

IgA Fecal e seus Fragmentos como Ferramenta
Imunoepidemiológica para Estudar a Prevalência da Infecção
Toxoplásmica em Crianças de 0 a 4 anos Expostas a Alto
Risco de Contaminação pelo *Toxoplasma gondii*

Bianca Magnelli Mangiavacchi

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Dezembro 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

IgA Fecal e seus Fragmentos como Ferramenta
Imunoepidemiológica para Estudar a Prevalência da Infecção
Toxoplásmica em Crianças de 0 a 4 anos Expostas a Alto
Risco de Contaminação pelo *Toxoplasma gondii*

Bianca Magnelli Mangiavacchi

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”

Orientadora: Dr.^a Lílian Maria Garcia Bahia de Oliveira

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

Campos dos Goytacazes, RJ

Dezembro 2009

*Devia ter amado mais
Ter chorado mais
Ter visto o sol nascer
Devia ter arriscado mais e até errado mais
Ter feito o que eu queria fazer
Queria ter aceitado as pessoas como elas são
Cada um sabe a alegria e a dor que traz no coração
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar
Devia ter complicado menos, trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr
Devia ter me importado menos com problemas pequenos
Ter morrido de amor
Queria ter aceitado a vida como ela é
A cada um cabe alegrias e a tristeza que vier
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar distraído
O acaso vai me proteger
Enquanto eu andar
Devia ter complicado menos, trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr.
Devia ter complicado menos, trabalhado menos
Ter visto o sol se pôr*

Compositor: Sérgio Britto

*Dedico este trabalho
a minha mãe,
minha avó,
minhas irmãs
e ao meu namorado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está sempre ao meu lado dando força para superar cada etapa importante na minha formação profissional e pessoal.

À minha mãe, Regina Coeli, e minha avó, Dalva, por ter permitido que eu estivesse realizando os meus sonhos mesmo com tantas dificuldades, distâncias, saudades e meu humor inconstante de sempre. AMO MUITO VOCÊS!

Agradeço às minhas irmãs e amigas, Karla e Paula, por fazer os meus dias mais felizes por estarem perto de mim sempre! Amo vocês!

Ao meu namorado, Leonardo, por estar sempre me apoiando e sendo um grande companheiro. AMO-TE!

À minha orientadora, Prof. Dra. Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira, por acreditar no meu potencial, pela chance de aprendizado, pela orientação dedicada em minha formação e possibilidade de crescimento pessoal e profissional durante todos estes anos.

Ao meu Co-orientador, Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont, por ter me recebido com grande carinho e atenção em seu laboratório e ter me orientado no sentido de aprender um pouquinho do imenso mundo da proteômica.

Aos amigos do LBR, aqueles que ainda estão e ou que já partiram para outras universidades, muito obrigada pelos momentos de ajuda e companheirismo durante os experimentos, além dos momentos agradáveis de descontração.

Aos amigos da sala 201, Alba Lucínia, Flávia, Liliani, Marcela, Livia, Fabrício e Ricardo, muito obrigada pela ajuda nos experimentos, pelos momentos de dificuldades e pelos momentos de alegria, risadas e bate-papo. Amo todos vocês!

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química da UFRJ, Fábio, Carlos, Pedro, Danielle, e os visitantes, Thiago, Maria, Aline, muito obrigada por fazer as 3 semanas de experimentos exaustivos serem os mais divertidos. Ronaaaaaaaaaaldos, amo vocês!

As amiginhas Ludmila e Laís que me deram abrigo durante as 3 semanas que estive no Rio de Janeiro realizando os experimentos na UFRJ. Muito obrigada minhas Florzinhas!

Às amigas Scheila, Laura e Eliana por estarem sempre por perto! Amos vocês de coração!

Agradeço ao Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro, a Prof. Dra. Olga Lima Tavares Machado e a Dra. Regina Célia Campos de Sousa Fernandes, que aceitaram prontamente a participar da banca examinadora desta dissertação.

Agradeço a Dra. Alba Lucínia Peixoto Rangel por ter aceitado revisar essa dissertação.

Enfim, a Comunidade do Matadouro, o meu muito obrigado, pois se não fossem vocês este trabalho não seria realizado.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes Instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Pós-Graduação;

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo o financiamento do projeto aprovado no edital Universal em 2007;

Laboratório de Biologia do Reconhecer, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em cujo laboratório esta pesquisa foi realizada;

Laboratório de Química de Proteínas – Unidade de Proteômica do Instituto de Química (UFRJ), onde os experimentos de análise proteômica desta pesquisa foram realizados;

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), onde foi utilizado o aparelho MALDI-TOF-TOF para a identificação das proteínas;

ÍNDICE

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE QUADRO E TABELAS	xix
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Toxoplasmose.....	1
1.1.1. Histórico.....	1
1.1.2. O <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.1.3. Ciclo Biológico.....	5
1.1.4. Transmissão.....	6
1.1. 5. Epidemiologia.....	8
1.1.6. Imunidade contra <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.1.7. Diagnóstico.....	17
1.2. Imunoglobulina A.....	20
1.2.1. Anticorpos IgA contra <i>T. gondii</i> em mucosas.....	23
1.3. Toxoplasmose em crianças.....	25
1.3.1. Estudos sobre a Toxoplasmose congênita e neonatal.....	29
1.4. Estudo de proteínas na infecção pelo <i>Toxoplasma gondii</i> – Proteômica.....	31
II. JUSTIFICATIVA	34
III. OBJETIVOS	37
3.1. Objetivo geral.....	37
3.2. Objetivos específicos.....	37
IV. POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL e MÉTODOS	39
4.1. Indivíduos sujeitos da pesquisa.....	39
4.2. Amostras de fezes.....	40

4.2.1. Extração de Imunoglobulinas de extratos fecais.....	41
4.2.2. Classificação das amostras de fezes nos grupos G1 e G2.....	41
4.3. Detecção de anticorpos IgA anti- <i>T. gondii</i> com utilização do kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur).....	42
4.4. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).....	43
4.5. Purificação de IgA anti- <i>T. gondii</i> por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina.....	43
4.6. Análise Proteômica.....	44
4.6.1. Avaliação das proteínas das amostras de fezes por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	45
4.6.2. Precipitação de proteínas com etanol/acetona.....	46
4.6.3. Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA)	46
4.6.4. Eletroforese bidimensional, Revelação e Obtenção de imagem.....	47
4.6.5. Seleção e Processamento dos <i>spots</i> para espectrometria de massas.....	48
4.6.6. Espectrometria de massas (SHEVCHENKO <i>et al.</i> , 1996).....	49
4.6.7. Análise dos resultados.....	49
V. RESULTADOS	52
5.1. Avaliação de IgA anti- <i>T. gondii</i> em amostras de fezes com a utilização do kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur).....	52
5.2. Avaliação das amostras de fezes por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-SDS.....	54
5.3. Avaliação das amostras dos grupos G1 e G2 por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-SDS.....	57
5.4. Purificação de IgAs por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina.....	59
5.5. Eletroforese unidimensional do material não adsorvido e purificado (IgA) do grupo G2 através da coluna de jacalina.....	60
5.6. Análise Proteômica.....	62
5.6.1. Determinação das regiões nos géis unidimensionais para o seqüenciamento de proteínas por espectrometria de massas.....	62
5.6.2. Identificação de proteínas da amostra do grupo G2, extraídos do gel unidimensional, por espectrometria de massas.....	65

5.6.3. Precipitação de proteínas com etanol/acetona das amostras dos grupos G1 e G2, Eletroforese bidimensional, Revelação e Análise da imagem.....	67
5.6.4. Precipitação de proteínas com ácido tricloroacético (TCA) das amostras dos grupos G1, Eletroforese bidimensional, Revelação e Análise da imagem.....	72
5.6.5. Seleção e processamento dos spots para Espectrometria de massas.....	74
5.6.6. Identificação de proteínas da amostras dos grupos G1 e G2 por Espectrometria de massas MALDI TOF-TOF.....	78

VI. DISCUSSÃO	83
----------------------	-----------

VII. CONCLUSÃO	95
-----------------------	-----------

VII. REFERÊNCIAS	97
-------------------------	-----------

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Termo de Estocagem

RESUMO

Nesse trabalho investigamos condições metodológicas para a identificação de IgA fecal de crianças expostas à ambientes de alto risco de infecção pelo *T. gondii* no município de Campos dos Goytacazes (RJ). Utilizamos 2 grupos de amostras, G1 e G2, que foram separados conforme a especificidade de imunoglobulinas IgA contra o parasita por meio de ELISA utilizando o Kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur) e o perfil eletroforético das proteínas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Na tentativa de purificação da IgA presente nas amostras de fezes, utilizamos a cromatografia de afinidade em coluna de jacalina, onde obtivemos a identificação apenas de fragmentos da cadeia de imunoglobulinas através da espectrometria de massas. A análise de proteínas presentes nos grupos G1 e G2 pela eletroforese bidimensional favoreceu a identificação de fragmentos de imunoglobulinas, tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada, enzimas e proteínas ligadoras de anticorpos que podem estar relacionadas com a situação de infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii* em nível de mucosa.

Palavras-chave: *Toxoplasma gondii*, IgA , crianças.

ABSTRACT

In this paper we investigate methodological requirements for the identification of fecal IgA of children exposed to environments high risk of infection by *T. gondii* in Campos dos Goytacazes (RJ). We used 2 groups of samples, G1 and G2, which were separated according to the specific immunoglobulin IgA against the parasite by using the ELISA Kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur) and electrophoretic profile of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gel containing SDS (SDS-PAGE). In an attempt to purify the present IgA in fecal samples, we used affinity chromatography on jacalin column, where we have had only the identification of fragments of light chain immunoglobulins by mass spectrometry. The analysis of proteins present in G1 and G2 favored by two-dimensional electrophoresis to identify fragments of immunoglobulins of both light chain and heavy chain, enzymes and protein-binding antibodies that may be related to the situation of infection mucosal by the parasite *Toxoplasma gondii*.

Key words: *Toxoplasma gondii*, IgA, children.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Antigen-presenting cell – célula apresentadora de antígenos
BALTS	bronchus-associated lymphoid tissues – tecido linfóide associado aos brônquios
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DC	Célula dendrítica
Fc	Constant fraction – porção constante da imunoglobulina
FcγBP	IgG Fc binding protein
GALTS	Gut-associated lymphoid tissues – tecido linfóide associado a mucosa
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
IEF	Isoelectric focusing – focalização isoeétrica
IEL	Intraepithelial lymphocyte – linfócitos intraepiteliais
IgA	Imunoglobulina A
IgA1	Imunoglobulina A do tipo 1
IgA2	Imunoglobulina A do tipo 2
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
INF-γ	Intreferon gama
IPG	Immobilized pH gradient – gradiente de pH imobilizado
MF	Amostra de fezes
NCBI	National Center of Biotechnology information
NO	Óxido nítrico
NK	Células natural killer – células matadoras naturais
NKT	Células T natural killer – células T matadoras naturais
DO	Densidade óptica

PMN	Polimorfonucleares
pIgR	Polymeric Imunoglobulin Receptor – Receptor polimérico de imunoglobulina
P30	Antígeno 30 da Superfície do Taquizoíta do <i>T. gondii</i>
RH	Cepa virulenta do <i>Toxoplasma gondii</i> isolada de uma criança em 1941 por Sabin
SC	Porção secretora da imunoglobulina A
SIgA	IgA secretória
TCD8⁺	Linfócitos T CD8 ⁺
TCD4⁺	Linfócitos T CD4 ⁺
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral – Alfa
TGF-β	Fator de Crescimento Tumoral – Beta
Th1	Resposta de Células T Helper do Tipo I
Th2	Resposta de Células T Helper do Tipo II
κ	Kappa
λ	Lambda

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Principais vias de contaminação pelo <i>Toxoplasma gondii</i>	7
Figura 2: Eventos intracelulares e extracelulares na superfície de mucosa que promovem a eliminação do <i>Toxoplasma gondii</i> (extraído e modificado de Buzoni-Gatel <i>et al.</i> , 2006) Legenda: NO (óxido nítrico); IEL (linfócito interepitelial); IL-15 (interleucina 15); NK (célula Natural Killer); NKT (célula T Natural Killer); INF- γ (Interferon gama); PMN (célula polimorfonuclear); IL-12 (interleucina 12); M ϕ (Macrófago); TGF- β (Fator de crescimento beta); IL-10 (Interleucina 10); DC (célula dendrítica).....	14
Figura 3: Estrutura da imunoglobulina A na forma monomérica e em sua forma dimérica, destacando os dois peptídeos: a cadeia-J (em laranja claro) e a porção secretora (em verde).....	21
Figura 4: Representação de seqüência metodológica do estudo proteômico. [Adaptado de Pandey e Mann, 2000].....	45
Figura 5: Fracionamento de proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras de fezes. <u>No gel 1:</u> Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, amostra de fezes (MF0071, MF0081, MF0082, MF0101, MF0111*, MF0111 ⁺ , MF0112*, MF0112 ⁺); <u>No gel 2:</u> Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, Amostras de fezes (MF0121, MF0141, MF0151, MF0161, MF0162, MF0163, MF0171). <u>Caixa destaque:</u> Amostras MF0111*, MF0111 ⁺ , MF0112*, MF0112 ⁺	56
Figura 6: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras do grupo G1 e G2. <u>No gel:</u> Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, amostra do grupo G1, amostra do grupo G2. <u>Setas:</u> bandas de 50 e 25 KDa, respectivamente.....	58
Figura 7: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes no material não adsorvido a coluna de jacalina. <u>No gel:</u> Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 10ul da amostra não adsorvida a coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS. <u>Seta:</u> banda de 25 KDa.....	61

Figura 8: Separação das proteínas por SDS-PAGE presentes no material eluído da coluna de jacalina. <u>No gel</u> : Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 8ul da amostra eluída da coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS, 16ul da amostra eluída da coluna em tampão de amostra redutor-SDS. <u>Seta</u> : bandas de 50 e 65 KDa.....	62
Figura 9: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras do grupo G2. <u>No gel 1</u> : Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 20ul da amostra do grupo G2 diluída em tampão de amostra redutor-SDS; <u>No gel 2</u> : Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, amostra G2 não adsorvida a coluna de jacalina diluída em tampão de amostra redutor-SDS; <u>No gel 3</u> : Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 8ul da amostra eluída da coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS, 16ul da amostra eluída da coluna em tampão de amostra redutor-SDS. Os <i>spots</i> analisados por espectrometria de massa estão numerados.....	64
Figura 10: Separação das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras de fezes. <u>No gel</u> (da esquerda para direita): Padrão de peso molecular PROMEGA; 20ug da amostra de fezes G1; 20ug da amostra de fezes G2. <u>Setas</u> : bandas mais intensas identificadas entre os grupos.....	68
Figura 11: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.....	70
Figura 12: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G2 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.....	71
Figura 13: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo 1 precipitada com TCA/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.....	73

Figura 14: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G2 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os *spots* analisados por espectrometria de massa estão numerados..... 75

Figura 15: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os *spots* analisados por espectrometria de massa estão numerados..... 76

Figura 16: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com TCA. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50ug; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os *spots* analisados por espectrometria de massa estão numerados..... 77

ÍNDICE DE TABELAS e GRÁFICOS

	pág.
Tabela 1: Sistema de codificação de amostras do binômio mãe-filho para extração de IgA.....	40
Tabela 2: Interpretação dos resultados do Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur).....	42
Tabela 3: Reatividade de anticorpos IgA anti- <i>T gondii</i> pelo kit Platelia™ Toxo IgA TMB em amostras de fezes processadas para a extração de imunoglobulinas.....	53
Tabela 4: Lista das proteínas das regiões escolhidas para o seqüenciamento identificadas por MS/MS.....	66
Tabela 5: Identificação das proteínas por MS/MS dos <i>spots</i> selecionados no gel do grupo 2 precipitado com etanol/acetona.....	79
Gráfico 1: Absorbância das frações eluídas da coluna de jacalina.....	60
Gráfico 2: Valores em porcentagem das proteínas identificadas da amostra do grupo 2 pelo bando de dados do MASCOT.....	81

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A Toxoplasmose, zoonose causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*, é amplamente distribuída em humanos e animais homeotérmicos. Este parasita é prevalente em diversas regiões do planeta sendo de grande importância veterinária e médica, por causar aborto ou doença congênita em seus hospedeiros intermediários (TENTER *et al.*, 2000).

Em geral, a infecção é assintomática, no entanto, pode ocorrer no adulto quadro agudo febril com linfadenopatia, e em crianças a forma subaguda, com encefalomielite e retinocoroidites (REMINGTON *et al.*, 2001). Neste último grupo faz-se importante distinguir entre a doença congênita ou neonatal e a infecção pós-natal. Os sintomas usuais da infecção congênita são a retinocoroidite em 90% dos casos, seguida de calcificações cerebrais (69%), perturbações neurológicas (60%) e microcefalia (50%). A maioria dos casos de Toxoplasmose adquiridos na infância ou na idade adulta é assintomática, sem exibição de quadro definido. Os sintomas mais freqüentes são formas subclínicas diagnosticados somente com exames clínicos de rotina, formas com adenopatia sem febre e formas febris com adenopatia às vezes acompanhados de sintomas como mialgias, cefaléia e anorexia.

No universo das retinocoroidites toxoplásmicas a infecção adquirida após o nascimento tem maior impacto do que a infecção congênita pelo fato de ser a forma mais comum de se adquirir a doença (SIBLEY & BOOTHROYD, 1992), apesar de raramente ocorrerem formas fatais (REMINGTON *et al.*, 2001).

1.1 A Toxoplasmose

1.1.1 Histórico

A Toxoplasmose é uma doença parasitária descrita independentemente por Splendore no Brasil, em coelhos, e por Nicolle e Manceaux, na Tunísia (NICOLLE &

MANCEAUX, 2009; SPLENDORE, 2009a, 2009ab). Em julho de 1908, Alfonso Splendore descreveu um parasita que havia causado a morte por paralisia em um coelho e o denominou *Toxoplasma cuniculli* (SPLENDORE, 2009a). Charles Nicolle e Louis Manceaux, em outubro de 1908, observaram o parasita em células mononucleares do baço e fígado de um roedor norte-africano, o gundi (*Ctenodactylus gundi*). Primeiramente, tentaram denominá-lo *Leishmania gondii* pela semelhança do novo parasita com os protozoários do gênero *Leishmania* (NICOLLE & MANCEAUX, 2009). No entanto, no ano seguinte, decidiram com base em critérios morfológicos que o parasita não se tratava de um organismo do gênero *Leishmania*. Propôs-se, então, o nome *Toxoplasma* e renomeou-se o parasita encontrado como *Toxoplasma gondii* (NICOLLE & MANCEAUX, 2009), devido a identificação nominal incorreta, por Nicolle & Manceaux, do hospedeiro que por ele foi denominado *Ctenodactylus gondii* (DUBEY, 2008). Portanto, cabe a Splendore e também a Nicolle e Manceaux a descoberta e os primeiros registros científicos do *Toxoplasma gondii*.

