, contudo, esta imunoglobulina ainda pode ser detectada em baixos níveis por 8-9 meses depois da soroconversão. A imunoglobulina IgA não atravessam a barreira placentária, mas podem ser detectados em recém-nascidos, quando a infecção congênita ocorre no terceiro trimestre de gestação. Se a infecção congênita ocorre no primeiro trimestre de gestação, esta imunoglobulina geralmente está ausente no sangue do recém-nascido (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

A produção do anticorpo IgM é considerado um dos sinais de infecção recente por *T. gondii*. Em humanos a produção de IgM atinge o máximo no primeiro ou segundo mês de infecção, com queda a geralmente a partir do oitavo mês. Além do mais a duração da resposta com o anticorpo IgM é reduzida com o tratamento prolongado com fármacos como sulfadiazina e piremetamina (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003). A presença de anticorpos IgM na circulação de recém-nascidos é um sinal de infecção congênita, tendo em vista que este anticorpo não atravessa a barreira placentária e também não é encontrado no colostro (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

O anticorpo IgG é considerado a principal classe de imunoglobulina envolvida na resposta imune humoral contra a infecção por *T. gondii*. Na espécie humana, os níveis de IgG aumentam gradativamente e chegam ao máximo entre 6-14 meses de infecção, geralmente com vagarosa queda após este período ou permanecendo com baixos títulos indefinidamente. Este anticorpo é transferido para o feto tendo em vista a sua capacidade de atravessar a barreira placentária (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; KOTRESHA; NOORDIN, 2010). Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixos índices de avidéz. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, estes anticorpos vão apresentando avidéz crescente, de modo que, nas infecções de longa duração, anticorpos com alta avidéz podem ser detectados em altas concentrações (CAMARGO et al., 1991; CANDOLFI et al., 2007).

Além destas classes principais de anticorpos envolvidas na infecção por *T. gondii*, algumas subclasses de IgG apresentam atividade funcional no combate ao parasito. Dentre as subclasses de IgG existe a predominância de anticorpos IgG1, com menores quantidades de IgG2 e IgG3. O anticorpo IgG4 geralmente não é detectado em níveis elevados em infecção por *T. gondii*. A habilidade IgG1 e IgG3 efetivamente fixarem complemento contribuem na resposta ao *T. gondii*, pois o microrganismo pode sofrer lise por fixação de sistema complemento na presença destas imunoglobulinas (HUSKINSON et al., 1989). A síntese de subclasses de IgG em recém-nascidos com infecção por *T. gondii* parece ser principalmente dependente de IgG2 e IgG3, enquanto que IgG1 é predominantemente transferido passivamente da mãe para o feto ( BUFFOLANO et al AL., 2005).

## 1.5 Perfis sorológicos e sinais clínicos

Na infecção humana são detectadas as seguintes fases sorológicas aguda, transição e a crônica. Logo no início da infecção ocorre a disseminação do taquizoíta e rápida proliferação, representando a fase aguda. Nesta fase o perfil sorológico é definido por presença de IgM e IgA específicos, e IgG em títulos crescentes e com baixa avidéz. Já na fase intermediária ou de transição é caracterizada por perfil sorológico de presença de IgG em altos títulos, ausência de IgA, e presença de IgM em baixos títulos. Deste modo, os taquizoítas acabam por escapar da resposta convertendo para a forma bradizoíta, que tem uma taxa de multiplicação lenta, dentro dos cistos teciduais, neste momento é detectado um perfil sorológico de presença de IgG de alta avidéz e ausência de IgA e IgM (CAMARGO et al., 1991; HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; KAZEMI et al., 2007).

A toxoplasmose é geralmente assintomática em indivíduos com o sistema imunológico competente, porém a doença pode causar graves problemas em indivíduos imunocomprometidos, como em pacientes com AIDS. Nestes pacientes a infecção causa encefalite, pneumonia e infecção disseminada. Em mulheres grávidas constitui-se em problema pela infecção transplacentária, ocasionando malformações no feto como problemas neurológicos, comprometimento visual e morte fetal (HAUMONT et al., 2000; BARRAGAN; SIBLEY, 2002; LAU; FONG, 2008).

Alguns dos sintomas que podem ser encontrados na toxoplasmose em pessoas imunocompetentes são: infarto dos linfonodos, febre, dor muscular, dor de cabeça e dor de garganta Estes sinais clínicos inespecíficos e não são suficientemente característicos para chegar a um diagnóstico preciso, já que a toxoplasmose mimetiza sintomas clínicos de várias outras doenças infecciosas (HILL; DUBEY, 2002).

Em pacientes com AIDS pode ocorrer um quadro clínico com fortes dores de cabeça irresponsiva a analgésicos. Esta situação pode evoluir para um quadro grave de confusão, letargia, ataxia e coma (HILL; DUBEY, 2002). A lesão cerebral predominante em imunocomprometidos é necrose, principalmente na área do tálamo.

Os sinais clínicos em recém-nascidos com toxoplasmose congênita são variáveis, e podem se manifestar antes ou após o nascimento. Muitos bebês são assintomáticos ao nascimento. Quando os sinais clínicos estão presentes, muitas vezes são inespecíficos como hepatomegalia, linfadenopatia, esplenomegalia, hiperbilirrubinemia, anemia e trombocitopenia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004; DI CRISTINA et al., 2004; GOLKAR et al., 2007). A tríade clássica de hidrocefalia, calcificação intracraniana e coriorretinite são encontradas em menos do que 10% dos recém-nascidos infectados. Esses achados ainda podem ser confundidos com os observados para sífilis, rubéola, citomegalovírus e herpes (RORMAN, 2006).

## **1.6 Diagnóstico**

A infecção por *T. gondii* pode ser detectada indiretamente através de técnicas sorológicas e diretamente por meio de técnicas como o PCR, hibridização, isolamento e histologia (MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Atualmente, prefere-se usar métodos sorológicos no diagnóstico de *T. gondii*, já que a sensibilidade e a especificidade dos outros métodos podem ser mais afetadas por tratamento do paciente, transporte das amostras, bem como variações nas condições de armazenamento das mesmas. Além do mais, a parasitemia pode ser curta dificultando o valor de detecção de DNA pelo método de PCR (BEGHETTO et al., 2006).

Diferentes métodos sorológicos podem ser utilizados para detectar diferentes anticorpos que possuem padrões de aumento ou redução de níveis únicos ao longo do tempo de infecção. Uma combinação de técnicas sorológicas geralmente é utilizada para detectar se o paciente foi infectado em um tempo mais distante ou se foi recentemente infectado. Existem diversas técnicas sorológicas que podem ser usadas para detecção de resposta humoral, essas incluem o teste de Sabin-Feldman, ensaio de imunofluorescência indireta (IFA), teste de aglutinação direta, teste de aglutinação em látex (LAT), ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) e reações de *immunoblotting* (HILL; DUBEY, 2002).

O ensaio imunoenzimático ELISA é um dos mais utilizados no diagnóstico de toxoplasmose, tendo como base a reação antígeno e anticorpo. A sensibilidade e a especificidade do ELISA são dependentes da natureza das preparações antigênicas que são utilizadas. Reações utilizando preparações antigênicas mais purificadas, como proteínas recombinantes ou proteínas purificadas a partir de colunas cromatográficas, geralmente apresentam maior especificidade, com menor probabilidade de reações cruzadas (SENSINI, 2006; SUKTHANA, 2006).

O diagnóstico de infecção recente tem sido realizado tradicionalmente com detecção de anticorpos IgM específicos e/ou pelo aumento dos títulos de anticorpos IgG. Entretanto a existência na população de alta prevalência de anticorpos IgG contra o *T. gondii* com altos títulos entre pessoas saudáveis, e em alguns casos a persistência de anticorpos IgM específicos por longo período têm complicado a interpretação dos testes sorológicos quando ocorre suspeita de toxoplasmose (SUZUKI; ROCHA; ROSSI, 2001; BEGHETTO et al., 2006). A detecção de anticorpo IgA têm sido utilizada nesses casos, porém estes podem ser detectados até 6 meses após infecção, podendo ser imprecisamente utilizados na estimativa de tempo de infecção. A utilização de detecção de IgE também mostra um valor clínico substancial na detecção da infecção por *T. gondii*, porém ainda é pouco aproveitado no diagnóstico ,

necessitando de mais estudos sobre o seu valor clínico na toxoplasmose (GROSS; KEKSEL; DARDÉ, 1997). A utilização dos índices de avidéz do anticorpo IgG, têm se mostrado uma ferramenta útil associada a detecção de IgM específicos, para determinar se a infecção é aguda ou crônica, uma vez que inicialmente sua avidéz é baixa (fase aguda) e com o passar das semanas ela vai aumentando (fase transição e crônica) (BEGHETTO et al., 2006).

Nos testes sorológicos realizados na rotina geralmente ocorre à utilização de preparações totais de antígenos de taquizoítas, porém este material pode estar contaminado com outros constituintes não pertencentes ao parasito, como antígenos provenientes de culturas de células, ou podem ocorrer variações pelo fato dos diferentes métodos de preparação dos antígenos. Deste modo, vários trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas alternativas para preparações antigênicas mais homogêneas visando melhorar a eficácia do diagnóstico da toxoplasmose, principalmente em casos de toxoplasmose congênita e para diagnóstico em imunossuprimidos (GOLKAR et al., 2007; HOLEC et al., 2008).

### **1.7 Utilização de proteínas recombinantes no diagnóstico da toxoplasmose**

A utilização de proteínas recombinantes em sorologia mostra-se uma boa alternativa, já que a utilização de antígenos recombinantes vem sendo objeto de estudo nos últimos 20 anos, com avaliação do potencial de utilização destas proteínas como marcadores sorológicos (BEGHETTO et al., 2003; BUFOLANO et al., 2004; KOTRESHA; NOORDIN, 2010). A utilização de proteínas recombinantes pode representar um dos alicerces de um desenho racional de novos testes diagnósticos, pois a variação da constituição protéica existente ao trabalhar com antígenos totais é reduzida.

As vantagens da utilização destas proteínas são: custo relativamente baixo, após a otimização das condições de produção, grau de pureza alto (com conseqüente alta

especificidade) e a possibilidade de seleção de antígenos específicos de fase aguda ou crônica, com possibilidade de realizar a diferenciação destas (PIETKIEWICZ et al., 2004; PFREPPER et al., 2005; PFREPPER ET AL., 2005; BEGHETTO et al., 2006; KOTRESHA; NOORDIN, 2010). Entre essas proteínas recombinantes que estão sendo estudadas podem ser destacadas: as proteínas dos grânulos densos GRA1 (p24), GRA2 (p28); antígenos de superfície SAG1 (p30), SAG2 (p22); antígenos das roptrias como ROP1 (p66) e ROP2 (p54); proteínas da matriz celular como MAG1 (p65, p68) (GOLKAR et al., 2007; BÉLA et al., 2008; HOLEC et al., 2008). Nestes estudos as proteínas são geralmente utilizadas como antígenos para sensibilização em testes de ELISA para detecção, principalmente de IgG e IgM.

A proteína SAG2A (p22) é uma proteína imunodominante que é expressa na fase taquizoíta de *T. gondii*, sendo que o trabalho de BÉLA et al. (2008) demonstrou a capacidade desta proteína recombinante ser reconhecida por anticorpos IgG e IgG1 principalmente em pacientes na fase aguda. Deste modo o presente trabalho, justifica-se pela sua relevância em esclarecer aspectos relacionados à utilização do antígeno recombinante SAG2A no diagnóstico sorológico da toxoplasmose, investigando pela primeira vez a cinética de anticorpos contra a proteína SAG2A recombinante em amostras de soros de paciente com toxoplasmose aguda.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a cinética de anticorpos específicos para proteína recombinante SAG2A em comparação com o antígeno solúvel do *Toxoplasma gondii* em um estudo utilizando amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda em diferentes pontos temporais.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil cinético dos anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para SAG2A em comparação com STAg
- Verificar o perfil cinético de subclasses de IgG (IgG1 e IgG3) específicas para proteína recombinante SAG2A e STAg por meio de ELISA indireto.
- Estabelecer a razão entre subclasses de IgG (IgG3:IgG1) para SAG2A e STAg.
- Avaliar a avidéz de anticorpos IgG1 para SAG2A e STAg utilizando o imunoensaio *slot-blot*.
- Verificar a existência associações entre a razão IgG3:IgG1 específica para SAG2A com anticorpos IgM e IgA específicos para STAg e com índices avidéz de anticorpos IgG1 para SAG2A.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Amostras de soros

Um total de 80 amostras de soros humanos foi avaliado, consistindo de 8 amostras de soros seqüenciais para cada paciente, perfazendo um total de 10 pacientes, com toxoplasmose em diferentes momentos após o desenvolvimento da infecção. As amostras de soros foram obtidas de pacientes provenientes de consultórios privados ou ambulatórios de doenças infecciosas de hospitais e postos de saúde da região metropolitana de Vitória e municípios do interior do estado do Espírito Santo e foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra Geysa Baptista para compor o Banco de Amostras Biológicas dos Laboratórios de Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, cuja regulamentação foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP-UFU) em 29/02/2008, com parecer de análise final No. 041/08 (ANEXO I). As amostras de sangue que foram utilizadas neste estudo, foram colhidas em conformidade com a resolução CNS 196/96, com aprovação prévia pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES (ANEXO II).

Os critérios de inclusão neste estudo foram que os pacientes fossem de ambos os gêneros, com idade variando de 7 a 80 anos, com a presença de pelo menos dois sinais clínicos compatíveis com a toxoplasmose aguda, sendo estes fraqueza, febre, inchaço nos linfonodos cervicais e artralgia e ainda a evidência sorológica de soroconversão para o *T. gondii*, com a presença de anticorpos IgM e IgA e baixos títulos de IgG. Os critérios de exclusão foram gravidez, pacientes positivos para HIV e presença de anticorpos IgG de alta avididade para específicos para antígenos de *T. gondii*

As amostras foram avaliadas e analisadas em vários pontos temporais, de modo que posteriormente as mesmas foram separadas em dois grupos, sendo, o Grupo I: constituído de soros coletados de 1º a 6º mês, após o início da doença (soroconversão), denominado de grupo em fase aguda precoce e ainda o Grupo II: constituído de amostras de soros coletados do 6º até 12º mês após soroconversão, denominada por amostras em fase convalescente precoce.

### **3.2 Obtenção do antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg)**

Os taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por passagem seriada em camundongos Swiss, por 48 a 72 horas, por meio de inóculo de aproximadamente  $10^6$  taquizoítas obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). A preparação dos antígenos solúvel ocorreu como descrito por Scott e colaboradores (1987). Deste modo, o exsudato peritoneal dos camundongos infectados foi centrifugado a 720 g, durante 10 minutos a 4 °C. A seguir os parasitos foram lavados 2 vezes em solução salina estéril tamponada, com fosfatos de sódio diácido 0,01 M (PBS, pH 7,2). As suspensões parasitárias foram ajustadas para  $1 \times 10^8$  taquizoítas/ml com PBS, suplementada com inibidores de proteases (10 µg/mL de aprotinina, 50 µg/mL de leupeptina e 1,6 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoreto [PMSF]; Sigma Chemical Co., St Louis, EUA) e posteriormente incubadas por 10 minutos em banho de gelo. Foram realizados seis ciclos de criólise (congelamento em N<sub>2</sub> líquido e descongelamento em banho-Maria a 37 °C) seguido por seis ciclos de um minuto em ultrassom (Sonopuls, Bandelin electronic, Berlim, Alemanha) e centrifugação a 10.000 x g por 15 min. A preparação antigênica resultante da criólise foi submetida a centrifugação a 10.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e o respectivo conteúdo protéico foi determinado pelo método de Bradford. As

amostras de antígenos foram armazenadas a -20 °C até serem utilizados como antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg).

### 3.3 Produção do antígeno recombinante SAG2A

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram utilizados para isolar o DNA genômico que foi utilizado como molde para amplificação do antígeno por um protocolo padronizado da PCR (Béla et al, 2008). Foram utilizados 50 ng de DNA genômico de taquizoítas da cepa RH, 80 pmol de cada *primer* (SAG2AFNdeI (5'-CAAGTTCGCTCATATGTCCACCACCG-3'), contendo sítio para a enzima de restrição *NdeI* e o *primer* SAG2ARHind3 (5'-GACTTTCGCAAAGCTTCTCCGAAAG-3'), contendo sítio de restrição para a enzima HINDIII e o códon de terminação), 0,25 mmol/L de dNTPs, 2,0 unidades de Taq DNA Polimerase (Fermentas, Burlington, Canadá), Tris-HCl 20 mmol/L pH 8,2, KCl 10 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 6 mmol/L, Triton X-100 0,1% (v/v) e soro albumina bovina (BSA) 10 µg/mL, para um volume final de 100 µL. As condições de reação adotadas foram: 2 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos (45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 48 °C e 1 minuto e 30 segundos a 72 °C) e extensão final de 5 minutos a 72 °C. A reação procedeu-se em termociclador modelo MJ Research PLTC-200 (GMI Inc, St. Paul, USA). O fragmento amplificado de aproximadamente 607 pb foi purificado com o kit *Accuprep PCR purification* (Bioneer Corporation, Daejeon, Coréia do Sul). Os produtos da PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *HindIII* e inseridos nos sítios *NdeI/HindIII* do vetor pET28a, resultando no plasmídeo pET28aSAG2A, contendo a seqüência de SAG2A em fusão com domínios de cauda de histidina (domínio *Hist-tag*).

Células competentes foram preparadas para posterior inserção do plasmídeo pET28A. Brevemente, células de *Escherichia. Coli*, cepa BL21 , foram crescidas em meio LB até atingir

um valor de absorvância de 0,5 a 600 nm. As células foram coletadas por centrifugação a 5.000 x g, por 10 minutos a 4 °C e foram ressuspensas em 45 ml de solução 60 mM de cloreto de Cálcio (MgCl<sub>2</sub>). Após nova centrifugação o sedimento bacteriano foi ressuspendido com 1 ml de solução cloreto de Cálcio a 60 mM e submetido à incubação em gelo por aproximadamente 1 hora.

Para transformação, foram adicionados 10 µL do DNA plasmidial (40 µg) a uma alíquota 100 µl de células competentes, e a suspensão foi mantida a 0 °C por 30 minutos. Após um choque térmico de 5 minutos a 47°C, foi adicionado 1 mL de meio Luria e bertani (LB) à alíquota, seguido por incubação a 37°C, por 2 horas. A seguir, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 100 µL de meio LB e espalhadas em placas contendo LB (sólido) na presença de kanamicina a 50 µg/mL, para seleção de colônias transformantes. Os transformantes selecionados foram cultivados e utilizados para a produção das proteínas recombinantes.

Para expressão protéica do antígeno recombinante SAG2A, a cultura contendo as células transformadas com o vetor pet28A foi induzida com 0.5 mM (Isopropil-β-D-Tiogalactosídeo, Sigma Chemical Co., St Louis, USA), com baixa agitação (90 rpm) 20 °C for 16 h. As células bacterianas foram coletadas por centrifugação, e sedimento celular bacteriano foi ressuspendido em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM sacarose, 0.2% Triton X-100 e PMSF 1 mM), com posterior processamento por criólise, em congelamento em N<sub>2</sub> líquido e degelo à 37° C por repetição de seis ciclos de congelamento/descongelamento. A seguir a preparação foi submetida tratamento de sonicação em 10 ciclos de 20 segundos com repouso em gelo de 5 segundos e aparelho (Sonopuls, Bandelin electronic, Berlim, Alemannha) calibrado para a amplitude de 90%. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi coletado e utilizado para purificação em 2 mL de resina Ni NTA (Qiagen) previamente

equilibrada em 50 mM de tampão fosfato, pH 8.0. As proteínas não ligadas à resina foram removidas com tampão de lavagem contendo 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 300 mM NaCl, pH 8.0. A proteína SAG2A foi eluída da coluna com o mesmo tampão de equilíbrio acrescido 250 mM de imidazol. As frações de SAG2A foram coletadas e dialisadas em PBS e posteriormente submetidas à quantificação como previamente descrito (Lowry et al., 1951).

### **3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)**

Alíquotas das frações coletadas da purificação do antígeno recombinante SAG2A foram adicionadas ao tampão de amostra (Tris-HCl a 100 mM pH 6,8; dodecil sulfato de sódio [SDS] a 4%; glicerol a 20%; azul de bromofenol a 0,2%), incubados por 5 minutos a 100°C. A seguir, 20 µL das amostras representativas da cromatografia (fração aplicada, volume excluído (*void*) e frações eluídas da resina de Ni-NTA) foram aplicados nos poços e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% sob condições não redutoras (LAEMMLI, 1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, USA). Após a separação eletroforética, as proteínas foram coradas com solução de Coomassie coloidal e analisadas visualmente quanto ao grau de pureza.

### 3.5 Immunoblot

No intuito de analisar a reatividade do anticorpo monoclonal A4D12 (específico a SAG2A) às frações purificadas, foi realizado um ensaio de *immunoblot*. Deste modo, a fração contendo a proteína recombinante SAG2A foi submetida a eletroforese em SDS-PAGE a 15% como descrito anteriormente. Após a separação, as amostras foram eletrotransferidas para uma membrana de nitrocelulose (Sigma Chemical Co.) utilizando tampão de eletrotransferência conforme método previamente descrito (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A transferência ocorreu com um sistema úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) durante 2 horas com corrente constante de 70 mA. Para verificar o sucesso da transferência, a membrana foi corada posteriormente com solução de Ponceau a 0,5% preparada em ácido trifluoracético 0,025% de modo que permitisse a visualização das bandas protéicas.

A seguir, membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras de 3 mm e colocadas em canaletas apropriadas para a reação. As tiras foram bloqueadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e leite desnatado (PBS-TM) a 5% por 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-T, as tiras foram incubadas por 18 horas a 4 °C com o anticorpo policlonal para *T. gondii* (controle positivo) ou anticorpo policlonal negativo (controle negativo) ou monoclonal A4D12 (sobrenadante de cultura do hibridoma A4D12 específico ao antígeno SAG2A). Após a incubação, as tiras foram lavadas com PBS-T em seis ciclos de cinco minutos cada. As tiras foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase diluído 1:1000 em solução PBS-T com 1% de leite desnatado. Todas as membranas foram novamente lavadas com PBS-T e reveladas pela adição de 3,3'- diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co.) previamente diluído em

solução Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação foi interrompida com água destilada quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

### **3.6 Ensaios imunoenzimáticos (ELISA)**

#### **3.6.1 ELISA indireto para anticorpos IgM e IgA específicos para SAG2A**

Testes de ELISA indireto foram realizados para a detecção de anticorpos IgM e IgA específicos para SAG2A. Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA) foram sensibilizadas com SAG2A (5 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS acrescido de 0.05% Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente com PBS-T suplementado de leite desnatado (PBS-TM) a 5 %. Em seqüência, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídos 1: 64 (para detectar IgM) e 1:16 (para detectar IgA) por 2 h a 37 °C. Após lavagens, as placas foram incubadas com conjugado anti-IgA (1:500) ou anti- IgM (1:1000) humana marcada com peroxidase (Sigma Chemical Co.) por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem por seis vezes com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS; Sigma Chemical Co.) a 0,01 M diluídos em solução tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2 ).

A densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O limite de positividade (*cut off*) da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos acrescida de 3 desvios padrões. Os resultados foram expressos em índices de reatividade ELISA (IE), de acordo com a fórmula: IE = DO

amostra / DO *cut off*, onde valores de IE > 1,2 foram considerados positivos, para a exclusão dos valores de reatividade próximos a IE = 1,0.

### **3.6.2 ELISA captura para IgM e IgA específico para STAg**

Teste ELISA de captura foi realizado conforme descrito previamente (Carvalho et al., 2008). Placas de microtitulação (Corning Laboratories 3590 Inc., New York, USA), foram sensibilizadas com anticorpos de captura (anti-IgM humana ou anti-IgA humana produzidos em cabra (Sigma Chemical Co.) a 10 µg/mL diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com leite desnatado a 5% em PBS-T (PBS-TM) por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram incubadas com amostras de soros diluídas 1:16 em PBS-TM por 2 horas a 37 °C e, após novas lavagens, foram incubadas com STAg (100 µg/mL) em PBS-TM por 2 horas a 37 °C. Em seguida, as placas foram incubadas, por 1 hora a 37 °C, com a porção F(ab')<sub>2</sub> de anticorpo de coelho anti-*T. gondii* conjugado à peroxidase (preparado segundo Wilson e Nakane, 1978) na diluição de 1:50 em PBS-TM. A reação foi revelada utilizando substrato enzimático (0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,01 M do cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico – ABTS; Sigma Chemical Co.). A leitura e expressão dos índices de reatividade ELISA foram realizadas conforme descrito para o ELISA-IgG indireto.

### **3.6.3 ELISA indireto para detecção de anticorpos IgG e subclasses específicas para STAg e SAG2A**

ELISA indireto para detecção de IgG e subclasses específicas SAG2A e STAg foi realizado como descrito (BÉLA et al., 2008). A detecção de IgG foi realizada utilizando placas de microtitulação de sensibilizadas com SAG2A (5 µg/mL) ou STAg (5µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) por 18 horas a 4 °C. A reação foi realizada como já descrito para o ELISA indireto para detecção de IgM.

Para detecção da análise cinética de anticorpos IgG1 e IgG3, placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade (Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (5 µg/mL) ou SAG2A (5 µg/mL) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4 °C. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T contendo 1% BSA (PBS-T-BSA) por 1 hora a 37°C. Após lavagem, por três vezes com PBS-T, as placas foram incubadas com amostras de soro diluídas 1:64 em PBS-T-BSA, em duplicata, por 1 hora a 37 °C. A seguir as placas foram lavadas 6x com PBST e incubadas com anticorpo biotilado de cabra anti-IgG1 humana (1:1000) ou anti IgG3 humana (1:1000) diluídos em PBS-T-BSA por 2 horas a 37 °C. Após novo ciclo de lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com streptavidina-peroxidase diluída 1:1000 em PBS-T-BSA por 30 min, à temperatura ambiente. Após lavagens, por seis vezes, com PBS-T, a reação foi revelada pela adição do substrato enzimático H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,03% e cromógeno 2,2'-azino-bis-3-etil-benzotiazolina ácido sulfônico (ABTS; Sigma Chemical Co.) a 0,01 M diluídos em tampão citrato-fosfato 0,07 M (pH 4,2). Valores de DO foram determinados a 405 nm e resultados foram expressos em índices ELISA (IE) como descrito acima.

### 3.7 *Slot-blot* para avidéz de IgG1

O ensaio *slot-blot* foi realizado como previamente descrito (Li et al., 2010), com a finalidade de avaliar a avidéz de anticorpos IgG1 específico pra *T. gondii*. Brevemente, 2 µg dos antígenos (STAg ou SAG2A) ou proteína irrelevante BSA foram inseridos nas membranas de nitrocelulose utilizando o *slot-blotter* (Bio-Dot<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). As membranas foram preparadas em duplicatas, bloqueadas com PBS-TM a 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Subseqüentemente, as membranas foram lavadas em PBS-T e incubadas com amostras de soros diluídas 1:50 em PBS-TM a por 2 horas a 1% temperatura ambiente. Posteriormente, uma das membranas da duplicata foi submetida a um passo de lavagem especial com PBS acrescido com 6M de uréia por 10 minutos e a outra membrana foi lavada somente com PBS por 10 minutos. As membranas foram lavadas novamente com PBS-T, por três vezes, e incubadas com o anticorpo biotilado de cabra anti-IgG1 humana (1:1000), por 2 horas a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em PBST e em seguida incubadas com streptavidina-peroxidase (1:1000), por 30 min a temperatura ambiente. A reatividade foi revelada utilizando-se 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma Chemical Co.) diluída em solução de Tris-HCl 20 mM (pH 7,2) e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A intensidade de pixels das bandas foi determinada por meio do software o Kodak 1D image analysis (KODAK). Os resultados foram expressos como intensidade de pixels das bandas (Int Px) ou índice avidéz (IA), que foi calculado como a razão entre Int Px obtidos de membranas tratadas com uréia (U+) e sem uréia (U-), de acordo com a fórmula:  $IA (\%) = [Int Px (U+) / Int Px (U-)] \times 100$ . Os limites dos índices de avidéz foram arbitrariamente estabelecidos como baixo (AI<40%), intermediário (40%<AI<60%), e alto (AI>60%).