O primeiro caso em seres humanos foi relatado em 1923, pelo oftalmologista Janku. Este registrou o primeiro caso de Toxoplasmose ocular em uma criança de 11 meses de idade que apresentava um quadro de hidrocefalia congênita (JANKU, 1923 *apud* REMINGTON *et al.*, 2001). Entretanto, a Toxoplasmose como doença em humanos só passou a ter impacto na medicina em 1937 com os trabalhos de Wolf e Cowen nos Estados Unidos (WOLF & COWEN, 1937) que descreveram um caso fatal de encefalite granulomatosa, causada pelo *T. gondii*, em uma criança de 3 dias de vida. De 1937 a 1942, Wolf, Cowen e colaboradores contribuíram para que a Toxoplasmose fosse reconhecida como doença importante em humanos ao publicarem uma série de trabalhos relativos ao reconhecimento e reclassificação do parasita de outros casos já publicados. Com estes trabalhos ficou estabelecido que a Toxoplasmose é também uma doença transmitida congenitamente, pois apesar das mães serem assintomáticas, estas apresentavam anticorpos IgG anti-*T.gondii* indicando a transmissão congênita (FERGUSON, 2009).

A forma adquirida da Toxoplasmose foi inicialmente descrita por Pinkerton e Weinman (PINKERTON & WEINMAN, 1940), em um adulto jovem com doença generalizada. Os primeiros estudos epidemiológicos da Toxoplasmose somente

puderam ser realizados após 1948, posteriormente à publicação de Sabin e Feldman (SABIN & FELDMAN, 1948) sobre a metodologia do “dye test”. A partir de então foi possível demonstrar que a Toxoplasmose é uma infecção comum ao homem em todo o mundo. Apesar da caracterização da doença no homem e nos animais, as principais vias de contaminação ainda continuaram desconhecidas até metade da década de 1960.

Embora a via congênita e a alimentar (carnivorismo) fossem importantes na transmissão do *Toxoplasma gondii*, não se podia explicar a infecção em indivíduos estritamente vegetarianos e animais herbívoros (DUBEY, 2008). Esse fato pôde ser esclarecido quando o ciclo de vida do *T. gondii* foi elucidado após descobrir-se que fezes de gato podiam conter uma forma resistente do protozoário, que causava infecção quando ingerido por hospedeiros intermediários (HUTCHISON, 1965), justificando assim a infecção em indivíduos vegetarianos (FERGUSON, 2009).

No entanto, somente na década de 70 (FRENKEL & DUBEY, 1970) o ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* foi desvendado com a descoberta da fase sexual do parasita no intestino delgado do gato. Esta descoberta foi fundamental para que se pudesse avançar em pesquisas epidemiológicas sobre o modo de transmissão da infecção ao homem.

1.1.2. O *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* infecta diversos tipos celulares de animais homeotérmicos. É pertencente ao Reino Protozoa, Filo Apicomplexa, Classe Sporozoea, Ordem Eucoccidiida, Família Sarcocystiidae e ao Gênero Toxoplasma. O nome Toxoplasma é derivado de sua forma em lua crescente (táxon = arco, plasma = forma, grego), mede de 4-8 mm de comprimento por 2-4 mm de largura. Este filo é caracterizado pela presença de um complexo apical composto de organelas secretoras especializadas, abrigando patógenos de importância médica e veterinária como o *Plasmodium* spp (agente causador da malária) e o *Cryptosporidium* spp (agente causador de diarreias graves). A capacidade de coexistir benignamente com o hospedeiro o torna um parasita altamente bem

sucedido e também um modelo muito adequado e utilizado para estudo do parasitismo intracelular (DUBEY *et al.*, 1998).

O *T. gondii*, por ser um parasita intracelular obrigatório, invade os mais diversos tipos de células nucleadas. A interação do parasita com a célula hospedeira acontece mediante dois processos principais: a adesão e a invasão, sendo auxiliada pela secreção das róptrias, micronemas e grânulos densos, e pelo movimento do conóide. A baixa restrição por células hospedeiras indica que os ligantes e receptores que medeiam à adesão do parasita às células são, provavelmente, altamente conservados e igualmente distribuídos (TOMAVO, 1996). Robinson (ROBINSON *et al.*, 2004) mostrou que a P30 (SAG-1), uma proteína majoritária na superfície do *T. gondii*, se liga à superfície celular do hospedeiro através de glicosamina presente nestas células, sendo esta adesão importante no processo de invasão do parasita. O *T. gondii* apresenta três estágios infecciosos: taquizoítos (clones), bradizoítos (cistos teciduais) e esporozoítos (oocistos).

O termo “taquizoíto” foi atribuído por Frenkel para descrever a forma de proliferação rápida em células do hospedeiro intermediário e em células não intestinais do hospedeiro definitivo (FRENKEL, 1973). Eles podem se dividir rapidamente nas células hospedeiras e são responsáveis pela manifestação clínica da infecção (KIM & WEISS, 2008).

O termo “bradizoíto” foi também determinado por Frenkel e define os parasitas que se multiplicam vagarosamente no interior de cistos contidos nos tecidos hospedeiros (FRENKEL, 1973). Esses cistos variam de tamanho e, quando jovens, podem apresentar menos de cinco milímetros de diâmetro e somente dois bradizoítos, enquanto os mais velhos podem conter centenas de organismos. Os cistos teciduais presentes no cérebro são geralmente esferoidais e raramente ultrapassam setenta milímetros de diâmetro. Já cistos intramusculares são alongados e podem ter cem milímetros de comprimento (DUBEY *et al.*, 1993). Além disso, os cistos podem se desenvolver em órgãos viscerais que incluem fígado, pulmão e rins (DUBEY & BEATTIE, 1988), porém possuem preferências por tecidos musculares e neurais bem como ocular. Em muitos casos de reativação da doença ocorrem encefalites ou retinocoroidites.

Tanto taquizoítos como bradizoítos se multiplicam assexuadamente por endodigênica, uma forma especializada de reprodução onde um único parasita origina dois. O bradizoíto se difere estruturalmente do taquizoíto por apresentar seu núcleo na extremidade posterior do parasita.

O oocisto é o zigoto, resultante do processo de reprodução sexuada no epitélio intestinal do gato onde ocorre a fusão do gameta masculino, microgameta, com o gameta feminino, macrogameta, formando uma estrutura envolta por dupla membrana, que contém em seu interior dois esporocistos, cada um contendo quatro esporozoítos. Os esporocistos liberados esporulam no ambiente dentro de cinco dias, dependendo do grau de aeração e temperatura, originando oito esporozoítos. O oocisto não esporulado mede de dez a doze milímetros de diâmetro enquanto o esporulado mede de onze a treze milímetros de diâmetro (DUBEY *et al.*, 1998).

1.1.3. Ciclo biológico

O *Toxoplasma gondii* apresenta um ciclo heteroxeno, pois possui como hospedeiros intermediários animais homeotérmicos nos quais apenas a fase assexuada do ciclo de vida se completa, e hospedeiros definitivos (gato e outros felídeos), onde parasita completa seu ciclo de vida, que inclui a fase assexuada (extraintestinal) e a fase sexuada (enteroepitelial).

A fase sexuada tem início quando o felídeo ingere uma das formas infectivas do parasita. Ao atingir o intestino desse felídeo o parasita penetra nas células epiteliais onde se tornam arredondados e começam a se multiplicar assexuadamente por esquizogonia. Ao final do processo de esquizogonia, os merozoítos formados rompem as células hospedeiras e infectam novas células, perpetuando a infecção. Alguns merozoítos, no entanto, se diferenciam em gametas femininos (macrogametas) ou masculinos (microgametas), os quais se fundem e dão origem ao zigoto. O zigoto, por sua vez, evolui para oocistos, os quais são eliminados junto com as fezes. Quando no ambiente, estes oocistos esporulam formando em seu interior dois esporocistos, cada um com quatro esporozoítos. Este

ciclo ocorre em felinos e corresponde a reprodução sexuada (FRENKEL *et al.*, 1970).

A fase assexuada (extraintestinal) é comum aos hospedeiros intermediários e definitivos. Esta fase começa quando o hospedeiro ingere alimentos ou água contaminados com oocistos maduros, entra em contato com taquizoítos eliminados na urina, leite, esperma (NGUYEN *et al.*, 1996; POWELL *et al.*, 2001; DUBEY & SHARMA, 1980) ou quando ingere cistos presentes em carnes cruas ou mal cozidas. As formas infectivas do parasita penetram em várias células teciduais e se multiplicam dentro do vacúolo parasitóforo, por endodiogenia, formando pseudocistos. Estes, ao atingirem certas dimensões, rompem-se liberando os taquizoítos que infectam outras células adjacentes ou distantes, através da via linfática ou sanguínea. Com o desenvolvimento da imunidade específica, em hospedeiros imunocompetentes, os toxoplasmas se encistam e se reproduzem também por endodiogenia, porém muito lentamente, formando grandes aglomerados parasitários. Os cistos formados podem ser arredondados ou alongados, contendo em seu interior centenas de formas parasitárias de lenta multiplicação, os bradizoítos.

1.1.4 Transmissão

Levando-se em conta o ciclo evolutivo do parasita, o homem adquire a infecção principalmente por três vias (Figura 1):

(1) Ingestão de oocistos, distribuídos no ambiente pela chuva, vento e água; alimentos colhidos no solo; areia em torno das casas, jardins, campos; reservatório de água e a partir de quaisquer locais onde os gatos defecam (BENENSON *et al.*, 1982; BOWIE *et al.*, 1997; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003), podendo ainda disseminar-se através de hospedeiros transportadores de oocistos, tais como moscas, baratas e minhocas (SMITH & FRENKEL, 1978; DUBEY, 1998; BUXTON, 1990). Os oocistos esporulados podem permanecer infectantes em solo úmido e sombreado por períodos de 12 a 18 meses (KAWAZOE, 1995; FRENKEL, 2000).

(2) Ingestão de cistos teciduais através de carne crua ou mal cozida, especialmente de aves ou mamíferos. Os cistos sobrevivem por semanas quando refrigerados entre 1- 4°C (DUBEY, 1998a) por um período de até uma semana se congelados a temperatura entre -1 a -8°C (KOTULA, 1991). A maioria dos cistos teciduais é morta a -12°C (DUBEY, 1998a). O aquecimento acima de 60°C por tempo de 4 min seguramente mata os cistos teciduais (DUBEY, 1998a);

(3) Infecção transplacentária, que ocorre em decorrência da passagem da infecção por *T. gondii* da mãe para o feto. Cerca de 40% dos fetos são infectados por essa via em mulheres que adquirem a infecção toxoplásmica durante a gravidez (DESMONT *et. al.*, 1985).

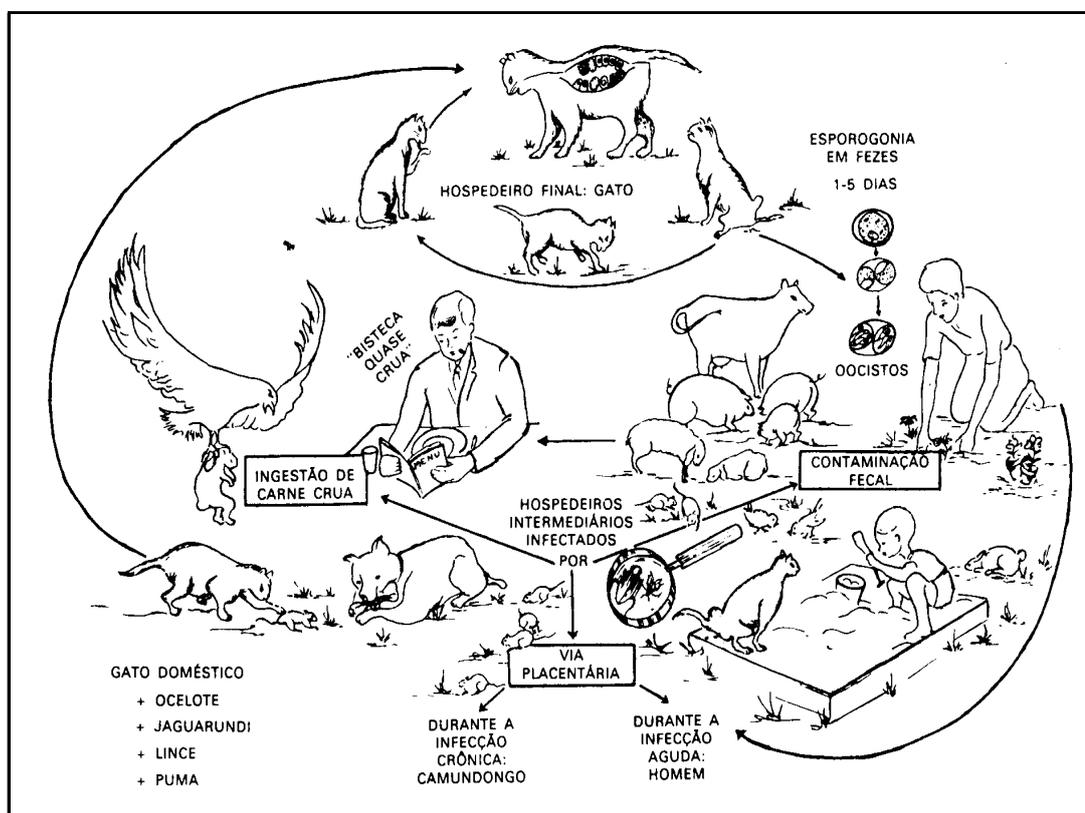


Figura 1: Principais vias de contaminação pelo *Toxoplasma gondii*.

Há ainda outras formas de infecção por este parasita, tais como através de transfusão de sangue e células, transplante de órgãos e acidentes em laboratórios devido à manipulação de animais infectados ou material contaminado (ORÉFICE & BAHIA-OLIVEIRA, 2005).

1.1.5. Epidemiologia

A Toxoplasmose possui ampla distribuição mundial, porém sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (PETERSEN, 2007). Por isso, são evidentes os diferentes enfoques que esta doença recebe em diversos países, por ser uma enfermidade relacionada a diversos fatores, desde higiene, fatores ambientais, falta de infra-estrutura sanitária, passando por questões culturais além da convivência entre hospedeiros intermediários e hospedeiros definitivos (CHATTERTON, 1992).

Hábitos culturais relativos à alimentação e higiene provavelmente representam a causa principal das diferenças entre a frequência de infecção de *T. gondii* de um país para outro e mesmo de uma região para outra no mesmo país, e de um grupo étnico para outro na mesma região (TENTER, 2009). A forma taquizoíta apresenta maior papel na transmissão vertical do *Toxoplasma gondii* e são extremamente sensíveis as condições do ambiente e morrem rapidamente uma vez fora do hospedeiro. Sendo assim, a transmissão do *Toxoplasma gondii* pela forma taquizoíta não é tão importante epidemiologicamente, porém ocorre frequentemente (TENTER, 2009). Em geral, a maioria das transmissões de animais para humanos ocorre pela ingestão de cistos presentes em carnes infectadas, produtos de origem animal e vísceras ou pela ingestão de alimentos ou água contaminados por oocistos esporulados provenientes do ambiente ou diretamente das fezes de felinos contaminados (TENTER, 2009).

Tem sido observada diminuição na prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nos Estados Unidos e na Europa durante as últimas três décadas. Esta diminuição está acontecendo mais em países que anteriormente tinham alta prevalência de Toxoplasmose e passaram a efetivar ações preventivas. Na maioria daqueles

países, a ingestão de carnes curadas ou mal cozidas se configurava como o principal fator de risco da infecção toxoplásmica. Portanto parece lógico relacionar esta diminuição da infecção em humanos com a diminuição da presença de *T. gondii* em animais cuja carne é utilizada para alimentação. Isso decorre da aplicação de métodos de melhoramento na criação dos animais e do processo de conservação e preparo da carne (REMINGTON *et al.*, 2001). Estes fatos comprovam que o hábito alimentar de consumo de carnes e produtos de origem animal, crus ou mal cozidos tem grande importância na epidemiologia da Toxoplasmose.

No âmbito mundial, a prevalência da Toxoplasmose costuma estar compreendida entre 20% e 50% ou mais. No Brasil, a prevalência da doença situa-se entre 50% e 80% (GUIMARÃES *et al.*, 1993).

O primeiro relato de surto de Toxoplasmose no Brasil foi feito por Magaldi e colaboradores (MAGALDI *et al.*, 1967), onde de 81 indivíduos que viviam em um seminário em Bragança Paulista, São Paulo, 30 apresentaram a doença. Em virtude do pouco conhecimento sobre a sua epidemiologia naquela época, os autores chegaram ao fim da investigação sem comprovações e conclusões a respeito das fontes de infecção ou das vias de transmissão.

A transmissão dos oocistos via água, tem sido evidenciada em trabalhos baseados em surtos epidêmicos. O primeiro relato de surto de Toxoplasmose relacionado com a ingestão de água, provavelmente contaminada com oocistos, ocorreu no Panamá em 1979 com tropas Britânicas (BENENSON *et al.*, 1982). Outro surto ocorreu na Columbia Britânica no Canadá em 1995, onde 110 casos de Toxoplasmose aguda foram identificados (BOWIE *et al.* 1997).

Em 2001 foi possível demonstrar pela primeira vez no mundo a presença do parasita na água suspeita de ser o veículo de contaminação em um surto. Em estudo realizado entre 2001 e 2002 no município de Santa Isabel do Ivaí no Paraná foram confirmados quase 300 casos de Toxoplasmose aguda. A análise de amostras de água, provenientes de reservatórios que abastecem a cidade, confirmou que este surto de Toxoplasmose estava associado com a ingestão de água contaminada ou ingestão de sorvete preparada com água contaminada por oocistos. A investigação concluiu que a fonte de contaminação foi um dos

reservatórios de água da cidade contaminado por fezes de gato contendo oocistos de *T. gondii*. (DE MOURA *et al.*, 2006).