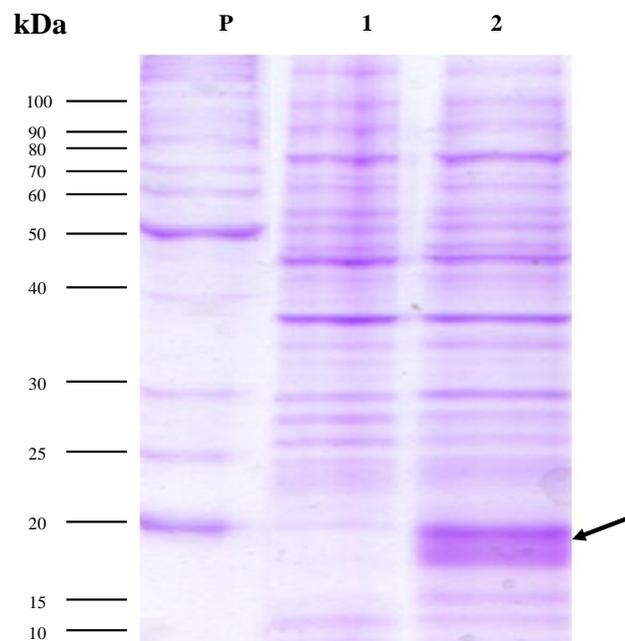
### 3.8 Análises estatísticas

Análises estatísticas foram feitas utilizando-se o aplicativo GraphPadPrism v. 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA). Teste *t* de Student foi utilizado para comparação entre diferenças entre os níveis médios de anticorpos expressos com índice ELISA ou intensidade de pixel das bandas no ensaio de *slot-blot*. Associações entre a razão de IgG3:IgG1 com anticorpos IgA ou IgM ou índice avidéz de IgG1 foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Expressão da proteína recombinante SAG2A**

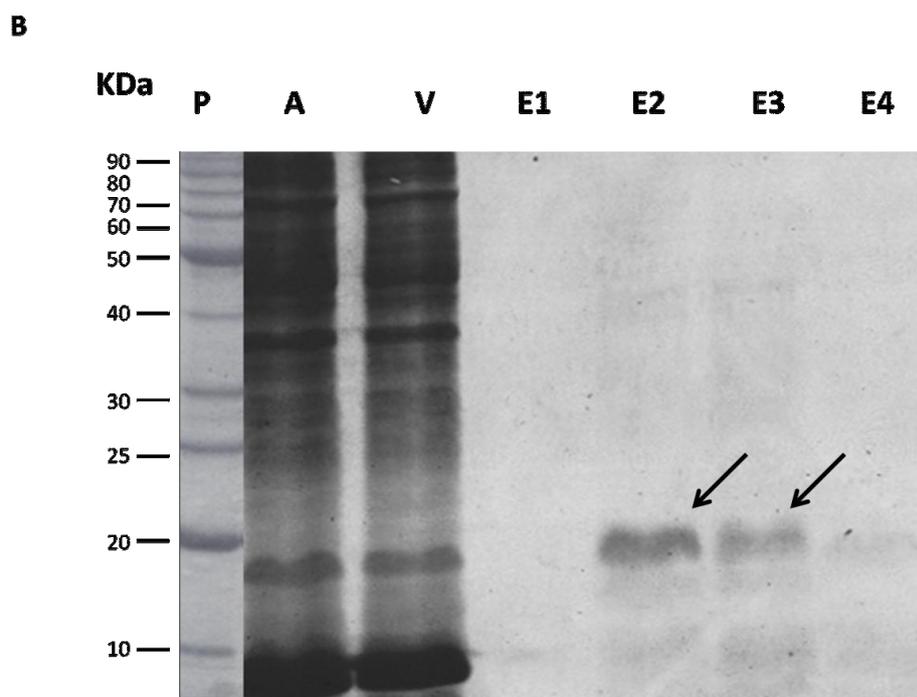
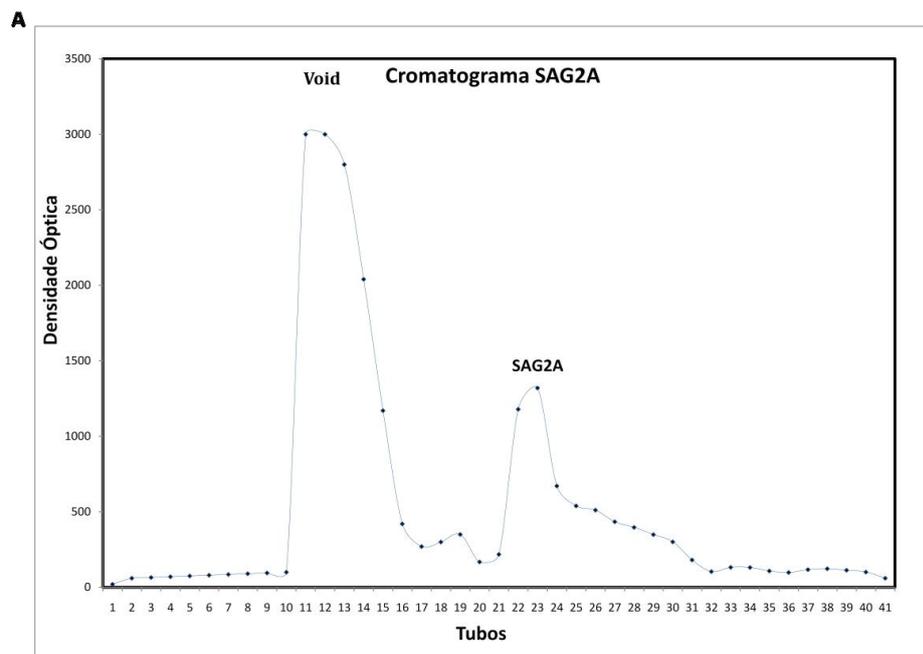
A expressão da proteína SAG2A em bactérias BL21 (DE3) foi otimizada com adição de agente sintético IPTG (Chemical Co., St Louis, USA) por 16 horas a 20 ° C. Após o tempo de indução de expressão protéica, alíquotas de extrato protéico de bactérias submetidas ou não à indução foram submetidas a separação eletroforética em gel de poliacrilamida de 15%. Como demonstrado na figura 1, observa-se a uma banda protéica de aproximadamente 17- 20 kDa na fração protéica proveniente de bactérias que foram submetidas ao tratamento com o IPTG por 16 horas, enquanto, que nas bactérias não tratadas não foi detectado aumento significativo de proteínas deste peso molecular. A banda proteica presente no homogeneizado da bactéria induzida apresenta uma mobilidade eletroforética relativa em SDS-PAGE similar ao observado previamente para a proteína recombinante SAG2A, sugerindo que nas bactérias induzidas por IPTG expressam uma proteína com peso molecular similar ao da proteína recombinante SAG2A.



**Figura 1. Perfil eletroforético de proteínas isoladas de bactérias *E. coil*, cepa *BL21*, em gel de poliacrilamida 15%.** A expressão da proteína recombinante SAG2A foi avaliada após indução com IPTG 0,5 mM por 16 horas 20 °C.. O padrão de peso molecular é indicado pela a letra P. Na coluna 1 perfil eletroforético de proteínas extraídas de amostras de bactérias não-induzida à expressão. Na coluna 2, perfil eletroforético de proteínas extraídas de bactérias induzidas à expressão da proteína recombinante. A seta à direita, indica a expressão da proteína recombinante de aproximadamente 17-20 kDa.

## 4.2 Purificação da proteína recombinante SAG2A

Com o intuito de obter frações purificadas da proteína recombinante SAG2A, lisados bacterianos das culturas *E. coli* induzidas com IPTG foram submetidos a cromatografia em resina de Níquel (Ni-NTA). Na Figura 2, são demonstrados o cromatograma representativo de uma das purificações e a análise em SDS-PAGE das frações obtidas da purificação da proteína recombinante. Como demonstrado pelo cromatograma na Figura 2A, podem ser vistos dois picos de absorvância à 280 nm, sendo o primeiro deles correspondente à fração do “void” do lisado bacteriano, que corresponde a fração não ligada à resina, e um segundo pico corresponde as frações eluídas da resina de Ni-NTA com tampão contendo imidazol a 250 mM.. Na Figura 2B, o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida a 15% das frações obtidas é demonstrado. São observados componentes de peso molecular variando de 6 a 120 kDa, nas frações aplicada (raia 1) e “void” (raia 2). Já nas frações eluídas da resina de Ni-NTA (raias 4, 5 e 6) pode ser observado um componente protéico de peso molecular de aproximadamente 17-20 kDa, consistente com o peso molecular estimado para a proteína recombinante SAG2A.

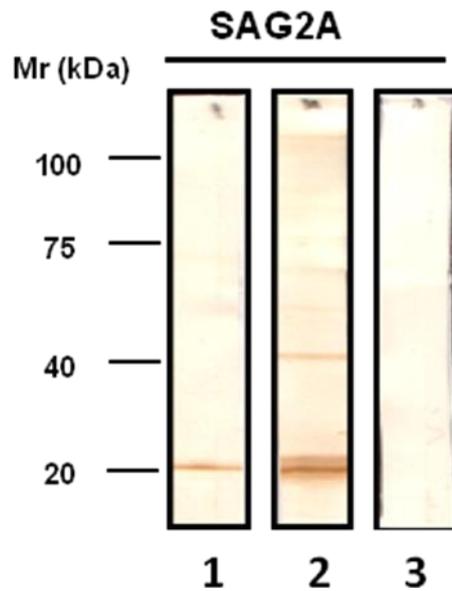


**Figura 2. Purificação da proteína recombinante SAG2A (A)** Cromatograma representativo da purificação da SAG2A em coluna de afinidade de Níquel. O primeiro pico corresponde à fração não ligante da resina de Ni-NTA e o segundo pico à fração purificada de SAG2A. **(B)** SDS-PAGE a 15% em condições não redutoras das frações representativas da purificação. Linha 1: padrão de massa molecular (em kDa); Linha 2: fração aplicada (lisado bacteriano); Linha 3: fração excluída da resina de proteína (“void”); Linha 4: primeiro eluído; Linha 5: segundo eluído; Linha 6 : Terceiro eluído; Linha 7: Quarto eluído.

### **4.3 Análise da reatividade do anticorpo monoclonal A4D12 contra a proteína recombinante purificada**

Conforme observado na Figura 3, a reatividade do monoclonal A4D12 (mAb A4D12) foi testada contra a fração purificada foi avaliada utilizando-se o ensaio *immunoblot* (Figura 3). A proteína recombinante purificada foi ensaiada com o anticorpo monoclonal A4D12 específico para SAG2A, com amostra de soro controle positivo policlonal específico para o *T. gondii* ou com amostra de soro negativo para *T. gondii* utilizado como controle. Ao analisar os resultados foi observado que na tira 1 ocorreu o reconhecimento pelo anticorpo monoclonal A4D12 de uma banda única na altura de aproximadamente 20 kDa Estes resultado indica que a fração obtida, reconhecida pelo mAb A4D12 correspondente a proteína recombinante SAG2A.

Adicionalmente, a análise da reatividade de soro positivo para os anticorpos IgG específico para *T. gondii* foi observado uma forte reatividade com uma banda na altura de aproximadamente 20 kDa e uma reatividade mais fraca com uma banda na altura de aproximadamente 40 kDa, provavelmente resultante da formação de dímeros estáveis de SAG2A mesmo na presença de SDS. Já em relação à reação confeccionada com soro negativo para *T. gondii*, como esperado, nenhuma reatividade foi observada a qualquer componente purificado.



**Figura 3. Immunoblot preparado com antígeno recombinante SAG2A de *T. gondii* purificado.** Immunoblot preparado com antígeno recombinante SAG2A solubilizados em SDS, separados em SDS-PAGE a 15%. A linha 1 é representativa de reação com anticorpo monoclonal A4D12; A linha 2 é representativa de reação com soro positivo policlonal específico para *T. gondii*; A linha 3 é representativa da reação com soro negativo específico para *T. gondii*. Os padrões de massa molecular (Mr) expressos em kiloDaltons (kDa) estão indicados à esquerda.

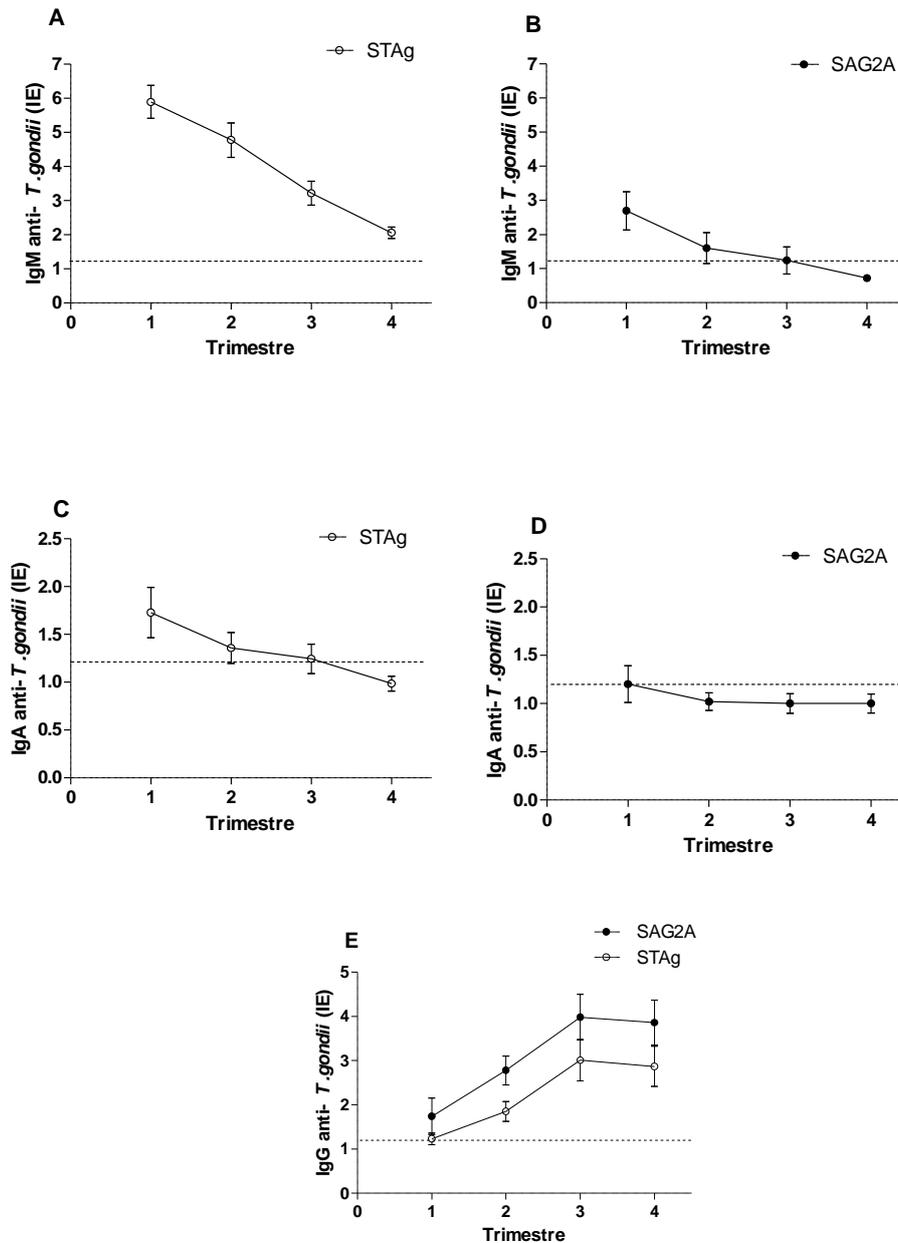
#### 4.4 Análise cinética dos anticorpos IgM, IgA e IgG específicos para SAG2A ou STAg

A cinética da resposta imune humoral para o *T. gondii* foi avaliada em amostras de soros de pacientes com toxoplasmose aguda (Figura 4). A cinética da produção de anticorpos IgM e IgA foi determinada por meio de ELISA captura para o antígeno STAg (Figura 4A e C). e por ELISA indireto para proteína recombinante SAG2A (Figura 4B e D).