No Município de Campos dos Goytacazes mostrou-se que em determinadas áreas esta pode ser uma importante forma de transmissão da doença (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Este estudo epidemiológico apontou altas prevalências em boa parte da população, principalmente nos indivíduos de baixa renda e que vivem sob condições de vida precárias (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003). A Toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é prevalente em 84% da população de baixa renda enquanto que nas populações de médio/baixo e médio/alto poder aquisitivo a prevalência é de 62% e 23% respectivamente (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003). Os principais fatores de risco para a infecção na população de baixa renda bem como para a de médio/baixo poder aquisitivo foram: a ingestão de água não filtrada assim como também água de poço ou ainda de rios ou lagoas. As curvas de prevalências mostram que na população de baixa, bem como de media/baixa renda na faixa de 0 a 9 anos o percentual de positividade está em torno de 60%.

A infecção toxoplásmica responde como a principal causa de uveítes posteriores no Brasil (ORÉFICE & BAHIA-OLIVEIRA, 2005). As retinocoroidites ocorrem em cerca de 10% da população soropositiva para Toxoplasmose. No entanto, na faixa etária de 0 a 9 anos no estudo acima mencionado, poucos indivíduos foram avaliados bem como o impacto da doença ocular nesta faixa etária necessita ser investigado em maiores detalhes.

1.1.6. Imunidade contra o *Toxoplasma gondii*

Fatores como tamanho do inóculo, a virulência, o *background* genético, sexo, e estado imunológico parecem afetar diretamente o curso inicial da infecção toxoplásmica em humanos (MONTROYA & LIESENFELD, 2004).

A Toxoplasmose em humanos é adquirida principalmente por ingestão oral de cistos teciduais presentes em carnes contaminadas e/ou oocistos provenientes de solo ou água contaminados (KASPER *et al.*, 2004). Uma vez ingerido, a parede do cisto/oocisto do *T. gondii* é digerida no intestino delgado, e então os parasitas

infectam as células epiteliais, e se disseminam pelo hospedeiro, em particular, para o músculo e sistema nervoso central (KASPER *et al.*, 2004). Esse processo é pouco entendido, mas trabalhos recentes sugerem que células dendríticas CD11c+ podem agir como “Trojan Horses” e disseminar a infecção (COURRET *et al.*, 2006, LAMBERT *et al.*, 2006).

O epitélio intestinal apresenta-se como uma barreira fisiológica e imunológica na detenção de microorganismos e substâncias estranhas. Quando o *T. gondii* invade a mucosa intestinal, ele se depara com uma barreira fisiológica formada por um conjunto de células denominadas enterócitos. O *T. gondii* tem desenvolvido muitas estratégias para não somente se ligar a estas células como também para invadir e se disseminar pelo epitélio (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006). Os enterócitos por sua vez, respondem à infecção com a secreção de citocinas e quimiocinas (IL-1 e IL-6, GM-CSF). Estas moléculas são cruciais para o processo inflamatório da mucosa por aumentar a atração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs), macrófagos e células dendríticas para o sítio de infecção e por auxiliar no processo de remoção do parasita (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006).

O *T. gondii* estimula, primeiramente, a imunidade inespecífica que confere ao hospedeiro certa resistência a outros agentes patogênicos, como vírus, parasitas intestinais e determinados tumores. A imunidade inespecífica é desenvolvida principalmente por macrófagos e células Natural Killer (células NK). Esta resposta é estimulada antes da expansão e ativação de células T, ou seja, da imunidade específica.

Os leucócitos polimorfonucleares (PMN), conhecidos como os primeiros tipos celulares a alcançarem um sítio de infecção, exercem sua atividade antimicrobiana através da fagocitose e inativação de patógenos usando seus mecanismos de citotoxicidade. O tráfico dessas células é dependente da expressão de receptores de quimiocinas (CXCR2 ou CXCR1). Determinados estudos mostram que modelos murinos com depleção de PMNs apresentam baixa função antimicrobiana (BLISS *et al.*, 2001). Além disso, as PMNs produzem IL-12 e TNF- α bem como quimiocinas quando estimuladas por antígenos de *T. gondii* que induzem o recrutamento e ativação de macrófagos e células dendríticas (DENKERS *et al.*, 2004).

A infecção de células dendríticas ou macrófagos da lâmina própria pelo *T. gondii* induz uma série de eventos da resposta imune inata (Figura 2) que leva ao processo de remoção do parasita (BUZONI-GATEL *et al.*, 2006) visto que, uma vez estimuladas estas células podem ser diretamente microbidas e produtoras de citocinas como IL-12 e TNF- α (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006). Estas citocinas agem em conjunto induzindo as células NK a secretarem IFN- γ , que por sua vez intensifica a ativação de macrófagos infectados e ativam macrófagos não-infectados, estimulando o seu metabolismo oxidativo. Acredita-se que a ativação primária destas células seja de grande importância para o controle da rápida proliferação dos taquizoítos, visto que estas apresentam um mecanismo de defesa ao parasita independente de células T, precedendo assim a ativação da imunidade específica (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004).

Para iniciar a resposta imune específica, a apresentação de antígenos é requerida. Os enterócitos podem trabalhar como células apresentadoras de antígenos (APCs) e promover a ativação dos linfócitos. No entanto, células dendríticas e macrófagos que infiltram o epitélio infectado também possuem o papel de células apresentadoras de antígenos para ativação de células T CD4+. As citocinas produzidas por enterócitos infectados e também por células dendríticas estimulam a ativação de células T, bem como de células T NK (NKT) e NK a secretarem IFN- γ . Isto promove a liberação do *T. gondii* (BUZONI-GATEL & WERTS, 2006).

Em camundongos, após a infecção com *T. gondii*, a população de células NK passa a expressar CD44. Tanto IL-12 como IL-15 promovem a regulação e ativação de CD44, aumentando a capacidade de produção de IFN- γ por estas células (SAGUE *et al.*, 2004). Em estudo recente foi confirmado o papel importante das células NK na indução da imunidade por células T CD8+ (COMBE *et al.*, 2005).

As células T Natural Killer (NKT) representam uma pequena classe de linfócitos T que compartilha a estrutura do receptor com células T convencionais e células NK. Foi mostrado que camundongos deficientes em células NKT são mais resistentes que camundongos C57BL/6 no desenvolvimento de ileíte, resultante da infecção pelo *T. gondii* (RONET *et al.*, 2005). Este efeito protetor é caracterizado por

uma mudança na produção de citocinas pelas células NKT em direção ao perfil Th2 e correlacionando com um aumento de linfócitos FoxP3.

Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são peças importantes no jogo da resistência contra o *T. gondii* desenvolvida pelo hospedeiro. A resistência está fortemente relacionada com a resposta Th1, promovida por IFN- γ e IL-12 produzidas pelas células da resposta imune inata. A ação combinada dessas citocinas e outros mecanismos imunológicos protegem o hospedeiro contra a rápida proliferação de taquizoítos e subseqüentes alterações patológicas (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Além disso, o controle da infecção toxoplásmica resulta também da sinergia entre os linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ (GAZZINELLI *et al.*, 1991).

Células T CD8⁺ tanto de camundongos como de humanos secretam IFN- γ e exibem *in vitro* citotoxicidade dirigida às células infectadas (DENKERS *et al.*, 1996). Células Th1 CD4⁺ produzem IFN- γ e IL-2, sendo IL-2, responsável pela ativação de células NK e células T as quais são citotóxicas para as células-alvo infectadas com o *T. gondii*. Células Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10 que estão associadas à baixa regulação da resposta imune mediada por célula. Posteriormente, estes subgrupos de células T são capazes de regular cruzadamente as atividades uma das outras. Por exemplo, IL-10 inibe a produção de IFN- γ , e este inibe a proliferação de células Th2 (KASPER *et al.*, 2004).

Portanto, uma grande variedade de citocinas é produzida em consequência da resposta imune do hospedeiro contra o *T. gondii*. Estas citocinas podem atuar no curso da infecção controlando tanto o crescimento dos parasitas, quanto a magnitude da resposta imune contra o mesmo. Assim, uma resposta imune efetiva contra os parasitas pode se tornar lesiva para o hospedeiro gerando processos de auto-agressão caso ela não seja devidamente balanceada (KASPER *et al.*, 2004).

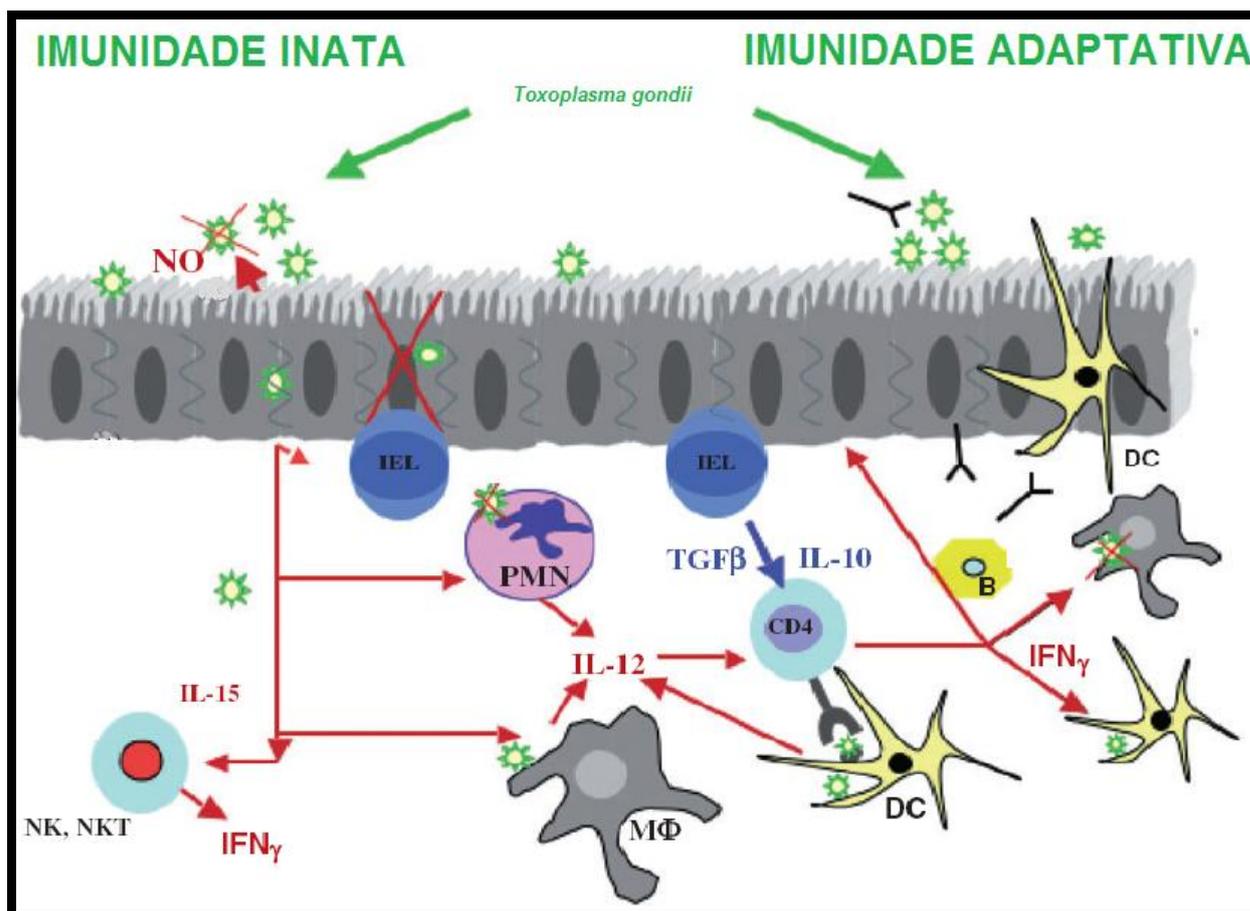


Figura 2: Eventos intracelulares e extracelulares na superfície de mucosa que promovem a eliminação do *Toxoplasma gondii* (extraído e modificado de Buzoni-Gatel *et al.*, 2006)
 Legenda: NO (óxido nítrico); IEL (linfócito inter-epitelial); IL-15 (interleucina 15); NK (célula Natural Killer); NKT (célula T Natural Killer); INF- γ (Interferon gama); PMN (célula polimorfonuclear); IL-12 (interleucina 12); M ϕ (Macrófago); TGF- β (Fator de crescimento beta); IL-10 (Interleucina 10); DC (célula dendrítica).

A resposta humoral é caracterizada pela proliferação de linfócitos B que são ativados contra antígenos, sendo necessária a participação das células T CD4⁺ Th2, através da produção de citocinas tais como IL-4. Estes linfócitos inicialmente produzem as imunoglobulinas da classe M (IgM) que podem ser detectados já na primeira semana após a infecção, atingindo título máximo por volta de 1 mês após a infecção, quando passam a declinar e, em geral, com variação individual, conseguem ser detectados após 1 ano, graças ao uso de técnicas altamente

sensíveis (FILISSETTI & CANDOLFI, 2004). Em alguns pacientes, os anticorpos IgM podem ser persistentes entre 7 à 12 anos após a infecção aguda (BERTOZZI *et al.*, 1999; BOBIC *et al.*, 1991).

A produção das imunoglobulinas da classe G (IgG), que pode ser detectada pelos testes sorológicos dentro de 8 a 12 dias após a infecção inicial pelo *T. gondii* (KAWAZOE, 1995), atingindo sua concentração máxima entre 1 a 2 meses, quando então declinam até um ponto estável, mas continuarão positivos indefinidamente, durante toda a fase crônica da Toxoplasmose (DESMONTS *et al.*, 1985).

A imunoglobulina A (IgA) (DECOSTER *et al.*, 1988) e a imunoglobulina E (IgE) (WONG *et al.*, 1993) são também detectados no soro dos indivíduos infectados pelo parasita. Ambos os anticorpos IgA e IgE anti-*T. gondii* têm valor diagnóstico para a fase aguda da infecção, assim como a IgM específica contra *T. gondii*. Na maioria dos casos, após a fase aguda quando o IgG continua alto e o IgM persiste (IgM residual), os anticorpos IgA e IgE desaparecem (entre 6 a 12 meses) e não são detectados durante a fase crônica da doença (PATEL *et al.*, 1993).

A superfície do *T. gondii* apresenta uma família de proteínas na qual a SAG1 (P30) é o principal membro (HE *et al.*, 2002). Essa proteína encontra-se exclusivamente expressa na forma taquizoíta. O papel biológico dessa família de proteínas encontra-se ainda enigmático. SAG1 induz resposta humoral dominante durante a infecção (KASPER *et al.*, 1989) e forte resposta imune Th1 caracterizada por altos níveis de IFN- γ produzidos por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (KHAN *et al.*, 1988). Durante a infecção pelo toxoplasma, anticorpos específicos não são considerados o principal fator de eliminação da infecção, porém conferem proteção contra a reinfeção.

Durante a fase aguda da Toxoplasmose humana, inclusive na Toxoplasmose congênita, a P30, parece estar envolvida no ataque inicial do *T. gondii* às células hospedeiras (MINEO *et al.*, 1993). Frequentemente anticorpos são produzidos contra esta e outras proteínas do *T. gondii* após a infecção aguda e a detecção destes anticorpos inclusive no feto e no neonato representam a base atual para o diagnóstico sorológico da Toxoplasmose (MINEO *et al.*, 1993; DECOSTER, 1996). Anticorpos IgA anti-P30 são encontrados na maioria dos recém-natos após infecção

congênita, e anticorpos IgE também estão presentes nos primeiros 2 meses de vida (WONG *et al.*, 1993), mas anticorpos IgM anti-P30 são encontrados em poucos casos (DECOSTER, 1996; HUSKINSON *et al.*, 1990). Isto demonstra que troca isotípica de IgM para IgA e IgE já acontece no útero. Como para a produção de anticorpos IgE é necessária a produção de IL-4 ou IL-13 pelas células T CD4⁺ Th2 este fato sugere que as células T CD4⁺ estejam também funcionantes para esta finalidade no feto.

O sistema imune de mucosa dos neonatos está exposto a uma grande diversidade de microorganismos, proteínas estranhas e componentes químicos e sua resistência a infecções dependem tanto dos fatores de proteção provenientes da mãe, incluindo o leite materno, quanto do desenvolvimento de sua própria imunidade (FIELD, 2005). O sistema imune neonatal funciona diferente de um adulto. Ao nascer, seu sistema imune apresenta poucas ou nenhuma célula B produtora de IgA, tendo apenas células produtoras de IgM e IgG (KELLY & COUTTS, 2000). A imunidade de mucosa se desenvolve rapidamente no período pós-natal, conforme a criança entra em contato com antígenos microbianos e da dieta (BRANDTZAEG, 2003), sendo esses anticorpos detectáveis entre 1 semana e 2 meses de vida (EL KAISSOUNI *et al.*, 1998).

Não existem muitos estudos na literatura que relatam a produção de imunoglobulinas totais em amostras de fezes de crianças. Montagne e colaboradores em 2004 avaliaram a quantidade de IgA total em amostras de fezes de crianças (MONTAGNE *et al.*, 2004). Estima-se que a produção diária de SIgA intestinal em adultos seja em torno de 40mg/kg de peso corporal/ dia (CONLEY & DELACROIX, 1987). De acordo com Meillet e colaboradores, a SIgA encontrada nas amostras de fezes é resultado do acúmulo das secreções provenientes da saliva, bile e intestino (MEILLET *et al.*, 1987). Montagne e colaboradores encontraram em crianças saudáveis em média 14mg/100g de fezes, com uma variação individual entre 3-30mg/100g de fezes (MONTAGNE *et al.*, 2004).

1.1.7. Diagnóstico

O diagnóstico sorológico para a Toxoplasmose é empregado com maior frequência do que outros métodos diagnósticos. Nesses testes são analisados os títulos de imunoglobulinas específicas contra o parasita. Os diagnósticos são realizados mais comumente através do ELISA, todavia o “dye test” (SABIN & FELDMAN, 1948), é o mais recomendado, pois é considerado método “padrão ouro” na Toxoplasmose. Sendo a primeira prova de alta sensibilidade a ser desenvolvida, mostrou-se capaz de evidenciar e quantificar, por diluição do soro, anticorpos anti-*T. gondii* presentes no soro desses indivíduos. Tem como fundamento o fato de que toxoplasmas do exsudado peritoneal de camundongos, corados pelo azul-de-metileno, em meio alcalino (pH 11), visto à microscopia óptica, apresentam parasitas com intensa coloração que assumem forma arredondada ovóide.

Outros testes de diagnóstico sorológico são utilizados para investigação da Toxoplasmose, entretanto, alguns testes apresentam restrições no diagnóstico de certos casos da infecção, como acontece com teste de hemaglutinação indireta, o qual não é recomendado para rastreamento de infecções congênitas, sendo utilizado apenas como teste adicional a outros testes mais específicos.

Conforme anteriormente mencionado, as imunoglobulinas (anticorpos) da classe M, isto é, as IgM anti-*T. gondii* são detectadas por volta da primeira semana, com o pico de produção por volta de um mês após a infecção, aproximadamente. Em vigência de IgM específica negativa e em suspeita de infecção, investigam-se outros parâmetros para o diagnóstico de Toxoplasmose aguda, por exemplo, através da elevação do título de IgG após três semanas do diagnóstico inicial. O pico de IgG é atingido no fim de um ou dois meses após a infecção. Deve-se saber que a análise de IgG isoladamente tem pouco valor diagnóstico para a fase aguda, mesmo que apresente alto título, podendo ser apenas indicativo de Toxoplasmose na fase crônica (DESMONTS *et al.*, 1985). A análise de IgA e IgE anti-*T. gondii* pode ser outro critério de diagnóstico suplementar, podendo ser detectadas na fase aguda, concomitantemente ou não à IgM (REMINGTON *et al.*, 2001).

Infecções de até três meses podem ser estimadas com parâmetro da avidéz de IgG associado aos níveis de IgM e IgA específicos contra o parasita (RUSH & LAPPIN *et al.*, 2001). Os níveis de IgA em fezes de gatos infectados com *T. gondii* foram avaliados (ASHBURN *et al.*, 1998) tendo sido observados anticorpos IgA contra todos os estágios de vida do parasita. As IgAs são produzidas principalmente contra SAG1 (P30) da superfície do parasita, quando a via de infecção é oral, reforçando a tese de que a IgA está associada à proteção das mucosas (CHARDES & BOUT, 1993).

A cinética da produção dos anticorpos anti-*T. gondii* deve ser bem observada, pois o diagnóstico de certeza de infecção aguda recente muitas vezes é de extrema importância, em casos, por exemplo, de gestação ou de infecções congênitas. Anticorpos IgM e IgA não atravessam a placenta e são a base do diagnóstico sorológico para a infecção congênita.

A IgA específica pode ser detectada no sangue de adultos e crianças congenitamente infectados, usando ELISA ou ISAGA. Sua sensibilidade é maior na identificação da infecção congênita ou adquirida (STEPICK-BIEK *et al.* 1990). Esse método é importante em sangue do cordão umbilical para evitar a contaminação pelo sangue materno, uma vez que o anticorpo não atravessa a barreira placentária e o seu encontro no feto é diagnóstico de infecção congênita. Os títulos permanecem elevados por um período de 26 semanas, praticamente semelhantes à persistência da IgM (STEPICK-BIEK *et al.*, 1990).

O recém-nascido infectado pelo *T. gondii* apresenta parasitemia que pode ser detectada na camada leucocitária de sangue venoso, pela PCR, em geral durante todo o primeiro mês de vida, principalmente na primeira semana pós-parto, quando a sensibilidade desta técnica é de aproximadamente 90% (CAMARGO, 2001).

Outra comprovação, de alta sensibilidade, são perfis diferentes de anticorpos IgG maternos e da criança, no teste de Western blot com antígenos do *T. gondii*. Esses antígenos, distribuídos em bandas de pesos moleculares crescentes, são incubados com os soros e, após revelação, identificam-se as bandas com que os anticorpos reagiram. A reação de Western blot tem mostrado que o soro materno e o da criança reconhecem diferentes antígenos do *T. gondii*, quando a criança está

congenitamente infectada (CHUMPTAZI *et al.*, 1995). O soro do recém-nascido não infectado irá originar perfil semelhante ao materno, enquanto que diverso se infectado, produzindo seus próprios anticorpos, cuja reatividade característica soma-se à da mãe. Anticorpos IgM anti-*T. gondii* no soro da criança fazem diagnóstico de infecção congênita, exceto nos primeiros 10 dias de vida quando, se presentes no soro materno, podem ter contaminado o sangue do recém-nascido durante o nascimento. Neste caso sua duração é curta, pois a meia-vida da IgM é de cinco dias (CHUMPITAZI *et al.* 1995).

Em 1985, Remington já tinha reconhecido antígenos diferentes por anticorpos das classes IgG e IgM pela mãe e filho congenitamente infectado. Anticorpos das classes IgM e IgA podem ser identificados contra a principal proteína de superfície do *T. gondii*, a proteína P30, pela técnica de Western blot (REMINGTON, 1985).

No recém-nascido, a resposta humoral pode auxiliar o diagnóstico, sendo muito importante, para este fim, o exame tanto do soro da criança como da mãe. Na presença de sinais clínicos sugestivos de Toxoplasmose, altos títulos de anticorpos IgG no recém-nascido, aliados a um perfil materno de infecção recente tem alto valor preditivo positivo de Toxoplasmose congênita, mas que deverá ser comprovado pela positividade, na criança, de teste para anticorpos IgM ou pela evidência do *T. gondii*.

Os títulos de anticorpos IgG caem progressivamente, nos recém-nascidos não infectados, até negatização em prazos de poucos meses a um ano (THULLIEZ *et al.* 1992). Porém, nos infectados estes títulos são permanentes ou ascendentes, com exceção dos casos de imaturidade imunológica, quando a criança com Toxoplasmose não produz anticorpos, havendo queda dos títulos, podendo chegar a negatização por esgotamento dos anticorpos de transferência passiva, para se elevarem em seguida à medida do despertar da resposta humoral (REMINGTON *et al.* 2001).

O diagnóstico definitivo da toxoplasmose nos recém-nascidos pode ser obtido a partir de: (1) Isolamento do parasita em camundongos inoculados com sangue periférico ou liquor do recém-nascido ou ainda de placenta humana. O *T. gondii* dificilmente pode ser demonstrado em sangue periférico após duas semanas de

vida; (2) Presença de anticorpos específicos da classe IgM e/ou IgA ou persistência de anticorpos da classe IgG depois dos 12 meses de idade.

1.2. Imunoglobulina A

A IgA foi identificada nos anos 50 sendo reconhecida na época com a principal imunoglobulina das mucosas (GRABER & WILLIAMS, 1953). Desde então foi estabelecida sua presença em diversos processos imunológicos, notadamente nos mecanismos de defesa contra infecções e algumas doenças. A atuação da SIgA favorece a eliminação de antígenos estranhos sem desencadear resposta inflamatória (BOULIER *et al.*, 2009), aliada a sua baixa competência em ativar o complemento e de atuar como opsonina no sangue, fazendo com que esta imunoglobulina seja considerada antiinflamatória devido a estas características. A produção de IgA do sangue ocorre na medula óssea, enquanto que a IgA de mucosa ocorre na lâmina própria, porém pode haver um intercâmbio dessas células entre esses compartimentos, interligando a imunidade local e sistêmica (CONLEY & DELACROIX, 1987).

A imunoglobulina A (IgA) (Figura 3) representa a classe de anticorpo mais proeminente na superfície de mucosa e a segunda classe mais prevalente no soro humano (VAN EGMOND *et al.*, 2001). De fato, mais anticorpos IgA são produzidos diariamente do que qualquer outro isotipo, isto é, 66mg/Kg por dia comparado a 34 mg/Kg de IgG e 7,9 mg/Kg de IgM (YOO & MORRISON, 2005). Dado o papel crucial que desempenha na proteção da mucosa, a IgA é um candidato ideal para utilização como um agente terapêutico ou profilático.

IgA existe como uma molécula heterogênea e possui dois isotipos denominados IgA1 e IgA2, sendo que IgA2 apresenta três alótipos. Na maioria das espécies, anticorpos IgA encontram-se no sangue em sua forma polimérica. No soro humano, os anticorpos IgA são predominantemente monoméricos e constituem 15-20% das imunoglobulinas totais, enquanto que na mucosa esta representa a principal classe de anticorpo (VAN EGMOND *et al.*, 2001).

Com relação aos isotipos, a IgA1 e a IgA2 apresentam a prevalência de 90% e 10%, respectivamente, no soro humano, enquanto que nas secreções externas, a proporção de IgA2 pode ser maior que 50% (YOO & MORRISON, 2005). Esta característica de distribuição pode ser pelo fato de plasmócitos na medula óssea serem fonte dos níveis séricos de IgA e a células plasmáticas da lâmina própria serem fonte de IgA secretória (SIgA) (YOO & MORRISON, 2005).

A IgA que é excretada nas secreções ocorre predominantemente como complexo dimérico contendo dois peptídeos adicionais, denominados cadeia-J e componente secretório (SC)(Figura 3). A SIgA tem por função principal a manutenção do balanço entre a resposta imunológica contra patógenos, enquanto que reações contra a microflora e antígenos provenientes da dieta devem ser evitadas. Sendo assim, a SIgA atua na primeira linha de defesa em áreas de mucosa, como por exemplo, inibindo a adesão de microorganismos, auxilia na remoção de imunocomplexos e na neutralização de vírus (VAN EGMOND *et al.*, 2001).

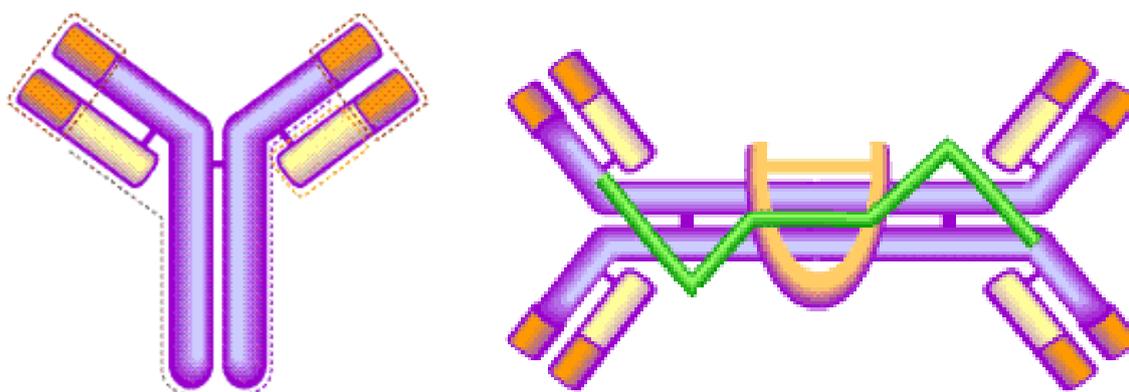


Figura 3: Estrutura da imunoglobulina A na forma monomérica e em sua forma dimérica, destacando os dois peptídeos: a cadeia-J (em laranja claro) e a porção secretora (em verde).

A IgA não atravessa a placenta e sua concentração no sangue do cordão é geralmente de 0.1 a 5.0 mg/dl, o que representa em torno de 0.5% dos níveis do soro materno (AVRECH *et al.*, 1994). Aumento dos níveis de IgA no sangue de cordão pode estar relacionado à infecções congênitas (ALFORD, 1982), inclusive à Toxoplasmose congênita (STEPICK-BIEK *et al.*, 1990).

A SIgA encontra-se presente em várias secreções e especialmente no leite materno. Sua função inicial é impedir que microorganismos se liguem a mucosa, fazendo com que esses não consigam se ligar e penetrar a mucosa o que causaria a infecção, assim como no trato respiratório e gastrointestinal.

O leite materno apresenta uma diversidade de componentes com propriedades de defesa contra agentes infecciosos (HANSON *et al.*, 2001). Entre esses componentes estão a IgA secretória (SIgA), produzida pelas células do colostro nas glândulas mamárias (OGRA *et al.*, 1978), se originando de células imunocompetentes precursoras a nível intestinal (GALTS) e respiratório (BALTS) que seriam ativadas por antígenos nestes locais. Uma vez sensibilizados, seriam transportadas pela circulação sistêmica até as mamas e como os plasmócitos iniciariam a produção de imunoglobulinas específicas.

A quantidade de IgA no colostro varia de 200 a 400 mg/dl caindo pela metade após 72 horas (COSTA-CARVALHO, 1992). Esta queda é compensada pelo aumento do volume de leite. A SIgA ainda é detectada no leite materno no segundo ano de lactação (COSTA-CARVALHO, 1992).

Anticorpos do leite também são capazes de neutralizar toxinas de vírus e bactérias. A SIgA apresenta essas funções por ser capaz de suportar a ação de enzimas proteolíticas presente no trato gastrointestinal. Estudo recente mostrou uma outra função relacionada às SIgAs em que juntamente com o antígenos a que se ligam são levadas para as células M na Placa de Peyer's e estimulam as APCs ali presentes (FRAVER *et al.*, 2005). Isto nos mostra que a SIgA pode tanto proteger a mucosa do lactente como estimular a mucosa do lactente a desenvolver resposta quando necessário. Muitos trabalhos mostraram a SIgA específica presente no leite materno e a sua proteção contra infecções do *Vibrio Cholerae*, *Campylobacter*,

Shigella, enterotoxinas de *Escherichia coli* e *Giardia lamblia* (GLASS *et al.*, 1983; RUIZ-PALACIOS *et al.*, 1990; HAYANI *et al.*, 1992; CRUZ *et al.*, 1988; WATERSPIEL *et al.*, 1994).

Muitos estudos mostram o papel protetor do leite materno, sendo de extrema importância naquelas áreas onde há infecções endêmicas relacionados com a falta de água e saneamento básico. A proteção pela amamentação é, em parte, dependente da IgA secretória e lactoferrina, comprovada em trabalhos com estudos *in vitro* (DELNERI *et al.*, 1997). Os anticorpos da classe IgA presentes no colostro também funcionam como opsoninas estimulando a atividade microbicida de fagócitos mononucleares do colostro (HONÓRIO-FRANÇA *et al.*, 1997).

1.2.1. Anticorpos IgA anti-*T. gondii* em mucosas

A imunoglobulina A (IgA) é o isotipo de imunoglobulina mais abundante em secreções de mucosas, constituindo mais de 80% de todos os anticorpos associado à este tecido. A IgA constitui-se um elemento da resposta imune humoral importante juntamente com elementos da imunidade inata, para promover proteção da superfície da mucosa contra antígenos microbianos (MESTECKY, 1999). O seu papel no controle da infecção toxoplásmica também tem sido mostrado como de alta importância, principalmente em mucosas.

A imunidade de mucosa é protetora contra diversos agentes infecciosos e/ou tóxicos. A eficiente estimulação da resposta imune em mucosas torna-se importante no controle da infecção toxoplásmica via oral.

A resposta imune de mucosa inicia-se com a “captura” dos antígenos a partir da superfície da mucosa. Estes antígenos serão encaminhados para o tecido linfóide local na mucosa ou para o linfonodo próximo onde linfócitos B antígenos específicos serão ativados (NEUTRA *et al.*, 1996). Estas células, uma vez ativadas, entram na circulação e migram para o local da infecção, onde a IgA dimérica é transportada para a superfície da mucosa através do receptor Ig polimérico e então é expressa

como SIgA. A SIgA é bastante efetiva, visto que este anticorpo pode eliminar antígenos, pela sua ligação com este, cruzando a barreira epitelial, transportando antígenos pelo epitélio da mucosa ou via hepatócitos através do ducto biliar. Devido à capacidade de ligação e transporte, SIgA é claramente um componente importante da resposta imune de mucosa.

De acordo com Meillet e colaboradores (MEILLET *et al.*, 1987), a SIgA normalmente encontrada nas fezes é resultante do acúmulo de secreções como saliva, bile e fluido intestinal, bem como, as SIgAs humanas são resistentes a enzimas ácidas e proteolíticas (DELACROIX *et al.*, 1982; JONARD *et al.*, 1984).

A SIgA é ausente nas crianças ao nascer, e começa a se tornar detectável nas secreções de mucosa entre a primeira semana e o segundo mês de vida (EL KAISSOUNI *et al.*, 1998). A presença de SIgA específica em crianças depende da exposição natural a antígenos presentes no ambiente (CRIPPS & GLEESON, 1999). Sendo assim, os níveis e a especificidade das IgAs presentes na mucosa constituem um bom marcador dos eventos imunológicos no trato gastrointestinal (VAERMAN, 1984). No entanto, poucos estudos examinam a maturação da produção da IgA na mucosa de crianças (EL KAISSOUNI *et al.*, 1998).

Em estudo da resposta contra o *Toxoplasma gondii* em modelo experimental murino (CHARDES *et al.*, 1990), mostrou-se que por meio da infecção oral por oocistos, camundongos começavam a produzir anticorpos IgA específicos contra a infecção no sangue e no leite durante as primeiras duas semanas. Anticorpos IgG anti- *T. gondii* são detectados depois dos títulos de IgA anti- *T. gondii* já terem sido detectados. Anticorpos do tipo IgM anti- *T. gondii* começam a ser produzidos juntamente com anticorpos IgA. Através de Western blot observou-se que a produção de IgA anti- *T. gondii* no intestino, no modelo experimental murino, reconheceu um número expressivo de diferentes epítomos de antígenos do parasita (CHARDES *et al.*, 1990).

Apesar de nenhum estudo ter demonstrado a presença da IgA específica contra antígenos do *Toxoplasma gondii* em fezes humanas, sabidamente a presença desses anticorpos no soro ou nas secreções pode indicar que antígenos cruzam a

barreira intestinal para estimular tanto o sistema imune local quanto a imunidade sistêmica iniciando a resposta imune humoral (BRANDTZAEG, 2007).

A identificação de IgA contra antígenos de *T. gondii* foi avaliada por McLeod e Mack em camundongos infectados com bradizoítos via oral. Os autores verificaram a presença da SIgA no lavado intestinal desses animais, mostrando pela primeira vez a presença de IgA intestinal específica contra *T. gondii* (McLEOD & MACK, 1986) e posteriormente sugeriram que a IgA poderia apresentar papel protetor contra a infecção.