Conforme demonstrado na figura 4A, foi detectada uma redução gradual dos níveis de anticorpos IgM para STAg, com índices ELISA médios de 5,8 no primeiro trimestre de infecção para 2,0 no quarto trimestre, embora em nossas análises os níveis de anticorpos IgM permaneceram altos mesmo depois dos doze meses de infecção. Perfil similar foi observado quando a proteína recombinante SAG2A foi utilizada como antígeno, contudo os níveis de IgM foram menores para SAG2A em comparação com os observados para STAg. Com valores médios de IE indo de 2,7 para 0,7, no primeiro e no quarto trimestre, respectivamente (Figura 4B). Nesta análise, muitas amostras soros, quando testados para IgM específica para SAG2A por ELISA indireto, tornaram-se negativos no terceiro e quarto trimestres após a infecção.

Na análise da cinética dos anticorpos IgA, uma redução gradativa dos níveis de anticorpos IgA específicos para STAg foi observado durante os meses analisados no estudo, com valores médios de EI variando de 1,7 para 1,0; com a maioria das amostras de soros negativando no terceiro e no quarto trimestre de infecção (Figura 4C). Em contraste, na análise dos níveis de anticorpos IgA específicos para SAG2A, demonstraram valores médios de EI variando de 1,2 para 1,0, do primeiro e quarto trimestre de análise, sendo que as amostras soros se tornaram negativos a partir do segundo trimestre de infecção (Figura 4D).

Uma análise comparativa para detectar anticorpos IgG foi realizada utilizando-se SAG2A ou STAg como antígenos em testes de ELISA indireto (Figura 4E). Nestes ensaios, os níveis de IgG específicos para SAG2A e STAg, demonstraram um perfil cinético similar em todos os trimestres analisados, no entanto, uma reatividade levemente maior para SAG2A foi detectada em todos os momentos em comparação com STAg.



**Figura 4.** Análise cinética de anticorpos IgM (A, B), IgA (C, D) e IgG (E) para *Toxoplasma gondii*. Níveis de imunoglobulinas determinados por ELISA captura (A e C) ou ELISA indireto (B, D e E), utilizando-se antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) ou antígeno recombinante SAG2A em amostras de soros de pacientes com toxoplasmose em diferentes momentos após o estabelecimento da infecção. Os níveis de anticorpos foram expressos em índices ELISA (IE). As linhas pontilhadas indicam o *cutoff* da reação.

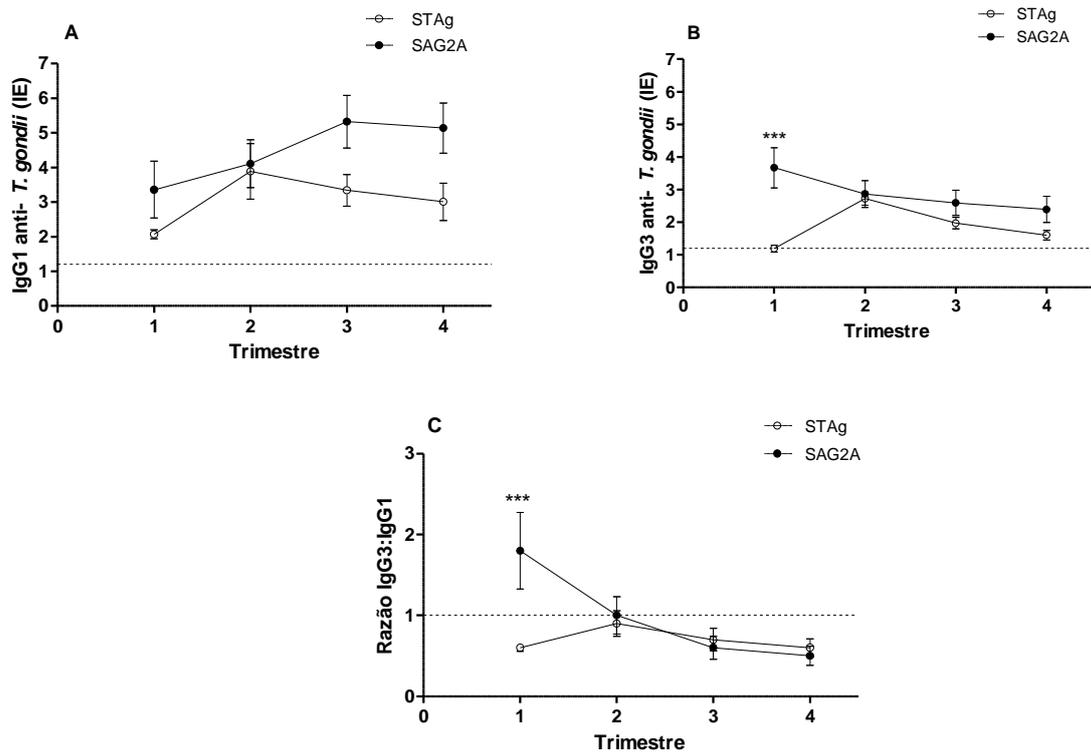
#### 4.5 Análise cinética de anticorpos IgG1 e IgG3 específicos para SAG2A e STAg

Com o objetivo de avaliar o perfil cinético das subclasses de IgG, a técnica de ELISA indireto foi realizada utilizando SAG2A em comparação com STAg (Figura 5). Como demonstrado na figura 5A, foi observado um aumento nos níveis de anticorpos IgG1 específicos para STAg do primeiro para o segundo bimestre de infecção, com um leve decréscimo no terceiro e no quarto trimestre de infecção. Embora a cinética da resposta de anticorpos IgG1 para STAg tenha apresentado uma redução dos níveis no quarto trimestre, todos os pacientes foram positivos em todos os momentos analisados. Similar ao observado na cinética de anticorpos IgG, os níveis de isotipos IgG1 específicos para SAG2A foram maiores do que aqueles detectados para STAg em todos os momentos analisados, contudo, não foi observado diferenças significativas nos níveis de IgG1. A resposta do anticorpo IgG1 contra SAG2A apresentou um aumento contínuo até o terceiro trimestre, com valores médios de IE variando de 3,4 para 5,3. Nestas condições uma leve redução nos níveis de anticorpos IgG1 (IE médio = 5,14) foram observadas para o quarto trimestre, no entanto, todas amostras apresentavam positividade.

O perfil cinético da resposta dos anticorpos IgG3 para STAg apresentou um perfil que se assemelha em comportamento ao visto para anticorpos IgG1 específicos para STAg, no entanto, com baixíssimos níveis de IgG3 ( IE médio = 1,19) detectados no primeiro trimestre, seguido de um aumento no segundo trimestre e redução gradual nos terceiro e quarto trimestres da análise (Figura 5B). Em contraste, quando a proteína recombinante SAG2A foi utilizada como antígeno, altos níveis de anticorpos IgG3 específicos para SAG2A foram encontrados logo no primeiro trimestre da infecção, com valores médios de IE de 3,7. A Análise comparativa entre os níveis de anticorpos IgG3 específicos para SAG2A (IE médio = 3,67) ou STAg (EI médio de 1,19) demonstrou uma diferença significativa ( $P < 0,0001$ ) nestes

níveis no primeiro bimestre da análise (Figura 5B). A cinética de anticorpos IgG3 demonstrou uma redução gradativa ao longo do segundo, terceiro e quarto trimestres do acompanhamento sorológico.

No intuito de explorar as diferenças observadas entre os perfis de respostas dos anticorpos de IgG1 e IgG3 para STAg e SAG2A foi analisada razão entre os níveis das subclasses IgG3:IgG1 (Figura 5C). A análise das razões entre IgG3:IgG1 específicas para STAg, demonstrou um perfil bifásico ao longo do acompanhamento sorológico, com a razão aumentando do primeiro para o segundo trimestre e diminuindo no terceiro e no quarto trimestres. Nestas condições a razão IgG3:IgG1 para STAg sempre esteve abaixo do *cutoff* de valor 1,0, em todos os momentos analisados. Já a análise da razão IgG3:IgG1 para SAG2A, apresentou alta razão (razão IgG3:IgG1= 1,8) no primeiro bimestre seguido de uma redução acentuada durante os demais bimestres do acompanhamento sorológico. A razão de anticorpos IgG3:IgG1 foi sempre menor que 1,0 nos terceiro e quarto trimestre após a infecção. Nesta análise, a razão IgG3:IgG1 verificada no primeiro bimestre foi significativamente maior para SAG2A em comparação com STAg ( $P < 0,0001$ ). Paralelamente, as amostras de soros foram também analisadas em ELISA indireto para detecção dos isotipos IgG2 e IgG4, contudo, nenhuma reatividade acima do linear de positividade (*cutoff* = 1,2) foi detectada em nenhum momento do acompanhamento sorológico (dados não mostrados).



**Figura 5. Cinética de anticorpos IgG1 (A) e IgG3 (B) para antígenos de *Toxoplasma gondii*.** Cinética determinada por meio de ELISA utilizando o antígeno solúvel de *T. gondii* (STAg) ou a proteína recombinante SAG2A, frente a amostras de soros de pacientes com toxoplasmose em diferentes momentos temporais depois da infecção. A razão IgG3:IgG1 para SAG2A e STAg também é mostrada (C). Diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste *t* de Student não pareado. \*\*\* $P < 0,0001$ .

#### 4.6 Análise de avides de anticorpos IgG1 utilizando *slot-blot*

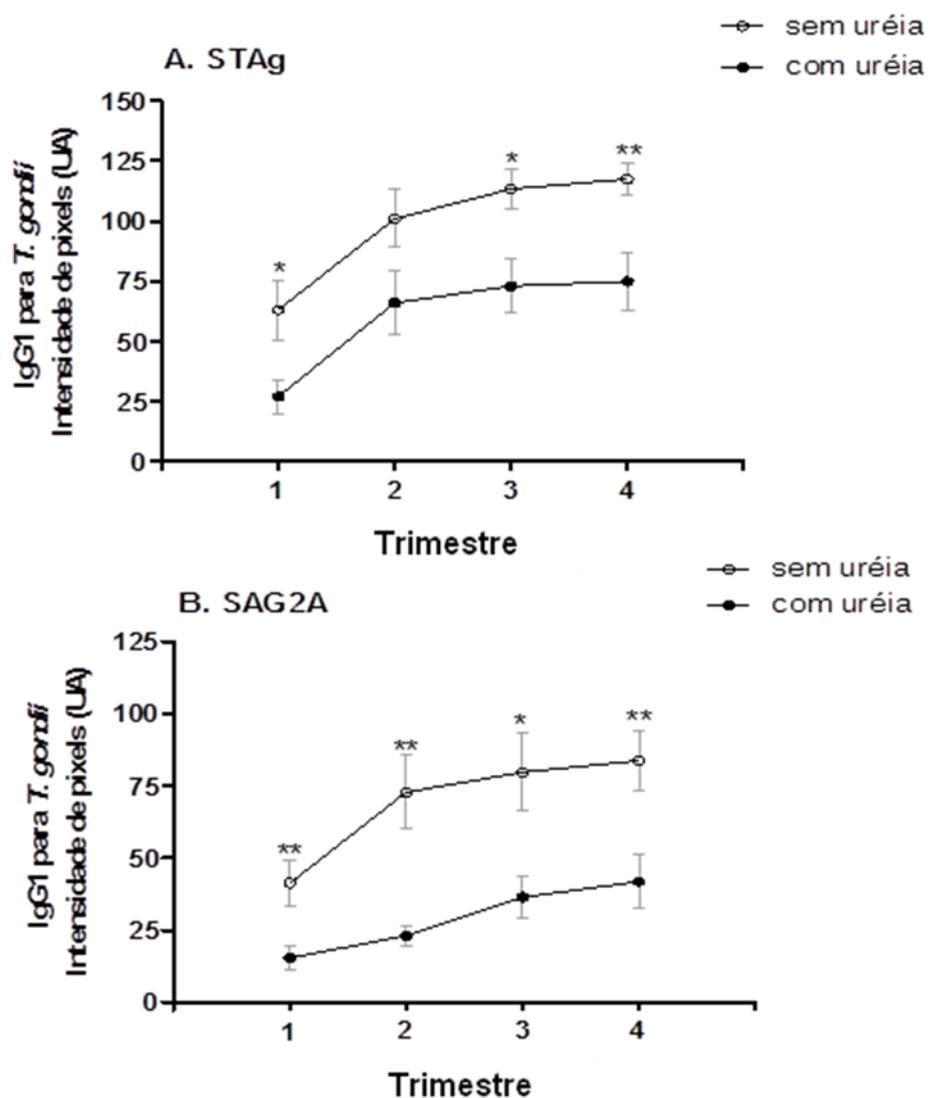
Amostras de soros seqüenciais de pacientes com toxoplasmose foram analisadas para a detecção de anticorpos IgG1 específicos para SAG2A ou STAg na presença ou ausência do agente desnaturante uréia utilizando-se o imunoensaio de *slot-blot* (Figura 6). A análise cinética da reatividade de anticorpos IgG1 específicos para STAg demonstrou que amostras submetidas ao tratamento com uréia apresentaram uma redução da reatividade anticórpica quando comparadas as amostras que não receberam o tratamento com o mesmo agente desnaturante, com redução significativa no primeiro, terceiro e no quarto bimestres analisados ( $P < 0,05$ ) (Figura 6A). Apesar da redução da reatividade na presença de uréia, o perfil cinético em ambas condições foram semelhantes, com aumento gradativo da reatividade com longo do tempo de acompanhamento.