A SIgA é protetora contra algumas infecções intestinais. Anticorpos IgAs específicos no colostro e intestino, obtidos de camundongos adultos imunes, mostraram a transferência de proteção contra a infecção por *Taenia taeniaformis* em camundongos recém nascidos (SHEELAGH. & SOULSBY, 1978). Fubara e Freter mostraram que as SIgAs intestinais são ativas na proteção contra *Vibrio cholerae* em camundongos e esta proteção está associada com a inibição da adesão dos vibrios com a mucosa intestinal (FUBARA & FRETER, 1973). Outros trabalhos confirmam que as SIgAs podem inibir a adesão de bactérias a superfície epitelial e promover a proteção contra infecção da superfície da mucosa (WILLIAMS & GIBBONS, 1972; CANTEY, 1978). Anticorpos anti- SIgA são considerados protetores contra *Eimeria tenella* pela inibição da penetração e desenvolvimento desses parasitas nas células-alvo (DAVIS & PORTER, 1979). Pesquisas sobre os mecanismos que conferem resistência contra infecções orais e congênicas podem contribuir para o estudo sobre aumento de IgAs específicas na infecção toxoplásmica.

1.3. Toxoplasmose em crianças

A transmissão transplacentária é a forma mais grave de transmissão, pois o feto é um organismo imunologicamente vulnerável. Sendo assim, essa forma de transmissão merece a atenção das autoridades de saúde, pois é a forma mais grave da infecção e leva a conseqüências malélicas para o feto ou para o recém-nascido.

Em 1980, Wilson e Remington afirmaram que a chance de transmissão materno-fetal depende de três fatores presentes conjuntamente: parasitemia materna, maturidade da placenta e competência da resposta imune materna (WILSON & REMINGTON, 1980). Cerca de 50% dos recém-nascidos de mães que soroconverteram durante a gravidez são infectados, e destes, 10% apresentam manifestações clínicas (HINRICHSEN, 2005). Porém, a frequência de transmissão e a gravidade das conseqüências da infecção para o feto ou recém-nascido são inversamente proporcionais, de modo que as conseqüências mais graves são observadas quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre de gestação, enquanto a transmissão que ocorre no terceiro trimestre geralmente resulta em Toxoplasmose subclínica (HOHLFELD *et al.*, 1989; DUNN *et al.*, 1999; WALLON *et al.*, 1999).

Para que ocorra a contaminação fetal, necessita-se de taquizoítos circulantes que invadam a placenta, levem a uma infecção inicialmente placentária e subseqüentemente, fetal (MOMBRO *et al.*, 2003). Isso ocorre após um período de tempo variável, que depende da agressividade da cepa, do número de organismos que invadiram a placenta, da resposta imune do organismo invadido e da intensidade dessa resposta inflamatória do feto (ANDRADE, *et al.*, 2004; VARELLA *et al.*, 2003).

A possibilidade de transmissão fetal é remota quando a Toxoplasmose é adquirida antes da concepção, mas pode ocorrer em algumas situações, tais como, quando a gestante apresenta doença imunossupressora, como a AIDS, ou está sob uso de drogas imunossupressoras como em portadores de doenças auto-imunes ou receptores de transplantes de órgãos. Tais situações levam à reativação de uma infecção crônica, com a conversão de bradizoítos presentes em cistos teciduais em taquizoítos que atravessam a placenta (MINKOFF *et al.*, 1997). Há trabalhos relatando essa transmissão após a reinfeção materna durante a gestação em mulheres imunocompetentes (GAVINET *et al.*, 1997), bem como a transmissão transplacentária em uma mulher imunocompetente infectada antes da gestação (VOGEL *et al.*, 1996).

A confirmação da infecção materna é baseada no perfil sorológico com determinação da resposta humoral, através da pesquisa de anticorpos específicos e suas classes (CAMARGO *et al.*, 1991). O diagnóstico se baseia na soroconversão materna e é realizado rotineiramente durante o pré-natal em uma única amostra, selecionando mães IgM positivas para *T. gondii* como um índice de infecção aguda (CASTRO *et al.*, 2001).

No início da sua vida ainda o neonato não apresenta maturidade para combater qualquer infecção, além de ainda não possuir defesa imune materna originada por passagem de anticorpos da classe IgG através da placenta. Uma infecção nesse período da vida poder ser de evolução devastadora (BOYER *et al.* 1998).

A transmissão vertical do *T. gondii* da mãe para o filho durante a amamentação, apesar de ser comum em algumas espécies animais, como roedores, ainda não foi confirmada na espécie humana (MONTROYA & LIESENFELD, 2004). Isto pode ser considerado caso a mãe adquira a infecção durante as últimas semanas de gestação. Nestas circunstâncias, o risco da transmissão transplacentária é tão alto (aproximadamente 100%) que o risco adicional em adquirir a infecção através do leite materno se torna insignificante (REMINGTON & KLEIN, 2001).

Porém, em 2006 (LAGO *et al.*, 2006), ocorreu um surto intra-familiar de Toxoplasmose adquirida sintomática no Município de Santa Vitória do Palmar, Rio Grande do Sul, com dez pessoas acometidas, sendo 2 indivíduos lactentes exclusivos. Os bebês tiveram toxoplasmose adquirida, provavelmente transmitida pelo leite materno. Pode-se afirmar que não se tratava de toxoplasmose congênita, uma vez que, pelo teste do pezinho logo após o nascimento, eles eram não reagentes para Toxoplasmose (LAGO *et al.*, 2006). Da mesma forma, pelos exames realizados durante o pré-natal, suas mães também eram suscetíveis à doença. O surto em questão apresentou características peculiares no que tange ao alto índice de doentes sintomáticos. Embora não seja possível afirmar que os bebês adquiriram a doença pelo leite de suas mães, essa é uma possibilidade muito concreta que evidencia outra forma de transmissão da toxoplasmose adquirida (LAGO *et al.*, 2006).

Trabalhos experimentais demonstram que o leite de animais infectados contém taquizoítos, possibilitando a transmissão para a prole (SANGER & COLE, 1955). Riemann e colaboradores (RIEMANN *et al.*, 1975) relataram um caso de infecção pelo *T. gondii* em crianças, onde se suspeitou do contágio pela ingestão de leite de cabras não pasteurizado, embora se argumente que o suco gástrico inativasse rapidamente os taquizoítos. Em 1998, Dubey demonstrou a infecção em camundongos e gatos infectados via oral com taquizoítos, comprovando assim que a infecção pela ingestão de leite contendo a forma parasitária poderia ser possível (DUBEY, 1998).

Bonametti e colaboradores descreveram a transmissão do *T. gondii* em uma mãe que adquiriu a infecção, pela ingestão de carne ovina crua contaminada por cistos, e possivelmente transmitiu o parasita ao recém-nascido pela amamentação (BONAMETTI *et al.*, 1997). A demonstração da ocorrência da Toxoplasmose em humanos, associada à ingestão de leite de cabras *in natura*, comprovadamente infectadas, torna esses animais importante fonte de infecção, principalmente pelo fato dos caprinos não serem submetidos normalmente a controle sanitário da Toxoplasmose (CHIARI *et al.*, 1987; SKINNER *et al.*, 1990).

Nas primeiras semanas da infecção congênita, surgem anticorpos específicos representados por isotipos IgM, IgA, IgE e IgG. A pesquisa de IgM e IgA em recém-nascidos é utilizada para o diagnóstico de Toxoplasmose congênita, pois não atravessam a placenta e quando presentes no soro indicam a produção pelo próprio feto, em resposta a uma infecção intra-uterina (CAMARGO, 2001).

Em cerca de 80% dos casos, a Toxoplasmose congênita é inaparente, assim, passando despercebida, mas que será causa de lesões posteriores, principalmente oculares e cerebrais, levando à cegueira e ao retardo mental (CAIAFFA *et al.* 1993), que podem ser evitadas ou minimizadas se o tratamento for iniciado ainda no primeiro mês de vida e prolongado por todo o primeiro ano. Assim, fica evidente a conveniência de estabelecer, com precocidade, o diagnóstico, que tende a prevenir problemas futuros (JONES *et al.*, 2001).

1.3.1. Estudos sobre a toxoplasmose congênita e neonatal

Considerando-se que a toxoplasmose congênita é sintomática em apenas 10% dos pacientes, torna-se muito difícil determinar sua real prevalência em países que não realizam o acompanhamento sorológico sistemático durante a gestação (HALL, 1992). Ela difere entre várias populações, sendo estimada prevalência de 1 a 7 infectados para cada 1000 nascidos nas várias regiões do mundo. Em algumas localidades, essa taxa de soropositividade pode ser mais elevada, com 10,9 infectados na Guatemala (REMINGTON *et al.*, 2001); 17 infectados em Brasília (KANIAK, 1991); 18 infectados no México (SINIBALDI & RAMIREZ, 1992); 0,5 a 1 infectados nos Estados Unidos (MCCABE & REMINGTON, 1988); 3 infectados em Paris (DESMONTS *et al.*, 1965); 4,4 infectados na Finlândia, 5 infectados na Austrália, 7,5 infectados na Alemanha e 14,3 infectados na Bélgica (LAPPALAINEN *et al.*, 1992) para cada 1000 nascidos vivos.

A freqüência da toxoplasmose congênita determinada por programas de *screening* de neonatos varia de 0,5% na Colômbia a 0,01% em algumas regiões do Brasil. Esta freqüência é pelo menos dez vezes maior para muitos estudos realizados na América do Sul do que aqueles realizados na Europa e Estados Unidos.

No Brasil existem diversos estudos sobre a toxoplasmose congênita. Em certas áreas do País, aproximadamente 60% das crianças de 6-8 anos de idade apresentam anticorpos anti-*T. gondii* ligados a ingestão de oocistos presentes no ambiente infectado com oocistos do parasita (HILL & DUBEY, 2002).

Quanto à infecção materno-fetal, um estudo realizado por Neto (NETO *et al.*, 2000), mostrou que das 140914 amostras de soro de indivíduos de médio/alto e alto poder aquisitivo, provenientes de todas as regiões do Brasil, 47 eram de casos de Toxoplasmose congênita, ou seja, uma prevalência de um caso em cada 3000 nascimentos.

Já no município de Campos dos Goytacazes realizou-se, de abril de 1999 a abril de 2002, um rastreamento soroepidemiológico para toxoplasmose congênita através do teste do pezinho com 3478 exames em recém-natos, sendo detectados

26 testes positivos, dos quais 8 se confirmaram como casos de toxoplasmose congênita. No rastreamento soropidemiológico para toxoplasmose congênita detectou-se a frequência de 0,74% de doença aguda na gestação e a prevalência de 1 caso de toxoplasmose congênita para 434,7 nascidos vivos (1/434) (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2006; ABREU, 2003).

Um estudo coordenado por Pedreira (PEDREIRA, 1995) em 2.330 gestantes por ocasião de consulta pré-natal em um Hospital Universitário de Referência do município de São Paulo, verificou-se a prevalência de anticorpos específicos para toxoplasmose em 65% de 175 gestantes. Em 1998, Brisighelli Neto em 397 gestantes na cidade de Bragança Paulista no estado de São Paulo, constatou soroprevalência de 55% (BRISIGHELLI NETO, 1998).

Em Belém do Pará, num estudo feito no Instituto Evandro Chagas por Carmo e colaboradores (CARMO *et al.*, 1997) avaliou um grupo de 192 grávidas e verificou que 71% eram soropositivas. Anos depois, Bichara (BICHARA, 2001), avaliou 656 gestantes provenientes da área metropolitana de Belém, e detectou a prevalência de 81%.

Em Porto Alegre, Neves e colaboradores, em 1994, avaliaram 812 gestantes e encontrou soropositividade para IgG em 74,5% e para IgM em 3,6% das gestantes que realizaram sorologia nas Unidades do Sistema Único de Saúde da região noroeste do Rio Grande do Sul (NEVES *et al.*, 1994). Varella e colaboradores (VARELLA *et al.*, 2003) realizaram um estudo em 2003 com 1261 gestantes atendidas no Hospital de Porto Alegre e verificou-se a prevalência de 59,8% de soropositividade.

Portanto, no Brasil, os diversos inquéritos epidemiológicos realizados em gestantes com diferentes testes sorológicos têm mostrado uma alta prevalência da Toxoplasmose, variando de 55% a 82%.

1.4. Estudo de proteínas na infecção pelo *Toxoplasma gondii* - proteômica

Os estudos genéticos desencadearam uma nova vertente de estudo no que tange a necessidade de compreender a função das proteínas expressas por um genoma. Esse campo conhecido como Proteômica ficou responsável pela descrição completa, a nível protéico, de um organismo ou tecido sob determinadas condições. Diferentemente do genoma de um organismo, o proteoma é variável, sujeito a mudanças como em estágios desenvolvimento, doenças ou condições ambientais (PANDEY & MANN, 2000; WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

A expansão da proteômica e o avanço em diferentes áreas do conhecimento foram substancialmente facilitados pelo desenvolvimento de novas técnicas que ocorreram paralelamente, tais como: (1) novos métodos e tecnologias, como a técnica de eletroforese bidimensional, que possibilitou uma alta resolução e reprodutibilidade dos géis obtidos, a inovação chave foi o desenvolvimento de géis com gradiente de pH imobilizado aplicados à focalização isoelétrica (GÖRG *et al.*, 1988; GÖRG *et al.*, 1999; GÖRG *et al.*, 2000; GÖRG *et al.*, 2004); (2) desenvolvimento de softwares que analisa as imagens geradas pelos géis, permitindo arquivar as imagens e compará-las com outras; (3) invenção de novas técnicas de ionização e detecção para os espectrômetros de massas, que possibilitaram a análise de proteínas e peptídeos com alta sensibilidade, acurácia e rapidez, permitindo também a análise de modificações pós-traducionais (MANN *et al.*, 2001; MANN & JENSEN, 2003); (4) o aumento dos bancos de dados originados pelos projetos genomas, pois a seqüência de DNA de organismos é muito importante para a identificação e caracterização de proteínas com o espectrômetro de massa; e (5) o desenvolvimento no campo da bioinformática tem fornecido ferramentas para combinar e armazenar a grande quantidade de dados produzidos por esses novos métodos de análise (WESTERMEIER & NAVEN, 2002).

Os estudos que englobam a análise proteômica têm como intuito promover a compreensão mais global de sistemas biológicos complexos e proporcionar o desenvolvimento de novos marcadores e alvos terapêuticos (HOEHN & SUFFREDINI, 2005).

Atualmente a identificação de proteínas antigênicas específicas de cada fase evolutiva do toxoplasma, e conseqüentemente, de cada fase da infecção, vêm sendo realizada através de estudos proteômicos. A análise proteômica vem auxiliando ainda na compreensão da patogênese da Toxoplasmose, na identificação de moléculas envolvidas na transição do bradizoíto para taquizoíto, e no conhecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro contra a infecção (COHEN *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2004).

A identificação de IgA por espectrometria de massas foi relatada em estudo por Drake e colaboradores (DRAKE *et al.*, 2006). Amostras de soro de pacientes com câncer de próstata foram avaliadas para a identificação de glicoproteínas como provável biomarcadores do câncer. Essas glicoproteínas foram purificadas do soro desses pacientes por cromatografia de afinidade (DRAKE *et al.*, 2006). No entanto, a natureza da ação destes anticorpos específicos ainda não está totalmente elucidada. Acredita-se que uma diminuição na produção de SIgA pode favorecer a colonização por qualquer tipo de micro-organismo. Um exemplo disso ocorre com *Candida albicans* e desenvolvimento da candidíase bucal (COOGAN *et al.*, 1994) onde foi observado em um grupo de adultos com infecção pelo HIV a manifestação clínica de candidíase.

Nielsen e colaboradores realizaram estudos proteômicos para o diagnóstico da Toxoplasmose congênita (NIELSEN *et al.*, 2005). Os resultados obtidos permitiram identificar perfis diferentes de expressão protéica comparando os soros de mães, soro convertidas durante a gestação e soros de seus respectivos recém-nascidos infectados, levando os autores a sugerirem a utilização da eletroforese 2D, seguida de análise por Western blotting como uma nova opção no diagnóstico da Toxoplasmose congênita.

JUSTIFICATIVA

II. JUSTIFICATIVA

Dados epidemiológicos sobre a Toxoplasmose em Campos dos Goytacazes evidenciam que a prevalência da infecção na faixa etária de 0 a 4 anos é bem menor do que se supunha, havendo a necessidade de se estudar em maiores detalhes a prevalência e a apresentação clínica da doença, nessa faixa etária da população de baixa e média/baixa renda no município. O fato de se estar em região de alta prevalência e com alto risco de infecção da população em geral e de relativamente baixa incidência (números de casos novos por ano) na faixa etária de 0 a 4 anos, elege Campos como um local privilegiado para se conduzir tal investigação.

Os anticorpos presentes em mucosas representam a primeira linha de defesa contra doenças infecciosas causadas por microrganismos e parasitas que penetram no corpo através destas barreiras (LAMM,1997). A presença do isotipo IgA tem sido observado precocemente durante infecções orais tanto de protozoários como de helmintos (ERIKSEN *et al*, 1996), incluindo-se no grupo dos protozoários o *T. gondii* (DECOSTER *et al*, 1988; CHARDES *et al*, 1990).

A identificação de proteínas antigênicas presentes nas diferentes fases evolutivas do *T. gondii*, e conseqüentemente, de cada fase da infecção tem sido estudada em análises proteômicas. Mais recentemente, os estudos proteômicos concederam subsídios para compreensão da patogênese da Toxoplasmose, por meio de identificação de proteínas diferenciais entre as fases aguda e crônica da infecção (ZHOU *et al.*, 2004; COHEN *et al.*, 2002). Um exemplo da aplicabilidade da proteômica na Toxoplasmose foi recentemente descrita em estudo onde utilizaram a “imunoeletroforese bidimensional (2D)” no diagnóstico da Toxoplasmose congênita identificando os diferentes perfis de anticorpos IgG entre o soro das mães e das crianças. Com esses resultados os autores sugerem o uso da imunoeletroforese 2D como uma nova ferramenta no diagnóstico da Toxoplasmose congênita (NIELSEN *et al.*, 2005).