Um perfil crescente também foi observado para a reatividade de anticorpos IgG1 específicos para SAG2A, com uma notável redução da intensidade de reação em todos os momentos analisados em amostras que foram quando tratadas com uréia ( $P < 0,05$ ) (Figura 6B). A redução da reatividade de SAG2A no segundo bimestre, na presença de uréia, foi mais acentuada do que a observada para STAg no mesmo período de tempo.

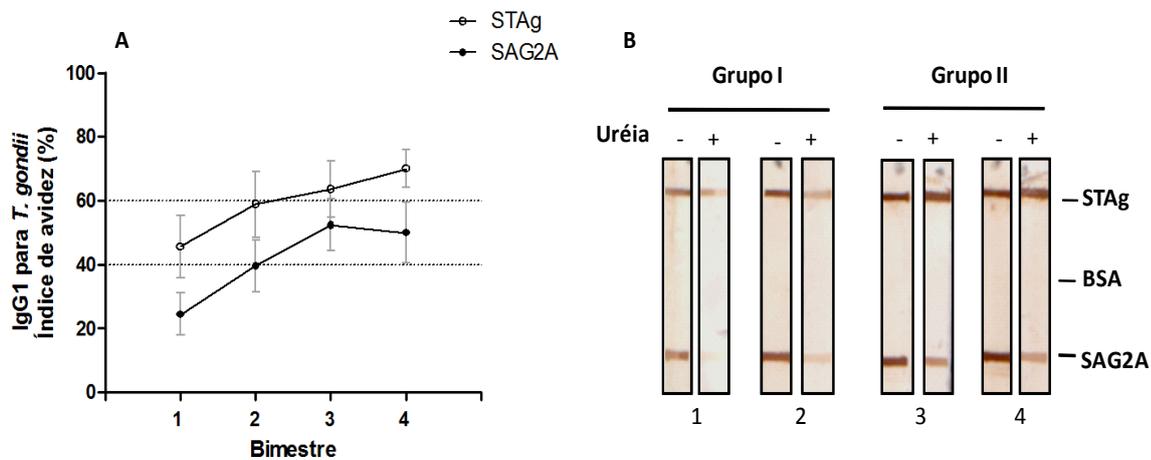
Conforme observado na figura 7A, os índices de avides (IA) para anticorpos IgG1 específicos para STAg e SAG2A apresentaram um aumento contínuo ao longo do tempo. Na comparação dos índices de avides entre os antígenos, não existiu diferenças estatísticas entre os mesmos, contudo a análise entre os períodos de tempo para cada antígeno isoladamente demonstrou que os valores de índice avides (IA) para SAG2A observados no terceiro e no quarto trimestres foram significativamente maiores do que aqueles obtidos no primeiro trimestre. Já para STAg não foram detectadas diferenças entre os diferentes momentos da análise (Figura 7A).

Quando as amostras foram analisadas em intervalos de índices avidez, foi observado que soros do primeiro e do segundo trimestre apresentaram baixa avidez média de anticorpos IgG1 (IA, 40%) para SAG2A enquanto as mesmas amostras demonstraram avidez média intermediária ( $40% < IA < 60%$ ) de IgG1 quando STAg foi utilizado como antígeno. Já nos últimos trimestres (terceiro e quarto) a avidez média observada foi alta ( $IA > 60%$ ) para IgG1 específica para STAg e intermediária ( $40% < IA < 60%$ ) para IgG1 específica para SAG2A .

A figura 7B é demonstrado um *slot-blot* representativo, preparado com STAg, SAG2A e soro albumina bovina- BSA (proteína irrelevante), e ensaiado contra amostras de soros sequenciais de um paciente com toxoplasmose, na presença ou ausência do tratamento com uréia. As reações dos quatro bimestres foram distribuídas em Grupo I (1- 2 trimestres) e grupo II (3-4 trimestres). O perfil de reatividade anticórpica apresentado no *slot-blot*, demonstra a redução na reatividade de IgG1 para os antígenos STAg e SAG2A no grupo I em comparação com o grupo II, após o tratamento com uréia. Em adição a redução de reatividade dos anticorpos IgG1, após o tratamento com agente desnaturante, foi mais acentuada para SAG2A que para o antígeno STAg, demonstrando que a avidez de IgG1 para STAg foi maior do que para SAG2A em amostras de soros do grupo II (Figura 7B). Nas mesmas condições experimentais nenhuma reatividade foi observada para a proteína irrelevante (BSA). Paralelamente, algumas amostras de soros foram também analisadas por meio de *slot-blot* para detecção da subclasse IgG3, contudo, nas condições testadas por nós nenhuma reatividade foi observada nos bimestres analisados ( dados não mostrados).



**Figura 6.** Análise cinética da reatividade de anticorpos IgG1 para os antígenos SAG2A e STAg, determinada por meio de ensaio de *slot-blot*. *Slot-blot* preparado com 2 µg de STAg (A) ou a proteína recombinante SAG2A (B) e ensaiados com amostras de soros de pacientes com toxoplasmose em diferentes momentos após infecção, na presença ou ausência de uréia. A intensidade de pixels de cada banda foi determinada por meio de análise no software Kodak 1D *image analysis* (KODAK) e expressa como unidades arbitrárias (UA). m determinadas pelo teste *t* de Student não pareado. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ .



**Figura 7. Análise da avididade de anticorpos IgG1 para os antígenos SAG2A e STAg.**

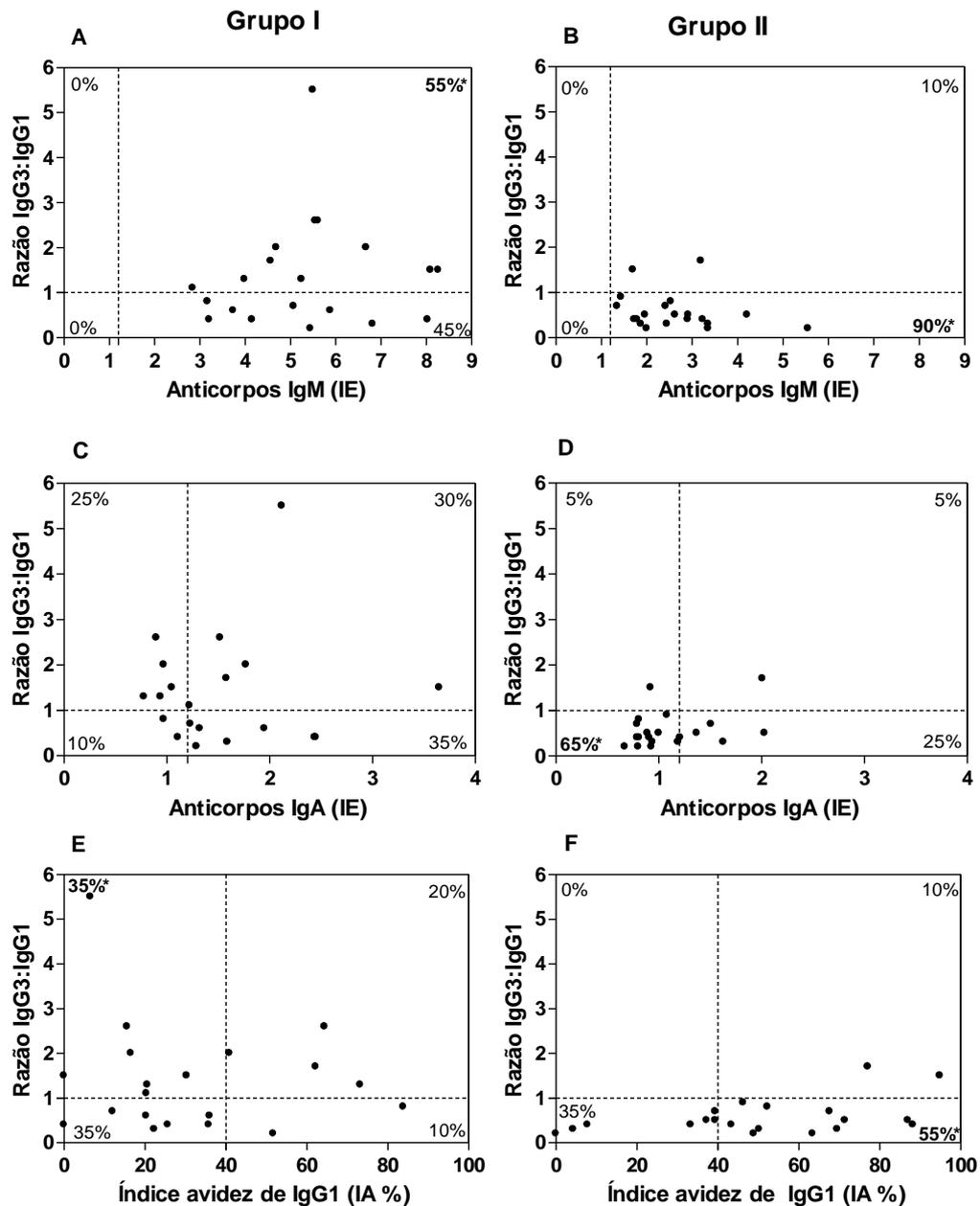
Índices de avididade (%) de anticorpos IgG1 para SAG2A e STAg determinados com base na intensidade de reatividade determinada em ensaio *slot-blot* (A). As linhas pontilhadas indicam os limites de avididade (A). Os dados foram expressos em porcentagem dos índices de avididade. *Slot-blot* representativo preparado com 2 µg de STAg, SAG2A e soro albumina bovina –BSA (proteína irrelevante) ensaiado com amostras seqüenciais (1<sup>o</sup>-4<sup>o</sup> bimestre) de um paciente com toxoplasmose (B).

#### **4.7 Associação entre a razão IgG3: IgG1 e níveis de anticorpos IgM, IgA ou avides de IgG1**

A associação entre os resultados sorológicos baseados na reatividade de SAG2A (razão IgG3: IgG1 e avides de IgG1) e marcadores convencionais clássicos ( IgM e IgA para STAg por ELISA captura) para caracterizar fase aguda da toxoplasmose foi avaliada em cada grupo de estudo (Figura 8). A associação entre razão IgG3:IgG1 e anticorpos IgM em amostras de soros do grupo I (Figura 8A) demonstrou 55% de duplos positivos ,alta razão IgG3:IgG1 ( $> 1$ ) e níveis positivos de IgM ( $IE > 1,2$ ), enquanto somente 10% das amostras de soro no grupo II (Figura 8B) foram duplo positivas ( $P<0,05$ ). De outro modo, resultados sorológicos mostrando baixa razão IgG3:IgG1 ( $<1$ ) e níveis altos de IgM foram encontrado em 90% das amostras de soros do grupo II e 45 % do grupo I ( $P<0,05$ ).

Em relação à análise da associação entre a razão IgG3:IgG1 e anticorpos IgA (Figura 8C e D), foi observado que resultados duplo negativos (razão IgG3:IgG1 $<1,0$  e níveis de IgA $<1,2$ ) foram encontrados em apenas 10% das amostras de soros no grupo I (Figura 7C) e 65% no grupo II ( Figura 7D) ( $P<0,05$ ).

Na análise da associação entre a razão IgG3:IgG1 específica para SAG2A e a avides de IgG1 para SAG2A pode- se observar que soros apresentando baixos índices de avides ( $IA<40\%$ ) e alta razão IgG3:IgG1 ( $>1$ ) foram encontrados em 35% das amostras de soros do grupo I (Figura 8E) comparado com a percentagem de 0% no grupo II ( Figura 8F) ( $P<0,05$ ). Em contraste, resultados com baixa razão IgG3:IgG1 ( $<1$ ) e altos índices avides ( $IA>40\%$ ) foram encontrados em 10% das amostras de soros do grupo I e 55% do grupo II ( $P<0,05$ ).



**Figura 8.** Associação entre razão IgG3:IgG1 e anticorpos (IgM e IgA) para *Toxoplasma gondii*. As reações de ELISA foram preparadas com STAg como antígeno em soros de pacientes com toxoplasmose em diferentes momentos após a infecção. (A-D). Associação entre a razão IgG3:IgG1 determinados por ELISA e avides do anticorpo IgG1 para *Toxoplasma gondii* foi determinado por *slot-blot* utilizando-se SAG2A como antígeno (E e F). As amostras de soros que foram coletadas do mês até o quarto mês após o desenvolvimento da doença representam a fase aguda (grupo I) (A, C, E). Amostras de soros coletadas entre o quarto e o oitavo mês representam a fase convalescente precoce (grupo II) (B, D, F). Significância estatística foi determinada pelo teste exato de Fisher. \* $P < 0,05$ .

#### 4.8 Reatividade de anticorpos e índices avides para STAg e SAG2A

Dados sumarizados dos níveis médios de reatividade de anticorpos a o índice avides no grupos I ( soros coletados até o sexto mês após o desenvolvimento da doença) e no grupo II ( soros coletados entre o sexto e o décimo segundo mês após o desenvolvimento da doença) são apresentados na tabela 1. Nesta tabela está presente a comparação dos dados entre grupos para cada antígeno ou entre os antígenos dentro dos grupos. Na análise do anticorpo IgM, os níveis médios de IgM para STAg foram maiores para o grupo I quando comparado com o grupo II, com 100% de positividade em ambos grupos. Os níveis médios de anticorpos IgM para SAG2A foram maiores no grupo I do que no grupo II e a soropositividade também foi maior no grupo I (55%) do que no grupo II (10%) ( $P<0,05$ ). Na comparação entre os dois antígenos, o antígeno STAg apresentou maiores níveis de anticorpos IgM e de percentagem de positividade em comparação com SAG2A dentro dos mesmos grupos analisados.

Os níveis de anticorpos IgA para STAg foram maiores no grupo I em comparação com o grupo II ( $P<0,05$ ). Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada entre os grupos I e II para IgA específica para SAG2A. Além do mais, os níveis médios de IgA para STAg foram maiores do que os observados para SAG2A no grupo I ( $P<0,05$ ) enquanto que no grupo II não houve diferenças significantes.

Na análise dos anticorpos IgG, os níveis médios para STAg e SAG2A foram maiores no grupo II em comparação com o grupo I, com altos níveis médios de IgG para SAG2A em comparação com STAg em ambos os grupos ( $P<0,05$ ). Em relação às subclasses de IgG, os níveis médios de IgG1 para STAg não foram diferentes estatisticamente entre os dois grupos. Para IgG1 específica para SAG2A foi observado altos níveis médios no grupo II em comparação com o grupo I ( $P<0,05$ ). Quando foram comparados os antígenos, foi observado níveis significativamente maiores para SAG2A no grupo II em comparação com STAg ( $P<0,05$ ).

Já os níveis médios de IgG3 não apresentaram diferenças significantes entre os grupos para ambos antígenos. Entretanto, altos níveis de IgG3 para SAG2A foram encontrados nos grupos I e II em comparação com STAg nos mesmos grupos ( $P<0,05$ ). Adicionalmente, a percentagem de positividade para IgG3 no grupo I foi maior para SAG2A (100%) em comparação com STAg (70%) ( $P<0,05$ ).

A razão IgG3:IgG1 foi avaliada em relação as diferenças entre os antígenos e entre os grupos. Nesta análise, não houve diferenças para STAg entre os grupos estudados, enquanto que para SAG2A maiores níveis foram observados no grupo I em comparação com o grupo II. Na análise das diferenças entre os antígenos a razão IgG3:IgG1 apresentou maiores níveis para SAG2A no grupo I em comparação com STAg no mesmo grupo ( $P<0,05$ ).

Em consideração ao índice de avidéz de IgG1 (IA), os resultados mostram que valores de IA médios para STAg e SAG2A foram maiores no grupo II quando comparado com grupo I ( $P<0,05$ ). Na comparação de STAg e SAG2A, no grupo I o índice médio de avidéz foi maior para STAg em comparação com SAG2A, porém não foram observadas diferenças entre os antígenos no grupo II.

**Tabela 1.** Reatividade dos isotipos de anticorpos e índice avidéz do antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg) e do antígeno recombinante SAG2A de *Toxoplasma gondii* determinado por ELISA ou *slot-blot* em soros de pacientes com toxoplasmose aguda (Grupo I) ou convalescente (Grupo II).

Reatividade Anticorpos	Anti-STAg <sup>a</sup>		Anti-SAG2A <sup>a</sup>	
	Grupo I (n=20)	Grupo II (n= 20)	Grupo I (n=20)	Grupo II (n=20)
<b>Isotipos de anticorpos (ELISA)<sup>a</sup></b>				
IgM	5,3 ± 1,6* <sup>#</sup> 100% <sup>#</sup>	2,6 ± 1,0 <sup>#</sup> 100% <sup>#</sup>	2,1 ± 1,7* 55%*	1,0 ± 0,9 10%
IgA	1,5 ± 0,7 <sup>#</sup> 65%	1,1 ± 0,4 30%	1,1 ± 0,5 30%	1,0 ± 0,3 20%
IgG	1,5 ± 0,6 60%	2,9 ± 1,4* 85%	2,3 <sup>#</sup> ± 1,3 70%	3,9 ± 1,6* <sup>#</sup> 90%
IgG1	3,0 ± 2,0 100%	3,2 ± 1,6 100%	3,7 ± 2,4 85%	5,2 ± 2,3* <sup>#</sup> 100%
IgG3	2,0 ± 0,9 70%	1,8 ± 0,5 85%	3, ± 1,7 <sup>#</sup> 100% <sup>#</sup>	2,5 ± 1,2 <sup>#</sup> 95%
Razão IgG3:IgG1	0,7 ± 0,4	0,7 ± 0,4	1,4 ± 1,2 <sup>#</sup> *	0,6 ± 0,4
<b>Índice avidéz<sup>b</sup> (<i>slot-blot</i>)</b>				
IgG1	52 ± 31 <sup>#</sup>	67 ± 23*	32 ± 24	50 ± 27*

<sup>a</sup> Dados expressos como média e desvio padrão do índice ELISA e percentagem de positividade de cada grupo.

<sup>b</sup> Dados são expressos como média e desvio padrão das percentagens do índice avidéz. Grupo I: amostras de soro colhidas de 0 a 4 meses do início da doença (fase aguda). Grupo II: amostras de soro colhidas entre 4 a 8 meses do início da doença (fase convalescente precoce).

<sup>#</sup> Diferenças significativas entre anti-SAG2A e anti-STAG dentro de cada grupo.

\*Diferenças significativas entre os grupos contendo anti-SAG2A ou anti-STAG;  $P < 0,05$  determinado pelo *t* de Student ou pelo teste exato de Fisher quando apropriado.

## 5. DISCUSSÃO

A maioria dos kits comerciais usados para realizar o diagnóstico da toxoplasmose é preparada primariamente utilizando extratos totais de *T. gondii*, que contêm diferentes macromoléculas e diferentes tipos de proteínas. Adicionalmente, várias preparações antigênicas usados no diagnóstico podem conter vários contaminantes, incluindo antígenos não relacionados ao parasito, como antígenos derivados de cultura celular ou derivados células de camundongo (LU et al., 2006). A produção de preparações de extrato total de taquizoítas de *T. gondii* apresenta considerável variação entre os testes de diagnóstico utilizados na rotina, com isso a padronização dos testes torna-se mais difícil, podendo influenciar nos resultados do produto final (LU et al., 2006).

Alguns estudos têm demonstrado que o uso de proteínas recombinantes de *T. gondii* apresenta um alto potencial de emprego no diagnóstico da toxoplasmose, com potencial de substituir os extratos protéicos totais utilizados na rotina (BEGHETTO et al., 2003, 2006; NIGRO et al., 2003; PIETKIEWICZ et al., 2004; HOLEC et al., 2007; GOLKAR et al., 2007). A utilização de proteínas recombinantes no diagnóstico permitiria uma padronização mais precisa dos testes, pelo fato de serem proteínas com um grau de pureza muito elevado, e poderiam auxiliar no desenvolvimento de testes diagnósticos com maior poder de discriminação entre fase aguda e crônica da infecção por *T. gondii*, pela possibilidade de escolha de antígenos específicos de cada fase (JOHNSON et al., 1992; BUFFOLANO et al., 2005).

Existe uma necessidade premente do desenvolvimento de novos testes diagnósticos que apresentem a propriedade de diferenciar infecções recentes (fase aguda e intermediária) de infecções com um caráter mais tardio (fase crônica). A utilização de testes com proteínas recombinantes que apresentem esta capacidade discriminatória pode adquirir importância

clínica, principalmente em casos de infecção congênita, considerando os danos graves que podem ocorrer no feto (KOTRESHA; NOORDIN, 2010).

Potenciais marcadores de fase aguda da infecção por *T. gondii*, como as proteínas recombinantes MAG1 e GRA2 tem sido descritos. Recentemente, Béla e colaboradores (2008) demonstraram que a proteína recombinante SAG2A apresentava potencial de ser utilizada no diagnóstico da toxoplasmose. Foi descrito que a utilização da proteína SAG2A em testes de ELISA indireto mostrou um aumento na positividade em pacientes que estavam na fase aguda em comparação com pacientes na fase crônica. Este achado indicou que a proteína recombinante SAG2A poderia ser utilizada como potencial marcador diagnóstico de toxoplasmose aguda (BÉLA et al., 2008).

O objetivo do presente estudo foi determinar a cinética da produção de anticorpos específicos para o *T. gondii* utilizando a proteína recombinante SAG2A em comparação com o antígeno solúvel de *Toxoplasma* (STAg). Em adição, foi determinada a razão entre os anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3, avaliando-se se existia uma associação com anticorpos típicos de fase aguda (IgM e IgA) ou com o índice de avidéz de IgG1 em amostras seqüenciais de soros. Este estudo, realizado com 80 amostras de soros provenientes de 10 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de toxoplasmose, foi desenvolvido utilizando-se como preparações antigênicas a proteína recombinante SAG2A e o extrato solúvel total STAg e permitiu caracterizar o perfil cinético de anticorpos específicos dos isotipos IgM, IgA e IgG e das subclasses IgG1 e IgG3.

Foi desenvolvido, no presente estudo, um sistema eficiente de expressão protéica, em *E. coli*, utilizando baixas temperaturas (16 horas a 20 °C). Este sistema é conhecido por permitir uma maior solubilidade das proteínas, de modo a evitar a formação de corpos de inclusão (agregados insolúveis) no citoplasma e diminuir a atividade das proteases que poderiam diminuir o rendimento da produção protéica (MAKRIDES et al., 1996;

SORENSEN; MORTENSEN et al., 2005). A otimização da expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é facilitada pela liberdade de controle dos parâmetros utilizados na produção destas proteínas. Dentre as principais estratégias para alcançar um maior rendimento, destacam-se os parâmetros temperatura, taxa de expressão, taxa de metabolismo, presença de proteínas de fusão e presença de moléculas chaperones (JONASSON et al., 2002; SORENSEN; MORTENSEN et al., 2005).

O sistema de expressão utilizado permitiu gerar, com alto rendimento, um produto protéico com aproximadamente 17- 20 kDa, diferindo do peso molecular esperado de 22 kDa. Esta diferença reside no fato de que em sistemas de expressão procariotos as modificações pós-transdacionais encontradas em eucariotos, tais como glicosilação e fosforilação, não são produzidas; diminuindo desta forma o peso molecular do produto final expresso (MAKRIDES et al.,1996;; SORENSEN; MORTENSEN et al., 2005).

Com o intuito de investigar se o produto obtido na purificação apresentava antigenicidade, foi realizado o *immunoblot* utilizando o anticorpo monoclonal específico para a proteína SAG2A (mAb A4D12), soro policlonal positivo para *T. gondii* e soro negativo para *T. gondii*. O mAb A4D12 reconheceu uma banda única no produto purificado, demonstrando que, apesar das diferenças pós-traducionais entre a proteína recombinante e a proteína nativa, o epítipo reconhecido pelo mAb A4D12 foi preservado. Nesse contexto, a reatividade sorológica contra um soro policlonal positivo para toxoplasmose também foi avaliada. Nossos resultados demonstraram uma forte reatividade contra o componente de 17-20 kDa e uma reatividade mais fraca com um componente com peso molecular mais elevado. Este resultado pode ser explicado pelo fato de muitas proteínas recombinantes formam dímeros estáveis mesmo na presença de SDS, incluindo membros de proteínas relacionadas à SAG-1 (BANEIX; MUJACIC, 2004; HE et al., 2002). Esta reação mais intensa detectando estas formas diméricas menos abundantes, em análise de *immunoblotting*, pode ser explicada pela

capacidade dos anticorpos policlonais reconhecerem vários epítomos da proteína e, portanto, de intensificar a marcação do dímero neste tipo de análise. Em relação ao teste com amostras de soro negativos para toxoplasmose, observou-se a ausência de reatividade, indicando que a proteína estava livre de contaminantes que poderiam levar a resultados falsos-positivos.

Portanto, após estes passos iniciais de produção protéica, as análises cinéticas dos anticorpos anti-*T. gondii* foram investigadas. Na análise cinética dos anticorpos IgM específicos para STAg, por ELISA captura, uma diminuição gradual dos níveis foi observada ao longo do tempo, embora todos os pacientes permaneceram com níveis de IgM positivos até o último bimestre. Um perfil similar foi observado para os níveis de IgM específicos para SAG2A, utilizando-se ELISA indireto nos primeiros dois trimestres, sendo que muitos pacientes tornaram-se negativos após o terceiro trimestre (6-9 meses). Este resultado indica que anticorpos IgM específicos para SAG2A foram produzidos em uma fase aguda precoce da toxoplasmose, e que a positividade foi limitada no tempo quando comparada com a positividade de anticorpos específicos para STAg, que permaneceu alta até o último bimestre. A permanência de níveis elevados de IgM em pacientes testados com STAg pode ser explicada pelo fenômeno conhecido como “arraste de IgM”, no qual pode ser detectada positividade para IgM em pacientes com mais de um ano de infecção (HEGAB; AL-MUTAWA, 2003; REMINGTON; THULLIEZ; MONTOYA, 2004; KOTRESHA; NOORDIN, 2010). Por outro lado, os resultados obtidos com a diminuição da positividade das amostras testadas com SAG2A, demonstra que o fenômeno de arraste de IgM aparentemente não ocorre quando se utiliza esta proteína recombinante como preparação antigênica. Além disso, estes resultados demonstram pela primeira vez uma redução nos níveis de anticorpos IgM específicos para SAG2A na transição entre as fases aguda precoce e convalescente precoce, indicando que este marcador sorológico poder ser valioso nas investigações diagnósticas de determinação da fase da infecção.

Os níveis de anticorpos IgA específicos para STAg foram analisados por ELISA de captura de modo que foi observado uma redução gradual ao longo do tempo. Durante o acompanhamento sorológico, uma baixa sensibilidade foi observada no ELISA indireto desenhado para detecção de IgA específicos para SAG2A. Em nossas condições, todas as amostras foram negativas para IgA após o segundo bimestre. A baixa sensibilidade detectada neste ensaio revela que o ELISA indireto usado para detectar anticorpos IgA específicos para SAG2A apresenta um limitado valor no diagnóstico da toxoplasmose. De maneira semelhante o estudo de Gutiérrez e colaboradores (1997) demonstrou que a detecção de anticorpos IgA específicos para *T. gondii* apresentou um limitado valor diagnóstico, mesmo utilizando o ELISA de captura.