Portanto a identificação de imunoglobulinas presentes no material fecal de crianças de 0-4 anos de idade que sabidamente estão expostas ao alto risco de infecção pelo *Toxoplasma gondii* é pertinente, pois é sabido que esses anticorpos

são produzidos precocemente em vários tipos de patologias e nos leva a pensar a cerca do aumento dos níveis dessa imunoglobulina nesse tipo de material.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença e integridade de imunoglobulinas A presentes em amostras de fezes de crianças expostas a alto risco de infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii* através de métodos de purificação e seqüenciamento, visando subsidiar pesquisas futuras em imunologia celular e a confecção de vacinas contra o parasita.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a pertinência da utilização da metodologia para a purificação de imunoglobulinas A de amostras de fezes de crianças pelo método de cromatografia de afinidade em coluna de jacalina;
- Otimizar a técnica de eletroforese bidimensional para análise de amostras de material fecal humano;
- Identificar as diferentes proteínas presentes nos “mapas eletroforéticos” dos grupos avaliados, através da técnica de seqüenciamento, após digestão trípica dos *spots* e identificação por MALDI-TOF/TOF.
- Avaliar a presença de proteínas que possam ser biomarcadores entre os grupos avaliados;

***POPULAÇÃO ESTUDADA,
MATERIAL E MÉTODOS***

IV. POPULAÇÃO ESTUDADA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Indivíduos sujeitos da pesquisa

Os indivíduos participantes neste estudo foram provenientes de comunidades carentes do município de Campos dos Goytacazes, sendo crianças na faixa de 0 a 4 anos de idade. Nestas comunidades observou-se que a prevalência da Toxoplasmose é elevada demonstrando estarem estes indivíduos vivendo sob alto risco de infecção por *Toxoplasma gondii* (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; AZEREDO *et al.*, 2003). Um termo de consentimento livre esclarecido foi entregue as mães e, concordando em participar do projeto, o mesmo foi assinado permitindo o uso das amostras de fezes do(s) seu(s) filho(s) (Anexo I). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) presente na Faculdade de Medicina de Campos (FMC), sob o parecer de nº 013/2007 (Anexo II).

As amostras foram identificadas por códigos alfanuméricos com intuito de resguardar os direitos de privacidade dos indivíduos. As letras utilizadas foram M e F, sendo relacionados respectivamente à mãe e filho. Os números da casa da dezena, centena e milhar, relacionada às mães, e a casa das unidades, relacionada ao filho. Estas identificações estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1: Sistema de codificação de amostras do binômio mãe-filho para extração de IgA.

Código	Amostra
MF0071	Amostra de fezes do primeiro filho da mãe 7
MF0072	Amostra de fezes do segundo filho da mãe 7
MF0081	Amostra de fezes do primeiro filho da mãe 8
MF0082	Amostra de fezes do segundo filho da mãe 8
MF0101	Amostra de fezes do filho da mãe 10
MF0111	Amostra de fezes do primeiro filho da mãe 11
MF0112	Amostra de fezes do segundo filho da mãe 11
MF0121	Amostra de fezes do filho da mãe 12
MF0131	Amostra de fezes do filho da mãe 13
MF0141	Amostra de fezes do filho da mãe 14
MF0151	Amostra de fezes de adulto controle
MF0161	Amostra de fezes do primeiro filho da mãe 16
MF0162	Amostra de fezes do segundo filho da mãe 16
MF0163	Amostra de fezes do terceiro filho da mãe 16
MF0171	Amostra de fezes do filho da mãe 17

4.2. Amostras de fezes

As amostras de material fecal foram coletadas pelas mães, tendo instruídas sobre os cuidados de higiene e sobre a conservação, em recipientes estéreis (Biotécnica) e sem conservantes, na manhã previamente marcada com as mães para a coleta. As amostras, sobre refrigeração, foram trazidas ao laboratório e processadas.

4.2.1. Extração de imunoglobulinas de extratos fecais

A extração de imunoglobulinas a partir de extratos de amostras fecais foi padronizada em estudo anterior (MANGIAVACCHI, 2006).

4.3. Detecção de anticorpos IgA anti-*T. gondii* com utilização do kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur)

O kit Platelia Toxo IgA TMB é um método imunoenzimático duplo sanduíche de fase sólida, que captura a imunoglobulina A anti-*T. gondii* presente na amostra de soro na fase sólida (microplaca coberta com anticorpos anti-cadeia alfa). Primeiramente, a placa foi lavada uma vez com a Solução de Lavagem (Tampão Tris-NaCl pH 7,4 + 1% de Tween 20) e seca com papel filtro. Os controles positivos, negativos, o *cutoff* e as amostras fezes foram diluídos 1:101, sendo somente as amostras de fezes diluídas 1:50, em Diluente (Tampão Tris-NaCl pH 7,7 + albumina bovina + 0,1% de Tween 20 + vermelho fenol), e colocados 200ml de cada nos poços da placa. Após esta etapa, a placa foi incubada na estufa a 37°C por 1 hora. Findo esse tempo, a placa foi lavada duas vezes com a solução de lavagem e assim, as amostras que não se ligaram foram removidas da mesma.

A presença do imunocomplexo (fase sólida anti-IgA + IgA anti-*T. gondii* + antígeno de *T. gondii* + anticorpo anti-*T. gondii* conjugado) foi demonstrada pela adição de 200µl da solução contendo substrato peroxidase e o cromógeno, iniciando a reação de desenvolvimento de cor. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e em ausência de luz, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100µl de ácido sulfúrico 1N. A densidade óptica foi lida a 450/620nm e foi proporcional a quantidade de IgA anti-*T. gondii*.

Os resultados foram obtidos em DO (densidade óptica) e foram calculados conforme as especificações do kit utilizando amostras de soro humano como

controle: R3 sendo amostra de soro negativa, R4a sendo amostra de soro médio-positiva (denominada amostra cut off) e R4b sendo amostra de soro altamente positiva.

O critério de validação do kit é estabelecido da seguinte forma: (1) A razão da média da DO dos R4a/DO de R3 deve ser maior que 1,5; (2) a razão DO de R4b/média da DO dos R4a deve ser maior que 1,5 e (3) DO de R4b deve ser maior que 0,5. Se estas especificações se cumprirem, o teste é válido. Uma vez estabelecida validação do teste, os valores de DO das amostras foram interpretados da seguinte forma: Razão da DO da amostra/ média da DO de R4a. Determinado este valor, os resultados das amostras foram interpretados conforme a tabela 2. Esta fórmula é a que se utiliza para o “cut off” do kit, que irá determinar o ponto onde as amostras foram consideradas positivas, isto é, apresentaram reatividade IgA anti-*Toxoplasma*.

Tabela 2: Interpretação dos resultados do Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur).

Valor da amostra	Resultado
≥ que 1,00	POSITIVO
≥ que 0,8 e < que 1,00	DUVIDOSO
< que 0,8	NEGATIVO

4.3.1. Classificação das amostras de fezes nos grupos G1 e G2

As amostras de fezes foram separadas em dois grupos: G1 e G2, baseados no perfil de reatividade de anticorpos IgA anti-*T gondii* no kit Platelia™ Toxo IgA TMB e pelo perfil eletroforético que as amostras apresentaram em gel unidimensional. No Grupo G1 foram agrupadas as amostras MF0082, MF0121, MF0141, MF0161, pois estas apresentaram resultado NEGATIVO para o controle-conjugado avaliado no kit e um bandejamento fraco na faixa de 25-30 KDa no gel unidimensional.

No Grupo G2 foram agrupadas as amostras MF0081, MF0101, MF0111 e MF0112, pois estas apresentaram resultado POSITIVO para o controle-conjugado avaliado no kit e um bandeamento mais intenso na faixa de 25-30 KDa no gel unidimensional.

4.4. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976)

As proteínas de todas as amostras avaliadas nesse estudo foram dosadas pelo método de Bradford. O experimento foi desenvolvido em triplicata e para confecção da curva padrão foi utilizada Albumina Sérica Bovina (BSA) diluída em água destilada em diferentes concentrações, utilizando-se como controle todos os reagentes com exceção do BSA. Foi colocada a Solução de Bradford (Comassie-blue G250, etanol 95%, solução de Ácido fosfórico 85 %, H₂O MiliQ q.s.p.). A formação do complexo proteína-corante é rápida e estável no período de 5 a 60 minutos. Assim, adotamos um intervalo constante de aproximadamente 30 minutos entre a adição do corante e a leitura da absorbância feita no espectrofotômetro (SHIMADZU) a 595nm. Cada valor de DO obtido foi convertido em concentração de proteína, empregando-se a curva padrão.

4.5. Purificação de IgA anti-*T. gondii* por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina

A coluna de jacalina foi adquirida comercialmente (SIGMA) sob a forma de gel e foi reconstituída em Tampão Fosfato Salino (Fosfato de sódio 0,1M, NaCl 0,15M, pH 7,4) conforme as instruções do fabricante. A coluna foi deixada empacotando e , posteriormente, foi equilibrada com o mesmo tampão fosfato salino utilizado anteriormente. A amostra foi adicionado à coluna empacotada para a ligação da IgA na coluna. A coluna foi agitada e deixada novamente empacotando.

Para a eluição do material não ligado a coluna foi lavada novamente com o Tampão Fosfato Salino. Para remover a IgA ligada a jacalina, foi adicionado α -D-galactose 0,1M. O material eluído da coluna de jacalina foi coletado em frações de 300ul em eppendorfs® e cada tubo foi avaliado quanto à absorbância a 280nm no espectrofotômetro (SHIMADZU).

A coluna então foi desalinizada e regenerada através de lavagens com o tampão fosfato salino usando 20 vezes o volume da coluna que foi então armazenada em água ultrapura contendo 0,02% de azida sódica.

O material que saiu da coluna foi dialisado contra Ácido Triflouracético (TFA) 0,1% v/v em água MiliQ por 3 ciclos de 24 horas. Depois de dialisado, o material foi liofilizado e resuspendido para um volume de 25 μ l em tampão de amostra (0,06 M de Tris-HCl pH 6,8; SDS 10%; 10% de glicerol e 0,025% de azul de bromofenol, b-mercaptoetanol) para posterior análise de proteínas por eletroforese.

4.6. Análise proteômica

As amostras de fezes dos grupos G1 e grupo G2 foram submetidas à eletroforese unidimensional e bidimensional no Laboratório de Química de Proteínas, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof. Dr. Gilberto Barbosa Domont. A partir de mapas protéicos bidimensionais obtidos para cada amostra foram selecionados 32 *spots* do grupo G1 e 53 *spots* do grupo G2 para digestão com tripsina e análise por espectrometria de massa no sistema MALDI-TOF-TOF (ABI 4700) da Rede Proteômica do Rio de Janeiro. Todos os equipamentos e técnicas proteômicas estão disponíveis na Rede Proteômica do Rio de Janeiro. Na Figura 4 encontra-se um esquema da sequência de etapas realizadas para o estudo de proteômica.

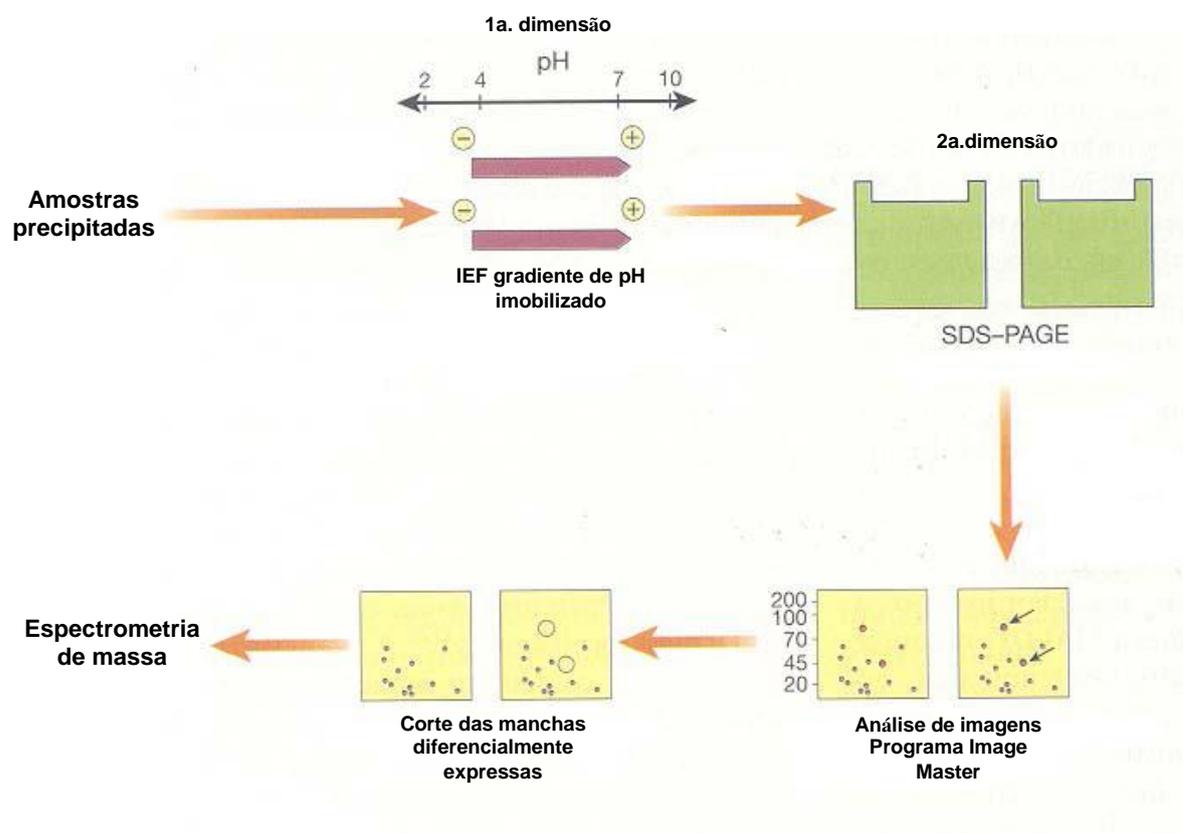


Figura 4: Representação de seqüência metodológica do estudo proteômico. [Adaptado de Pandey e Mann, 2000].

4.6.1. Avaliação das proteínas das amostras de fezes por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS-PAGE foi empregada de acordo com o método descrito por Laemmili (LAEMMILI, 1970). O gel de fracionamento (*Resolving gel*) era composto por solução de acrilamida a 15%, e o gel de concentração por solução de acrilamida a 4%. As amostras foram fervidas em tampão de amostra (desnaturante) constituído de 0,125M de Tris-HCl pH 6,8; SDS 4%; 20% de glicerol; ditioneitol (DTT) 0,2M; 0,02% de azul de bromofenol e Água

MilliQ. As corridas eletroforéticas foram realizadas no sistema de mini-gel (PROTEAN Tetra cell, BioRad Laboratories, EUA) usando fonte de tensão BIO RAD POWER PAC 3000 a 100 Volts. A separação das amostras foi visualizada através da coloração com Coomassie Blue G250.

4.6.2. Precipitação de proteínas com etanol/acetona

Às amostras foram adicionados 4 volumes de etanol para cada volume da amostra (4:1) e deixados em agitação no vortex até a solubilização completa. Posteriormente foram adicionados 4 volumes de acetona para cada volume (volume inicial) da amostra (4:1) e deixadas, novamente, em agitação no vortex. Após a solubilização, as amostras foram incubadas, overnight, a -20°C para a precipitação completa das proteínas presentes em solução. As amostras foram centrifugadas (SIGMA 2K15) a 4°C por 15 minutos a 10000g e o sobrenadante foi retirado. O pellet obtido foi lavado com 500µl da solução de Etanol: Acetona: Água Milli Q (4:4:2 v/v/v), centrifugado (SIGMA 2K15) a 4°C por 15 minutos a 10000g e o sobrenadante foi retirado. Esse processo de lavagem foi repetido por 3 vezes, sendo que na última repetição as amostras foram deixadas secar completamente na bancada.

Após a secagem completa do material, foi adicionado aos pellets 50µl de solução de solubilização Uréia 7M/ Tiouréia 2M e agitadas no vortex para solubilizar. As amostras foram centrifugadas (SIGMA 2K15) a 4°C por 10 minutos a 10000g e o sobrenadante foi colhido e utilizado para a focalização isoeletrica.

4.6.3. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA)

Foi adicionado volume suficiente de TCA 100% até que fosse alcançado um volume final que se obtivesse uma concentração de TCA a 10% para permitir a precipitação. A amostra se torna com aspecto leitoso, caso haja proteínas presentes.

O precipitado foi estocado *overnight* a 4°C. Posteriormente, foi centrifugado (SIGMA 2K15) a 10.000g por 15min e o sobrenadante descartado. O precipitado contendo as proteínas totais foi lavado com 500µl de acetona gelada e agitado até adquirir o aspecto de suspensão, momento em que o sobrenadante obtivesse uma aparência límpida, sendo em seguida centrifugado a 10.000g por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Esse processo foi repetido por 3 vezes para livrar a amostra de qualquer traço de TCA. O precipitado final foi seco a vácuo em Speed Vac® (*Savant*) e estocado para posterior processamento.

Após a secagem completa do material, foram adicionados aos pellets 50µl de solução de solubilização Uréia 7M/ Tiouréia 2M e agitadas no vortex para solubilizar. As amostras foram centrifugadas (SIGMA 2K15) a -4°C por 10 minutos a 10000g e o sobrenadante foi colhido e utilizado para a focalização isoeletrica.

4.6.4. Eletroforese bidimensional, revelação e obtenção de imagem

As amostras solubilizadas em 50µl de uréia 7M/ tiouréia 2M foram diluídas em Solução de Reidratação (Uréia 7M, Tiouréia 2M, DTT 65mM, 3-[(3-*Cholamidopropyl*)*dimethylammonio*]-1-*propanesulfonate* (CHAPS) 2% p/v, Pharmalyte 2%, IPG Buffer 0,5% e Azul de bromofenol 0,002% p/v) para um volume final de 125µl, sendo colocados 50µl da amostra e 75µl da solução de reidratação.

A Focalização isoeletrica (IEF) em gradiente de pH imobilizado (IPG) promove a separação das proteínas de acordo com seus pontos isoeletricos (pI). As amostras foram colocadas no ponto central dos sarcófagos e as tiras de 7cm, pH 3-10, foram colocadas sobre a amostra cuidadosamente de forma a impedir a formação de bolhas. As tiras foram então cobertas com óleo mineral (*Immobiline™ DryStrip Cover Fluid* – GE HealthCare) e os sarcófagos colocados no sistema Etthan™ IPGphor III™ (GE HealthCare) para reidratação ativa e focalização isoeletrica de acordo com o seguinte programa: 1º passo, 30 V por 12:00 h; 2º passo, 200 V por 1:00h; 3º passo, 500 V por 1:00h; 4º passo, 1000 V por 1:00h; 5º passo 1000 a 3500V por 30 minutos; 6º passo 3500V; 14000Vht em 20:00h.