O acompanhamento sorológico de anticorpos IgG mostrou um perfil cinético crescente similar para ambos antígenos, com níveis levemente maiores para SAG2A. Para ambos os antígenos os níveis de anticorpos IgG foram maiores no terceiro trimestre (6-9 meses). Ferrandiz e colaboradores (2004) utilizaram as proteínas recombinantes GRA1 e GRA7 (domínios N-terminais) em estudo cinético de anticorpos IgG em amostras de soros sequenciais. O perfil encontrado ao longo do tempo, por estes autores, apresentou um perfil de reatividade extremamente heterogêneo entre os pacientes, ora alternando entre reduções e aumentos dos níveis de anticorpos no decorrer dos meses analisados. Em nosso estudo, o perfil de anticorpos IgG para SAG2A foi mais homogêneo de modo que o perfil foi uniformemente crescente em todas as amostras de soros nos bimestres analisados. Este achado sugere que a proteína recombinante SAG2A apresenta um potencial de utilização em estudos cinéticos para anticorpos IgG.

Outro trabalho descrito na literatura empregando análise cinética de anticorpos IgG utilizando-se proteínas recombinantes (GRA4, GRA7 e ROP2) foi desenvolvido por Altcheh e colaboradores (2006). O perfil cinético de anticorpos IgG específicos para as proteínas

recombinantes GRA4 e GRA7 encontrado por estes autores foi decrescente ao longo do tempo, enquanto que o perfil da proteína ROP2 foi muito semelhante ao observado em nosso estudo para SAG2A, com níveis crescentes ao longo do tempo. Estes achados mostram que diferentes proteínas recombinantes podem apresentar padrões cinéticos variados.

O perfil cinético de anticorpos IgG1 específicos para *T. gondii* foi analisado utilizando o teste ELISA indireto. Após análise dos resultados, foi demonstrado que os níveis de anticorpos IgG1 aumentavam ao longo do tempo para ambos antígenos. Os maiores níveis para STAg foram detectados no segundo bimestre, enquanto que para SAG2A foram no terceiro bimestre. Béla e colaboradores (2008) demonstraram que os níveis de anticorpos IgG1 e percentagem de positividade foram menores em amostras de soros consideradas de fase crônica. Em nosso estudo a reatividade em soros de fase aguda precoce foi inferior quando comparado com soros de fase convalescente precoce. Essas diferenças entre os dois trabalhos podem ser atribuídas ao tipo de amostragem utilizada, pois enquanto em nosso estudo utilizamos amostras de soros seqüenciais em um estudo longitudinal, no trabalho de BÉLA e al. (2008) foram utilizadas amostras de soros de fase aguda ou crônica em um estudo coorte.

Em adição, o perfil cinético de anticorpos IgG3 foi avaliado para STAg e SAG2A utilizando o ELISA indireto. O perfil cinético dos anticorpos IgG3 para STAg foi muito similar para o que foi visto com os anticorpos IgG1 contra STAg, porém com níveis mais baixos. Os níveis de anticorpos IgG3 para SAG2A foram maiores no primeiro trimestre, com redução contínua ao longo do tempo. Huskinson e colaboradores (1989) utilizando o ensaio *immunoblot* observaram que o anticorpo IgG3 testado contra o antígeno total de *T. gondii* reconhecia preferencialmente bandas protéicas com peso molecular abaixo 35 kDa. O anticorpo IgG3 reconheceu uma banda proeminente de aproximadamente 22 kDa em soros de pacientes em fase aguda. Estes resultados são semelhantes aos encontrados em nosso trabalho

com pacientes de fase aguda precoce apresentando altos níveis de IgG3 contra a proteína recombinante SAG2A. Os altos níveis de IgG3 para SAG2A no primeiro bimestre do acompanhamento sorológico sugerem que este isótipo poderia ser um parâmetro complementar no diagnóstico da toxoplasmose aguda.

Da análise da razão IgG3:IgG1 ao longo do tempo, uma diferença significativa foi observada para razão IgG3: IgG1 para SAG2A em comparação com a razão IgG3: IgG1 para STAg no primeiro trimestre. A alta razão IgG3:IgG1 detectada neste primeiro momento da infecção foi devido aos altos níveis de IgG3 quando comparado com os baixos níveis de IgG1. Deste modo, a alta razão IgG3:IgG1 para SAG2A poderia ser considerado um fator adicional que poderia ser utilizado, junto com outros marcadores, no diagnóstico da fase aguda precoce da toxoplasmose com potencial de discriminação de fases.

Tendo em vista que o ELISA a videz têm sido utilizado para diferenciar pacientes com infecção aguda e crônica (CAMARGO et al., 1991), foi realizado um ensaio *slot-blot* a videz para avaliar o perfil cinético de anticorpos IgG1 em presença do agente desnaturante uréia. A a videz dos anticorpos IgG1 para a SAG2A foi menor quando comparado com os índices a videz de IgG1 para STAg em todos os trimestres analisados. As amostras de soros, no primeiro e no segundo bimestre, apresentaram baixa a videz ( $IA < 40\%$ ) quando SAG2A foi usado como antígeno. Este dado é contrastante com o índice de a videz intermediário ( $40\% < IA < 60\%$ ) que foi observado quando o antígeno utilizado foi o STAg. Em adição, os índices a videz no terceiro e no quarto bimestre para STAg foram maiores ( $IA > 60\%$ ) em comparação com os índices que foram observados com SAG2A ( $40\% < IA < 60\%$ ), sugerindo que em amostras de fase mais aguda a a videz de IgG1 para SAG2A é menor. Estes dados estão consistentes com a expressão exclusiva da proteína SAG2A em taquizoítas de *T. gondii*, que são formas predominantes na fase mais inicial da infecção. Outra explicação para este

fenômeno de avidéz é a disponibilidade intrínseca numérica de epítomos em cada tipo de antígeno empregado.

Estes resultados sugerem que a avidéz de IgG1 para SAG2A poderia ser uma ferramenta promissória para diferenciação de amostras de pacientes em uma fase aguda mais precoce (primeiro e segundo bimestre) ou convalescente precoce (terceiro e quarto bimestre). Recentemente, Elyasi e colaboradores (2006) demonstraram um fenômeno similar utilizando o teste de avidéz de IgG para o antígeno recombinante GRA6. Neste estudo os autores mostraram presença de anticorpos IgG de baixa avidéz contra a recombinante GRA6 em pacientes com menos de 4 meses de infecção. Além disso, foi mostrado uma melhor performance no teste ELISA avidéz pra IgG específico para GRA6 em comparação o teste comercial de avidéz baseado em extratos totais. Em nosso trabalho, os resultados foram muito semelhantes ao trabalho de Elyasi, de modo que a diferença nos índices avidéz de IgG1 entre a proteína recombinante SAG2A e o STAg foram evidentes em pacientes do grupo I ( menos de 4 meses de infecção)

A análise da associação entre a razão IgG3:IgG1 específica para SAG2A e anticorpos IgM específica para STAg mostrou diferenças significantes entre os duplo-positivos em amostras de soros da fase aguda precoce (grupo I) e convalescente precoce (grupo II). No grupo I foi observado uma alta percentagem de associação (55%) entre alta razão IgG3:IgG1 e altos níveis de anticorpos IgM, enquanto que no grupo II a percentagem foi de associação foi apenas 10%. Este resultado sugere que em uma fase mais tardia ocorre uma redução no número de amostras de soros que são positivas para IgM e para razão IgG3:IgG1. Em relação às amostras de soros que tiveram baixa razão IgG3:IgG1 e altos níveis de detecção de IgM, as percentagens de associação encontradas foram de 45 % para o grupo I e de 90% para o grupo II. Tendo em vista que em muitos casos baixos títulos de IgM específicos para STAg persistem além da fase aguda de infecção (KOTRESHA; NOORDIN, 2010), os resultados

encontrados no presente estudo ganha relevância, uma vez que a razão IgG3:IgG1 é alta somente na fase aguda precoce. Portanto, amostras de soros que tiverem altos níveis de IgM e baixa razão IgG3:IgG1 para SAG2A apresentam uma probabilidade maior de estar em uma fase mais tardia da infecção, e que a IgM detectada constitui um fenômeno de “arraste de IgM”. Estudos até aqui desenvolvidos (HUSKINSON et al., 1989) demonstram que amostras de soros que reconhecem fortemente a SAG2 em pacientes de fase aguda, apresentam altos títulos de anticorpo IgM corroborando os resultados de associação encontrados no presente estudo.

Na análise das associações com o anticorpo IgA, os soros duplo-negativos apresentaram uma aumento da percentagem de associação do grupo I ( 10%) para o grupo II ( 65%). Deste modo, no grupo convalescente precoce a percentagem de soros negativos para ambos os parâmetros foi alta, já que os níveis de anticorpos IgA e IgG3 são encontrados mais precocemente. Este resultado sugere que uma baixa razão IgG3:IgG1 para SAG2A associada com baixos níveis de IgA para STAg poderia excluir a fase aguda precoce da infecção por *T. gondii*, com uma maior probabilidade dos soros estarem em uma fase convalescente precoce.

Em relação à associação entre a razão IgG3:IgG1 e os índices de avidéz de IgG1 para SAG2A, foi observado que soros com baixa razão IgG3: IgG1 e baixos índices de avidéz de IgG1 apresentaram uma maior percentagem de associação no grupo I em comparação com o grupo II, tendo em vista que os níveis de IgG3 estão altos no início da infecção e que os índices de avidéz encontram-se baixos. Amostras com baixa razão IgG3:IgG1 associado com altos índices avidéz de IgG1 apresentaram maior associação no grupo II, tendo em vista que os níveis de IgG3 diminuem e os índices de avidéz para IgG1 aumentam ao longo do tempo. Esses resultados demonstram que a associação entre a razão IgG3:IgG1 e os índices de avidéz para IgG1 poderiam ser um parâmetro complementar na diferenciação de fases de infecção por *T. gondii*.

Embora tenha sido observado diferenças entre as reatividades de anticorpos IgM e IgA entre os grupos e para ambos antígenos, foi observado uma baixa sensibilidade quando a SAG2A foi usada como antígeno, em decorrência da utilização da metodologia ELISA indireto, que apresenta uma sensibilidade menor quando comparado ao ELISA captura. De outro modo, as análises de anticorpos IgG, IgG1 e IgG3 revelaram altos valores de positividade sugerindo que IgG1 e IgG3 poderiam ser isotipos de valor no diagnóstico da toxoplasmose.

O presente estudo constitui o primeiro esforço para esclarecer o perfil cinético da resposta imune humoral contra a proteína recombinante SAG2A em amostras sequenciais de soros de pacientes com toxoplasmose aguda. Nossos resultados demonstraram que a cinética da produção de anticorpos IgG1 e IgG3 são diferentes ao longo do tempo de infecção e que a razão IgG3:IgG1 em associação com outros parâmetros, tais como níveis de anticorpos IgM/IgA para STAg ou índices avidéz de anticorpos IgG1 para SAG2A poderiam ser ferramentas promissoras para diferenciar amostras de fase aguda precoce e convalescente precoce. Estudos adicionais são necessários com o objetivo de se verificar o valor de cada um destes parâmetros isoladamente ou em conjunto, bem como a utilização de proteínas recombinantes em comparação com proteínas nativas no intuito de aumentar a acurácia dos testes diagnósticos utilizados para a determinação da fase da infecção humana por *T. gondii*.

## 6. CONCLUSÕES

- Os perfis cinéticos da produção de anticorpos IgG, IgM e IgA para SAG2A e STAg em pacientes com diagnóstico de toxoplasmose aguda apresentaram comportamentos distintos para os isotipos, de modo que, para IgM e IgA o perfil foi decrescente, enquanto que para IgG foi crescente.
- O antígeno SAG2A recombinante apresentou uma cinética de produção crescente para anticorpos da subclasse IgG1, enquanto que o perfil cinético de IgG3 foi decrescente, com altos níveis detectáveis no primeiro bimestre. Com o antígeno STAg a cinética dos anticorpos IgG1 e IgG3 foi semelhante, apresentando um platô no segundo bimestre.
- A determinação dos títulos e da avidéz de anticorpos IgG1 frente ao antígeno recombinante SAG2A por *slot-blot* demonstrou ser uma potencial ferramenta para a caracterização amostras em fase aguda precoce da infecção por toxoplasmose.
- A razão IgG3:IgG1 em associação com anticorpos IgM e IgA específicos para STAg e com índices de avidéz para IgG1 mostrou potencial para ser considerado um parâmetro adicional no diagnóstico da toxoplasmose humana, principalmente na diferenciação de fase aguda precoce e convalescente precoce.

## REFERÊNCIAS

- ALIBERTI, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 162-170, 2005.
- ALTECHEH, J.; DIAZ, S.D.;PEPE,M.C.;MARTIN,V.;NIGRO,M.;FREILIJ, H.;ANGEL, O.S. Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis.**Diagnostic microbiology and infectious disease**, v.56 , p. 161-165, 2006.
- AUBERT, D; MAINE, G. T.; VILLENA, I; HUNT, J. C.; HOWARD, L.; SHEU, M.; BROJANAC, S.; CHOVAN, L. E.; NOWLAN, S. F.; PINON, J. M. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p.1144–1150, 2000.
- BANEYX, F.; MUJACIC, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. **Nature Biotechnology**, v. 22, p. 1399-1408, 2004.
- BARRAGAN, A.; SIBLEY, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* is linked to parasite motility and virulence. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, p. 1625-1633, 2002.
- BEGHETTO, E.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; DEL PEZZO, M.; DI CRISTINA, M.; MINENKOVA, O.; PETERSEN, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5414-5418, 2003.
- BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BRUNO, L.; BUFFOLANO, W.; GARGANO, N. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2133-2140, 2006.
- BÉLA, S. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JUNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; CARVALHO, F. R.; OLIVEIRA, T. C.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 245-254, 2008.
- BHOPALE, G. M. Pathogenesis of toxoplasmosis.**Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 26, p. 213-222, 2003.
- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000.

BLADER, I. J.; SAEIJ, J. P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **Acta Pathologica Microbiologica and Immunologica Scandinava**, v. 117, p. 458-476, 2009.

BOOTHROYD, J. C.; GRIGG, M. E. Population biology of *Toxoplasma gondii* and its relevance to human infection: do different strains cause different disease? **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 438-442, 2002.

BUFFOLANO, W.; LAPPALAINEN, M.; HEDMAN, L.; CICCIMARRA, F.; PEZZO, M. D.; RESCALDANI, R.; GARGANO, N.; HEDMAN, K. Delayed maturation of IgG avidity in congenital toxoplasmosis. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 23, p. 825-830, 2004.