Após a focalização as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em Solução de Equilíbrio (Tris 50mM, Glicerol 30%, Uréia 6M, SDS 2% p/v e azul de bromofenol 2% p/v) com DTT (1% p/v) por 15 minutos para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com Iodoacetamida (IAA) (3% p/v) também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Terminado o equilíbrio, após lavagem rápida no tampão de corrida para livrá-los do excesso de solução de equilíbrio, as tiras foram colocadas no topo do gel da segunda dimensão e cobertas com tampão de corrida contendo ágar 0,5%. O SDS-PAGE da segunda dimensão foi realizado em sistema vertical em mini géis 15%. A corrida transcorreu em duas etapas: uma primeira a 2,5 mA/gel durante 15 minutos e uma segunda a 15 mA/gel até que o indicador (azul de bromofenol) sair do gel.

Terminada a corrida, o gel foi fixado com etanol: ácido acético: água Milli Q (4:1:5 v/v/v), durante 1 hora e corado por Coomassie Blue G250 *overnight*. Posteriormente, os géis foram descorados com solução de ácido acético: metanol: água Milli Q (1:3:6 v/v/v) e armazenados em solução de ácido acético 5%. Os géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v.5.0 (GE HealthCare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência e detecção manual dos spots que foram excisados.

4.6.5. Seleção e processamento dos spots para espectrometria de massa

As proteínas de interesse foram cortadas dos géis bidimensionais e transferidas para tubos Eppendorfs, onde foram hidrolisadas com tripsina, de acordo com o método de Hellman e colaboradores (HELLMAN *et al.*, 1995) com algumas alterações. Os spots selecionados e numerados foram cortados em pedaços de 1mm³, totalmente descorados em solução de Bicarbonato de amônio 50mM / acetonitrila (1:1) em pelo menos 3 lavagens de 30 minutos e foram desidratados com acetonitrila 100% por 5 minutos com posterior remoção completa do solvente remanescente em concentrador de amostra *Speed Vac*[®] (Savant). Os géis foram reidratados no gelo por 15 minutos, em 15µl de solução de bicarbonato de amônio

25mM contendo 0,2µg de tripsina (*Sequencing Grade Modified Trypsin* - Promega). Pedacos do gel foram cobertos com 20µl do tampão e a digestão realizada a 37°C (banho-maria) por 16 horas. Em seguida a solução contendo os peptídeos extraídos do gel com solução acetonitrila 50%/ TFA 5% em água foram concentrados até a secagem completa em *Speed Vac®* (*Savant*) (JUNQUEIRA, 2005).

4.6.6. Espectrometria de massa (SHEVCHENKO *et al.*, 1996)

A espectrometria de massa (MS) é ferramenta altamente sensível e capaz de analisar moléculas maiores e menores. Esta técnica é baseada na determinação precisa da relação massa-carga (m/z) de íons em fase gasosa. Os íons são gerados pelo ganho ou perda de uma carga (elétron ejeção, protonação ou desprotonação). Uma vez que os íons são formados eles podem ser separados de acordo com a relação m/z e posteriormente detectados (SIUZDAK, 1996).

A solução de peptídeos da digestão tríptica é misturada na placa de MALDI 1:1 com solução de etanol, acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,3% (1:1:1) saturada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico 0,7% (0,4µL de cada solução). A mistura é seca a temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa. Os espectros de massa foram obtidos no equipamento ABI 4700 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems) no modo interativo, com as amostras analisadas, automaticamente, no modo refletor MS sendo os sete picos mais intensos submetidos à análise por MS/MS em célula de colisão configurada para 1 kV em pressão de 1×10^{-6} torr em presença de gás atmosférico.

4.6.7. Análise dos resultados

Os espectros provenientes de análises combinadas da espectrometria de massas (MS e MS/MS) foram filtrados pela relação sinal / ruído dos picos, que foi de 20 para os dados de MS e 10 para MS/MS.

Esses espectros foram levados à busca para comparação por homologia de massa de peptídeo e seqüência de aminoácidos em bancos de dados de proteínas não redundantes do NCBI (*National Center for Biotechnology Information/ www.ncbi.nlm.nih.gov/NCBI/nr*) de todos os grupos taxonômicos e somente para proteínas humanas (*Homo sapiens*), empregando o *software* da interface MASCOT disponível on-line (*Matrix Science Ltd.*), que utiliza algoritmo a fim de testar a significância estatística das identificações.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1. Avaliação de IgA anti- *T. gondii* em amostras de fezes com a utilização do kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur)

A avaliação de IgA anti-*T. gondii* nas amostras de fezes foi feita com a utilização do kit Platelia™ Toxo IgA TMB (Diagnostic Pasteur). A legenda dos códigos encontra-se na Tabela 1 no item 4.1.

As análises das amostras de fezes foram realizadas em dois momentos: 1º momento em 26 de janeiro de 2006 e o 2º momento em 15 de junho de 2008. Em ambos os ensaios as amostras foram diluídas na proporção 1:50.

Para avaliar a especificidade de ligação das amostras de fezes pelo kit Platelia™ Toxo IgA TMB foi incluído um ponto experimental controle que consistiu na avaliação direta do reconhecimento da amostra com o anticorpo monoclonal. Este controle foi denominado controle amostra-conjugado. Os resultados referentes a este ensaio estão apresentados na Tabela 3. A alta reatividade apresentada por algumas amostras de fezes não é comumente encontrada em testes de ELISA convencionais.

Percebemos que apesar de uma leve variação entre os resultados obtidos nos dois testes as amostras apresentaram o mesmo perfil de reatividade nos dois momentos, tanto para o teste convencional quanto para o controle amostra-conjugado.

Tabela 3: Reatividade de anticorpos IgA anti-*T gondii* pelo kit Platelia™ Toxo IgA TMB em amostras de fezes processadas para a extração de imunoglobulinas.

AMOSTRA	ELISA			
	ELISA 1º Momento ¹		ELISA 2º Momento ²	
	Convencional	Controle Amostra-Conjugado	Convencional	Controle Amostra-Conjugado
MF0071	1, 514	0, 322	1, 7265	0, 4333
MF0072	1, 754	3, 765	1, 287	2, 9431
MF0081	2, 319	2,230	2, 116	1, 7462
MF0082	2, 489	0, 663	1, 792	0, 6564
MF0101	1, 628	5, 699	0, 917	2, 3107
MF0111 *	2,570	0,790	1, 571	1, 4398
MF0111 ⁺	n.a.	n.a.	1, 919	0, 9147
MF0112 *	3, 524	5, 534	2, 440	4, 3501
MF0112 ⁺	n. a.	n.a.	1, 652	0, 5055
MF0121	2, 661	0, 382	1,930	0, 5011
MF0141	1, 858	0, 509	2, 155	0, 7024
MF0151	1, 678	0, 324	2, 166	0, 4092
MF0161	n.a.	n.a.	1, 980	0, 4486
MF0162	n.a.	n.a.	1, 540	0, 4770
MF0163	n.a.	n.a.	1, 790	0, 6105
MF0171	n.a.	n.a.	1, 302	0, 3217

¹ 1º experimento realizado em 26 de Janeiro de 2006

² 2º experimento realizado em 15 de Junho de 2008

* Amostra coletada em 26 de Janeiro de 2006

⁺ Amostra coletada em 15 de Junho de 2008

n.a. Amostra não analisada nesse experimento

As amostras MF0111 e MF0112 apresentaram resultados diferentes entre os tempos avaliados. Os valores obtidos para essas amostras no teste convencional e no controle amostra-conjugado foram, respectivamente, 1,571 e 1,4398 para MF0111 e 2,440 e 4,3501 para MF0112. Em junho de 2008, as amostras, MF0111 e MF0112, foram coletadas novamente e sua reatividade foi comparada com as respectivas amostras do primeiro momento. Essas duas novas amostras tiveram resultado negativo para o controle amostra-conjugado, obtendo os valores de 0,9147 e 0,5055, para MF0111 e MF0112, respectivamente. Essas amostras serão avaliadas em outro estudo separadamente.

5.2. Avaliação das amostras de fezes por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-SDS

As amostras provenientes de material fecal tiveram suas proteínas dosadas pelo método de Bradford e foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% para averiguar seu perfil eletroforético. A Figura 5 mostra o gel contendo as amostras. Como controle foi utilizado o padrão de peso molecular DALTON Marck® (SIGMA), representado na raia 1. Alíquotas de 20 μ l de amostra foram diluídas em 10 μ l de tampão de amostra (0,06M de Tris-HCl pH 6,8; SDS 10%; 5% de β -mercaptoetanol; 10% de glicerol, 0,025% de azul de bromofenol).

Observa-se na Figura 5 que as amostras de fezes apresentam bandejamento distinto entre elas, não apresentando um perfil que possa ser afirmado como característico do material fecal, mesmo após o tratamento a que foram submetidas (MANGIAVACCHI, 2006). Algumas amostras apresentaram uma banda correspondente à cadeia leve de 25 KDa mais intensas do que outras. Outras bandas aparecem no gel, o que era esperado.

As amostras MF0111 e MF0112 tiveram mudança no perfil de bandejamento SDS-PAGE. Comparado o primeiro e segundo momento de coleta para cada uma

das amostras vemos que tanto MF0111 quanto MF0112 tiveram uma diminuição no número de bandas identificadas no gel, e principalmente, na região de 25 KDa (Figura 5 – caixa).

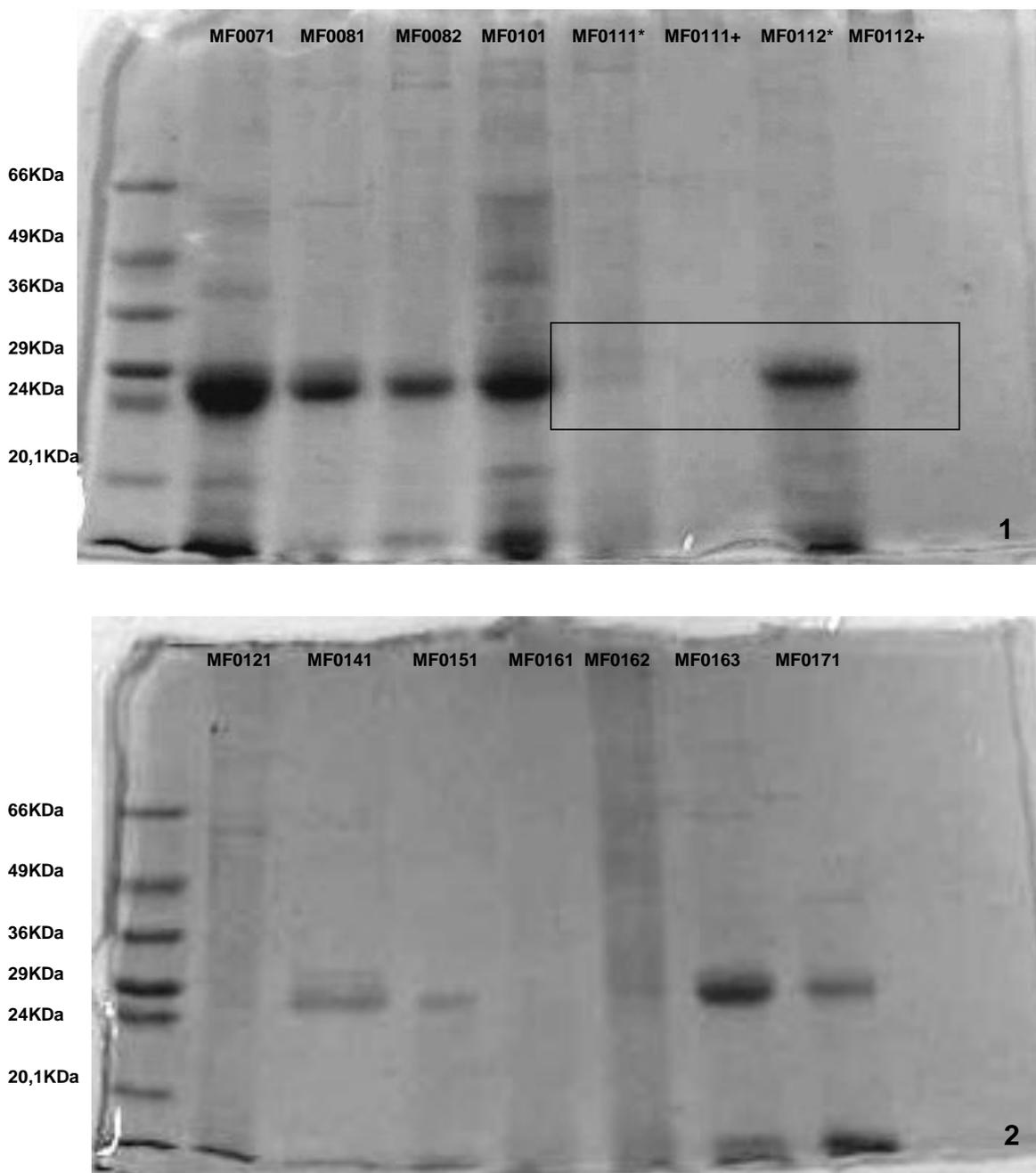


Figura 5: Fracionamento de proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras de fezes. No gel 1: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, amostra de fezes (MF0071, MF0081, MF0082, MF0101, MF0111*, MF0111+, MF0112*, MF0112+); No gel 2: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, Amostras de fezes (MF0121, MF0141, MF0151, MF0161, MF0162, MF0163, MF0171). Caixa destaque: Amostras MF0111*, MF0111+, MF0112*, MF0112+

5.3. Avaliação das amostras dos grupos G1 e G2 por eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida-SDS

Visto que as amostras de fezes tiveram perfis diferenciados de bandeamento protéico no SDS-PAGE e de reatividade de anticorpos pelo teste de ELISA, decidimos por agrupar essas amostras com características similares, conforme descrito no item 4.2.2., formando um pool de proteínas para podermos comparar o perfil de bandeamento dessas amostras, agora, dentro dos grupos.

Os grupos de amostras foram liofilizados para concentrar as proteínas presentes nas mesmas, no menor volume possível (1,5ml) suas proteínas foram dosadas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). As amostras dos grupos G1 e G2 foram analisadas em gel de poliacrilamida 12% para averiguar o perfil eletroforético. A Figura 6 mostra o gel contendo tais amostras.

Como controle foi utilizada amostra padrão de peso molecular DALTON Marck® (SIGMA), representado na canaleta 1. Observa-se na Figura 6 que as amostras apresentaram bandeamento distinto. Duas bandas, provavelmente correspondentes à cadeia leve e a cadeia pesada da imunoglobulina, de 25KDa e 50KDa respectivamente (Figura 6 – setas), também foram identificadas. No entanto, podemos perceber que elas são relativamente mais intensas na amostra do grupo G2 do que no G1, o que era esperado visto que as amostras deveriam apresentar um perfil de bandeamento dentro do grupo similar ao que possuíam individualmente.

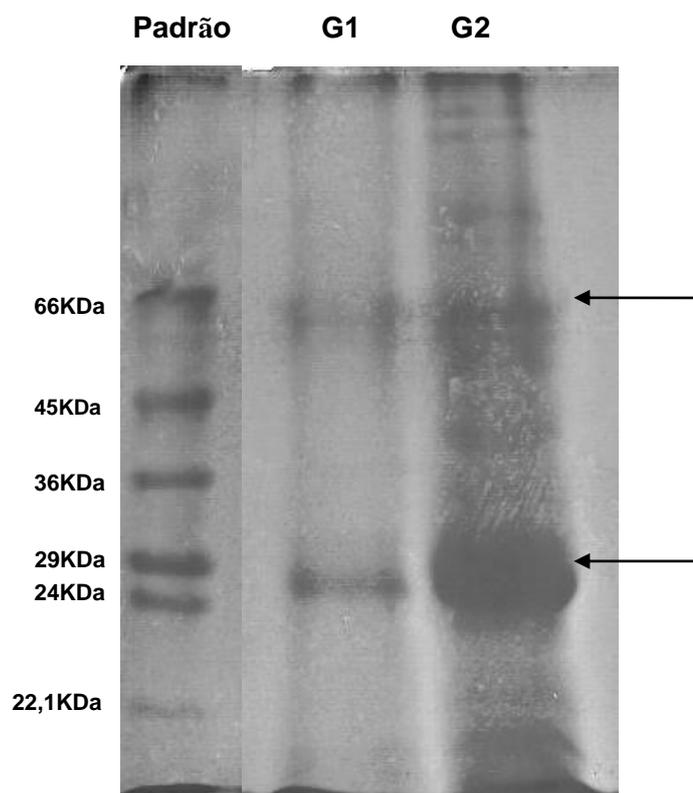


Figura 6: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras do grupo G1 e G2. No gel: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, amostra do grupo G1, amostra do grupo G2. Setas: bandas de 50 e 25 KDa, respectivamente.

5.4. Purificação de IgAs por cromatografia de afinidade em coluna de jacalina

Devido à amostra do grupo G2 apresentar bandas mais intensas na região onde provavelmente se encontram as cadeias, leve e pesada, das imunoglobulinas, decidimos purificar essas cadeias por cromatografia de afinidade utilizando a coluna de jacalina.

A Jacalina é uma lectina ligadora de α -D-galactose, extraída da semente de *Artocarpus integrifolia*. Esta lectina é uma glicoproteína de aproximadamente 40 KDa composta por quatro subunidades idênticas. A jacalina imobilizada em suportes de agarose tem sido utilizada comumente na purificação de IgA1 secretória e do soro humano. A IgA pode ser separada da IgM e IgG humana do soro e colostro.

Foram coletados 13 tubos contendo 300 μ l de material eluído da coluna e as leituras de absorbância foram plotadas em gráfico (Gráfico 1). Os tubos correspondentes aos picos 3 e 4, que foram os que apresentaram os maiores valores de absorbância, foram selecionados.

O material eluído da coluna, presente nos tubos 3 e 4, foi colocado em um único tubo eppendorf®, liofilizado e ressuspendido para o volume de 25 μ l de tampão de amostra redutor SDS para avaliar o perfil eletroforético das proteínas.

O material que não se ligou a coluna de jacalina também foi guardado para a avaliação do perfil eletroforético de suas proteínas.