BUFFOLANO, W.; BEGHETTO, E.; DEL PEZZO, M.; SPADONI, A.; DI CRISTINA, M.; Petersen, E.; Gargano, N. Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5916-5924, 2005.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, p. 213-218, 1991.

CANDOLFI, E.; PASTOR, R.; HUBER, R.; FILISETI, D.; VILLARD, O. IgG avidity assay firms up the diagnosis of acute toxoplasmosis on the first serum sample in immunocompetent pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 83-88, 2007.

CANTOS, G. A.; PRANDO, M. D.; SIQUEIRA, M. V.; TEIXEIRA, R. M. Toxoplasmose: ocorrência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e diagnóstico. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 335-341, 2000.

CARMO, A. C. Z.; BOTTOM, S. R.; FLECK, J.; BECK, S. T. Importância do rastreamento pré-concepcional e pré-natal de infecção por *T. gondii*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 37, p. 49-52, 2005.

CARRUTHER, S. V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta Tropica**, v. 81, p. 111-122, 2002.

CARVALHO, F. R.; SILVA, DEISE, A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-Related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, p. 1265-1271, 2008.

CLEARY, M. D.; SINGH, U.; BLADER, I. J.; BREWER, J. L.; Boothroyd, J. C. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. **Eukaryotic Cell**, v. 1, p. 329-340, 2002.

CUNHA-JÚNIOR, J. P. **Caracterização molecular dos mimetopos H2 (SAG2A) e B12 (SRS6) de moléculas de superfície de *Toxoplasma gondii***. 2005. 84p. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

DENKERS, E. Y.; GAZZINELLI, R. T. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 569-588, 1998.

DI CRISTINA, M.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; SPADONI, A.; GUGLIETTA, S.; PICCOLLELA, E.; FELICI, F.; GARGANO, N. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 164-171, 2004.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v. 126, p. 57-72, 2004.

DUBEY, J. P. The History of *Toxoplasma gondii* - The First 100 Years. **Journal of Eukariotic Microbiology**, v. 55, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J. P.; LAPPIN, M. R.; KWOK, O. C. H.; MOFYA, S.; CHIKWETO, A.; BAFFA, A.; DOHERTY, D.; SHAKERI, J.; MACPHERSON, C. N. L.; SHARMA, R. N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and concurrent Bartonella Spp., Feline immunodeficiency virus, and feline leukemia virus infections in cats. **Journal of Parasitology**, v. 95, p. 1129-1133, 2009.

ELYASI, H.; BABAIE, J.; FRICKER-HIDALGO, H.; BRENIER-PINCHART, M. P.; ZARE, M.; SADEGHIANI, G.; ASSMAR, M.; PELLOUX, H.; GOLKAR, M. Use of dense granule antigen GRA6 in an immunoglobulin G avidity test to exclude acute *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, p. 349-355, 2010.

FERGUSON, D. J. P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memorials of Institute Oswald Cruz**, v. 104, p. 133-148, 2009.

FERRANDIZ, J.; MERCIER, C.; WALLON, M.; PICOT, S.; CESBRON-DELAUW, M. F.; PEYRON, F. Limited value of assays using detection of immunoglobulin G antibodies to the two recombinant dense granule antigens, GRA1 and GRA6 Nt of *Toxoplasma gondii*, for distinguishing between acute and chronic infections in pregnant women. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 1016-1021, 2004.

GATKOWSKA, J.; DZIADEK, B.; BRZOSTEK, A.; DZIADEK, J.; DZITKO, K.; DTUGOŃSKA, H. Determination of diagnostic value of *Toxoplasma gondii* recombinant ROP2 and ROP4 antigens in mouse experimental model. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, p. 137-141, 2010.

GOLKAR, M.; RAFATI, S.; ABDEL-LATIF, M. S.; BRENIER-PINCHART, M. P.; FRICKER-HIDALGO, H.; SIMA, B. K.; BABAIE, J.; PELLOUX, H.; CESBRON-DELAUW, M. F.; MERCIER, C. The dense granule protein GRA 2, a new marker for the serodiagnosis of acute *Toxoplasma* infection: comparison of sera collected in both France and Iran from pregnant women. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**, v. 58, p. 419-426, 2007.

GROSS, U.; KEKSEL, O.; DARDE, M. L. Value of detecting immunoglobulin E antibodies for the serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 4, p. 247–251, 1997.

GUTIERREZ, J.; RODRIGUEZ, M.; PIEDROLA, G.; DEL CARMEN MAROTO, M. Detection of IgA and low-avidity IgG antibodies for the diagnosis of recent active toxoplasmosis. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 3, p. 658–662, 1997.

HAUMONT, M.; DELHAYE, L.; GARCIA, L.; JURADO, M.; MAZZU, P.; DAMINET, P.; VERLANT, V.; BOLLEN, A.; BIEMANS, A.; JACQUET, A. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. **Infection and immunity**, v. 68, p. 4948–4953, 2000.

HE, X.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**, New York, v. 9, n. 8, p. 606-611, 2002.

HEGAB, S. M.; AL-MUTAWA, S. A. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 3, p. 84-105, 2003.

HENRIQUEZ, F. L.; WOODS, S.; CONG, H.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. **Trends in Parasitology**, v. 11, p. 550-555, 2010.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PIETKIEWICZ, H.; HOLEC, L.; GASIOR, A.; MYJAK, P. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. **Acta Parasitologica**, v. 50, p. 249–254, 2005.

HOLEC, L.; HISZCZYNSKZ-SAWICKA, E.; GASIOR, A.; BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; KUR, J. Use of MAG1 recombinant antigen for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. **Clinical Immunology**, v. 14, p. 220-225, 2007.

HOLEC, L.; GASIOR, A.; BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; KUR, J. *Toxoplasma gondii*: Enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 1-6, 2008.

- HUSKINSON, J.; STEPICK-BIEK, P. N.; ARAUJO, F. G.; THULLIEZ, P.; SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by immunoglobulin G subclasses during acute and chronic infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2031-2038, 1989.
- HUSSAIN, R.; GROGL, M. OTTESEN, E.A. IgG antibody subclasses in human filariasis. Differential subclass recognition of parasite antigens correlates with different clinical manifestations of infection. **Journal of Immunology**, v. 139, p. 2794-2798, 1987.
- INNES, A. E.; BARTLEY, P. M.; BUXTON, D.; KATZER, F. Ovine toxoplasmosis. **Parasitology**, v. 136, p. 1887-1894, 2009.
- JOHNSON, A. M.; ROBERTS, H.; TENTER, A. M. Evaluation of a recombinant antigen ELISA for the diagnosis of acute toxoplasmosis and comparison with traditional antigen ELISAs. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, p. 404-409, 1992.
- JONASSON, P.; LILJEQVIST, S.; NYGREN, P. A.; STAHL S. Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 35, p. 91-105, 2002.
- JUNG, C.; LEE, C. Y.; GRIGG, M. E. The SRS superfamily of Toxoplasma surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 285-296, 2004.
- KASPER, L.; COURRET, N.; DARCHE, S.; LUANGSA, Y. S. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 401-409, 2004.
- KAZEMI, B.; BANDEHPOUR, M.; MAGHEN, L.; SOLGI, G. H. Gene Cloning of 30 kDa *Toxoplasma gondii* tachyzoites surface antigen (SAG1). **Journal of Iranian Parasitology**, v. 2, p. 1-8, 2007.
- KNOLL, L. J.; BOOTHROYD, J. C. Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Molecular Cell Biology**, v.18, p. 807-814, 1998.
- KNOLL, L. J.; BOOTHROYD, J. C. Molecular biology lessons about Toxoplasma development: stage-specific homologs. **Parasitology Today**, v. 14, p. 490-493, 1998.
- KOTRESHA, D.; NOORDIN, R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 118, p. 529-542, 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. *Toxoplasma gondii* toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Molecular and biochemical parasitology*, 2011. *In press*.

- LAU, L. Y.; FONG, M. Y. *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. **Experimental Parasitology**, v. 119, p. 373–378, 2008.
- LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**, v. 96, p. 89–96, 2000.
- LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 1285-1292, 2001.
- LI, C.; JAENTSCHEKE, B.; SONG, Y.; WANG, J.; CYR, T. D.; VAN DOMSELAAR, G.; HE, R.; LI, X. A simple slot blot for the detection of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins using universal antibodies targeting the fusion peptide. **Nature Protocols**, v. 5, p. 14-19, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LU, B.; WU, S.; SHI, Y.; ZHANG, R.; ZOU, L.; GAO, S.; LIN, M.; ZHOU, Y. *Toxoplasma gondii*: expression pattern and detection of infection using full-length recombinant P35 antigen. **Experimental Parasitology**, v. 113, p. 83-90, 2006.
- MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 512-538, 1996.
- MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2237-2244, 1998.
- MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western Blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, p. 384-389, 2000.
- MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 27, p. 283-287, 1980.
- MINEO, J. R.; KHAN, I. A.; KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii*: a monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 351-361, 1994.
- MOMBRO, M.; PERATHONER, C.; LEONE, A.; BUTTAFUOCO, V.; ZOTTI, C.; LIEVRE, M. A.; FABRIS, C. Congenital toxoplasmosis: assessment of risk to newborns in confirmed and uncertain maternal infection. **European Journal of Pediatrics**, v. 162, p. 703-706, 2003.

MONTOYA, J. D.; ROSSO, F. R. Diagnosis and management of toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, v. 32, p.705– 726, 2005.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

NAZAN DALGIÇ. Congenital *Toxoplasma gondii* infection. **Marmara Medical Journal**, v. 21, P. 89-101, 2008.

NIGRO, M.; GUTIERREZ, A.; HOFFER, A. M.; CLEMENTE, M.; KAUFER, F.; CARRAL, L.; MARTIN, V.; GUARNERA, E. A.; ANGEL, S. O. Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, p. 609-613, 2003.

PARMLEY, S. F.; SGARLATO, G. D.; MARK, J.; PRINCE, J. B.; REMINGTON, J. S. Expression, characterization, and serologic reactivity of recombinant surface antigen P22 of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1127-1133, 1992.

PFREPPER, K. I.; ENDERS, G.; GOHL, M.; KRCZAL, D.; HLOBIL, H.; WASSENBERG, D.; SOUTSCHEK, E. Seroreactivity to and Avidity for Recombinant Antigens in Toxoplasmosis. **Clinical and vaccine immunology**, v. 12, p. 977–982, 2005.

PIETKIEWICZ, H.; HISZCZYNSKA-SAWICKA, E.; KUR, J.; PETERSEN, E.; NIELSEN, H. V.; STANKIEWICZ, M.; ANDRZEJEWSKA, I.; MYJAK, P. Usefulness of *Toxoplasma gondii* specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1779-1781, 2004.

PORTER, S. B.; SANDE, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquire Immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 1643-1648, 1992.

PRINCE, J. B.; AUER, K. L.; KUSKINSON, J.; PARMLEY, S. F.; ARAUJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 43, p. 97-106, 1990.

REMYINGTON, J. S. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, v. 184, p. 140–145, 2001.

REMYINGTON, J. S.; THULLIEZ, P.; MONTOYA, J. G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 941-945, 2004.

RORMAN, E.; ZAMIR, C. S.; RILKIS, I.; BEM-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 458–472, 2006.

ROSS, D. S.; DONALD, R. G. K.; MORRISSETTE, N. S.; MOULTON, A. L. Molecular tools for genetic dissection of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Methods Cell Biology**, v. 45, p.27- 63, 1994.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, v. 139, p. 221-227, 1987.

SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. A comparative study of congenital toxoplasmosis between public and private hospitals from Uberlândia, MG, Brazil. **Memórias de Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 7-13, 2004.

SEGUNDO, G. R.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, p. 50-53, 2004.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, p. 504-512, 2006.

SIACHOQUE, H.; GUZMAN, F.; BURGOS, J.; PATARROYO, M. E. *Toxoplasma gondii*: Immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 62-65, 2006.

SIBLEY, L. D. Recent origins among ancient parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 115, p. 185-198, 2003.

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, v. 107, p. 181-195, 2002.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

SUKTHANA, Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 137-142, 2006.

SUZUKI, A. L.; ROCHA, J. A.; ROSSI, L. C. Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. **Journal of medical Microbiology**, v. 50, p. 62-70, 2001.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TOMAVO, S.; SCHWARZ, R. T.; DUBREMETZ, J. F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 4576-4580, 1989.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, p. 4350-4356, 1979.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 558-561, 2005.

WEISS, L. M.; KIM, K. The development and biology of bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 391-405, 2000.

WILSON, M. B.; NAKANE, P. K. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W.; Holubar, K.; Wick, G. (Eds.), **Immunofluorescence and related staining techniques**. Amsterdam: Elsevier North Holland Biomedical Press, pp. 215-224, 1978.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 853-861, 1994.

ZENNER, L.; DARCY, F.; CAPRON, A.; CESBRON-DELAUW, M. F. *Toxoplasma gondii*: kinetics of the dissemination in the host tissues during the acute phase of infection of mice and rats. **Experimental Parasitology**, v. 90, p. 86-94, 1998.



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP  
Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4531

**ANÁLISE FINAL Nº 041/08 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA REFERENTE À REGULAMENTAÇÃO DO BANCO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS NO ÂMBITO DOS LABORATÓRIOS DE IMUNOLOGIA E DE PARASITOLOGIA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.**

**Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Profa. Dra. Julia Maria Costa-Cruz**

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do projeto proposto.

**Situação:** O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito da pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

**SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO.**

Uberlândia, 29 de Fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado  
Coordenadora do CEP/UFU

**Orientações ao pesquisador**

(Para parecer Aprovado ou Aprovado com Recomendações)

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprova (Res. CNS Item III.3.x), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3) que requerem ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial ( Res. 251/97, item III.2.x). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO BIOMÉDICO

Vitória-ES, 31 de março de 2005

- Do: Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico
- Para: Profa. Geisa Baptista Barros  
Pesquisadora Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo Toxoplasma gondii”**

Senhora Pesquisadora,

Através deste informo à V.Sa., que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa intitulado: **“Dinâmica de marcadores sorológicos na infecção aguda recente pelo Toxoplasma gondii”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, em reunião ordinária realizada em 30 de março de 2005.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2, letra “c”.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira  
Coordenador  
Comitê de Ética em Pesquisa  
Centro Biomédico UFES