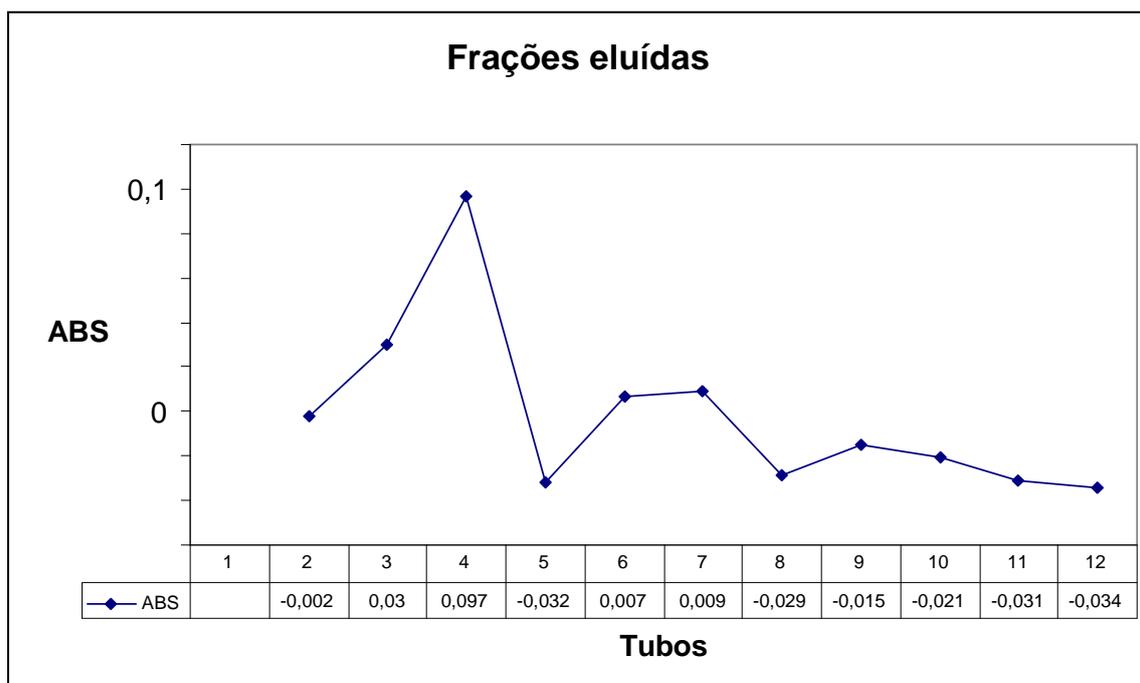


Gráfico 1: Absorbância das frações eluídas da coluna de jacalina.

5.5. Eletroforese unidimensional do material não adsorvido e purificado (IgA) do grupo G2 através de coluna de jacalina

O material não adsorvido e o purificado da coluna foi analisado em gel de poliacrilamida 12% para averiguar a presença de imunoglobulinas.

A Figura 7 mostra o gel contendo o material não adsorvido à coluna. Como controle foi utilizada amostra padrão de peso molecular DALTON Marck® (SIGMA) sendo apresentada na canaleta 1. Na figura pode ser observada uma banda de aproximadamente 25 KDa, (Figura 7 – seta) indicando ser cadeia leve de imunoglobulina que não se liga a coluna de jacalina.

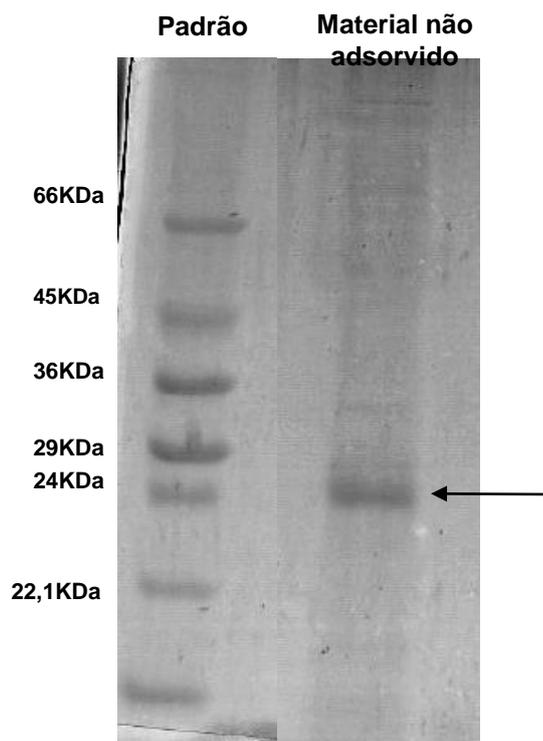


Figura 7: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes no material não adsorvido a coluna de jacalina. No gel: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 10 μ l da amostra não adsorvida a coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS. Seta: banda de 25 KDa.

A Figura 8 mostra o gel contendo a amostra do material eluído da coluna de jacalina. Como controle foi utilizada amostra padrão de peso molecular DALTON Marck® (SIGMA) sendo apresentada na canaleta 1. A amostra retirada da coluna ressuspensa em tampão de amostra foi dividida da seguinte forma: na canaleta 2 foram colocados 1/3 do volume total de amostra (8 μ l) e na canaleta 3 foram colocados 2/3 do volume total de amostra (16 μ l). Observa-se na figura 8 que as duas amostras apresentam bandejamento similar. São observadas duas bandas de aproximadamente 65 e 50 KDa (Figura 8 – setas), o que também era esperado, sendo provavelmente a cadeia pesada da imunoglobulina (porção Fc) que se ligou a jacalina.

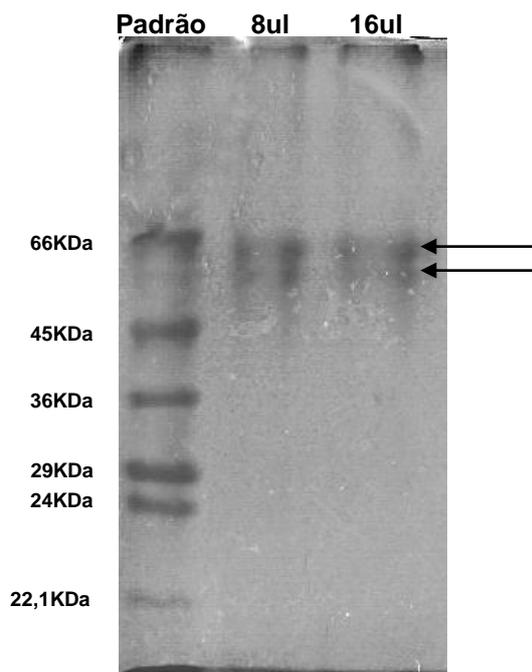


Figura 8: Separação das proteínas por SDS-PAGE presentes no material eluído da coluna de jacalina. No gel: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 8 μ l da amostra eluída da coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS, 16 μ l da amostra eluída da coluna em tampão de amostra redutor-SDS. Seta: bandas de 50 e 65 KDa

5.6. Análise proteômica

5.6.1. Determinação das regiões nos géis unidimensionais para o sequenciamento de proteínas por espectrometria de massa

Para confirmar nossas suspeitas sobre a presença de imunoglobulinas no material fecal dos grupos avaliados e se o método de purificação em coluna de jacalina foi eficiente, os três géis (Figura 9) foram enviados ao Laboratório de Química da UFRJ, sob a orientação do Prof. Gilberto Domont, para a identificação de proteínas presentes nas regiões de interesse marcadas em cada gel. As regiões

foram determinadas baseadas na intensidade das mesmas no gel, visando, principalmente a identificação das imunoglobulinas que, sabidamente, estavam presentes nas amostras de material fecal (resultado que foi comprovado pelo teste de ELISA descrito no item 5.1).

O gel 1 (Figura 9) continha apenas a amostra do grupo G2 e desse gel foram selecionados 9 regiões onde supostamente estariam presentes as cadeias de imunoglobulinas, cadeias leves e pesadas, sendo 6 regiões na faixa de 25-30 KDa, 1 região na faixa de 50KDa e 3 regiões de proteínas de alto peso molecular que apresentaram um bandeamento mais intenso.

O gel 2 (Figura 9) continha o material não adsorvido a coluna de jacalina e desse gel foi selecionado a única região de 25 KDa.

O gel 3 (Figura 9) continha o material eluído da coluna de jacalina e desse gel foram selecionados 3 regiões na faixa de 50-65KDa.

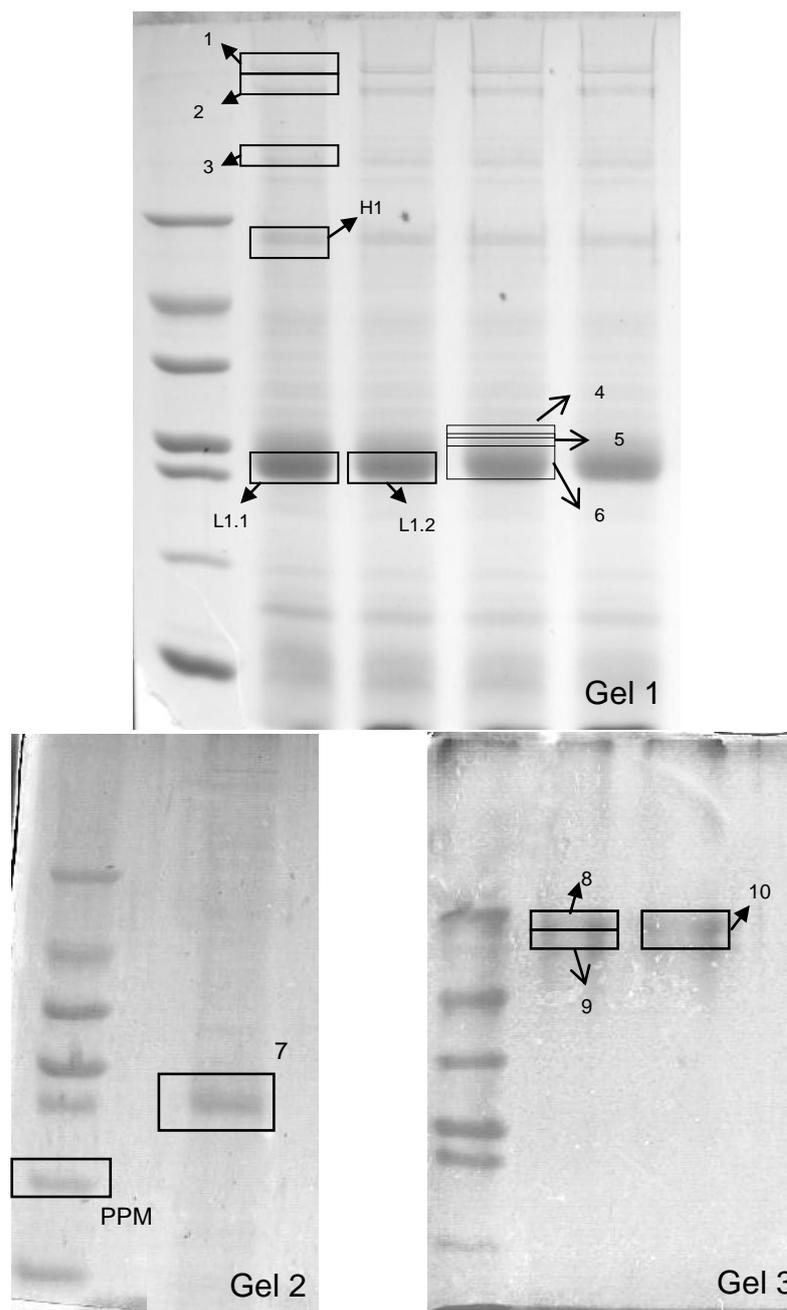


Figura 9: Fracionamento das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras do grupo G2. No gel 1: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 20ul da amostra do grupo G2 diluída em tampão de amostra redutor-SDS; No gel 2: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 10 μ l da amostra G2 não adsorvida a coluna de jacalina diluída em tampão de amostra redutor-SDS; No gel 3: Amostra padrão de peso molecular DALTON Marck®, 8ul da amostra eluída da coluna diluída em tampão de amostra redutor-SDS, 16ul da amostra eluída da coluna em tampão de amostra redutor-SDS. Os spots analisados por espectrometria de massa estão numerados.

5.6.2. Identificação de proteínas da amostra do grupo G2, extraídas do gel unidimensional, por espectrometria de massa

As regiões escolhidas dos géis unidimensionais foram submetidas à digestão trípica e espectrometria de massas. As regiões foram excisadas dos géis, digeridas com tripsina e analisadas em um espectrômetro de massa MALDI-TOF-TOF. Os dados obtidos após o processamento de todos os *spots* foram pesquisados no banco de dados NCBI onde a partir de um espectro de massa, a busca resulta numa lista de proteínas candidatas contendo variadas informações incluindo um valor numérico que determina se a identificação é confiável ou não (*Mowse score*).

Na tabela 4 estão listadas as proteínas identificadas, bem como as massas moleculares de cada região, o *protein score* e o *ion score* de cada identificação e as descrições das proteínas.

Tabela 4: Lista das proteínas das regiões escolhidas para o seqüenciamento identificadas por MS/MS.

Banda	MW (KDa)	Prot Score/ Ion Score	Descrição das proteínas ordenadas por grupo
Enzimas			
PPM*	24.3	227/123	trypsin inhibitor subtype A [Glycine max]
H1	57.1	84/61	intestinal alkaline phosphatase precursor [Homo sapiens]
1	211	103/97	maltase-glucoamylase [Homo sapiens]
2	211	66/40	maltase-glucoamylase [Homo sapiens]
Cadeia leve de Imunoglobulina			
L1.1	23.6	106/57	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
L1.2	23.6	68/48	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
4	23.6	50/	immunoglobulin kappa light chain
5	23.4	128/71	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
6	28,9	92/69	immunoglobulin kappa light chain VLJ region
7	23.6	95/63	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
Queratina			
8	66.1	428/188	Keratin 1 [Homo sapiens]
9	59	321/106	Keratin 10 [Homo sapiens]
10	59	347/119	Keratin 10 [Homo sapiens]

* Padrão de peso molecular

Das 14 regiões avaliadas, 13 proteínas foram identificadas, sendo estas separadas em 3 grupos de proteínas diferentes: enzimas, cadeia leve de imunoglobulina e queratina (Tabela 4).

Visto que os resultados da identificação das proteínas não alcançaram as nossas expectativas quanto a identificação de imunoglobulinas inteiras (cadeia leve e pesada), decidimos então realizar novos experimentos utilizando a técnica de eletroforese bidimensional, juntamente com etapas de precipitação das amostras, com objetivo de avaliar melhor a possibilidade de se encontrar proteínas íntegras presentes nos grupos G1 e G2.

5.6.3. Precipitação de proteínas com etanol/acetona das amostras dos grupos G1 e G2, eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem

As amostras dos grupos G1 e G2 tiveram suas proteínas dosadas novamente pelo método de Bradford e foram submetidas à corrida unidimensional em gel de poliacrilamida 15%, sendo colocadas 20µg de proteína de cada amostra nas respectivas canaletas do gel. O volume de amostra e de tampão aplicado no gel foi calculado para um total de 25µl por canaleta.

O gel foi submetido a uma corrida de 10mA até sair do *resolving gel* e 15mA até a saída do *front* do gel. O gel foi fixado em solução fixadora contendo Ácido Acético:Metanol:Água MilliQ por 1 hora e depois colocada em Comassie Blue G250. A imagem do gel encontra-se na Figura 10.

Na Figura 10 podemos ver que o bandeamento de proteínas do grupo G2 é muito mais rico que do grupo G1, podendo-se identificar 8 bandas (setas) de maior intensidade no grupo G2 e 4 bandas (setas) no grupo G1.

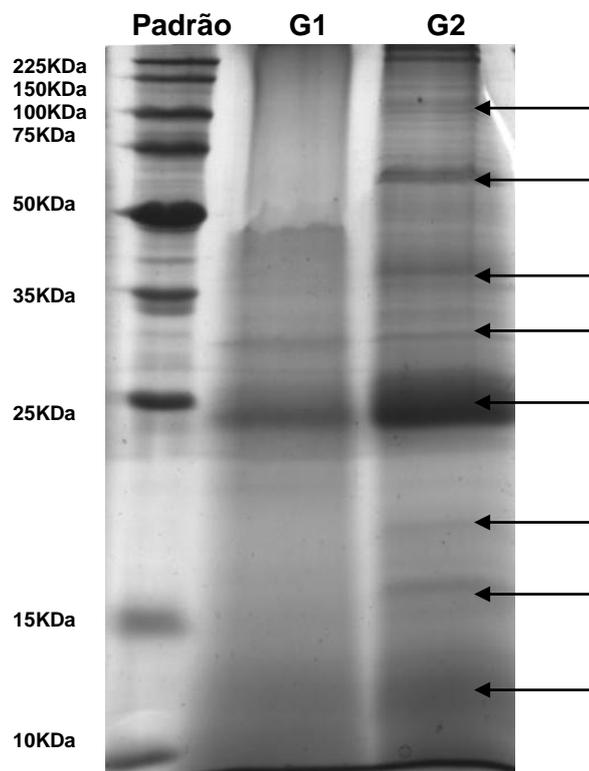


Figura 10: Separação das proteínas por SDS-PAGE presentes nas amostras de fezes. No gel (da esquerda para direita): Padrão de peso molecular PROMEGA; 20 μ g da amostra de fezes G1; 20 μ g da amostra de fezes G2. Setas: bandas mais intensas identificadas entre os grupos.

Visto que as amostras apresentaram um arraste durante o SDS-PAGE, decidimos submeter essas amostras a um processo de precipitação em etanol/acetona. Nesse processo a utilização de solventes orgânicos, como o etanol e a acetona, promove o sequestro das moléculas de água presentes na solução auxiliando assim a precipitação das proteínas. A solubilidade das proteínas em solventes orgânicos é menor do que em água e com isso as proteínas precipitam. Um volume equivalente à 50 μ g de proteína de cada amostra, G1 e G2, foi utilizado para fazer essa etapa de precipitação.

Após a precipitação, o sobrenadante recuperado de cada amostra foi utilizado para a eletroforese bidimensional. Esses géis foram escaneados utilizando-se o programa LabScan v5.0 (GEHealthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência, com detecção manual dos *spots* que foram excisados. As imagens obtidas dos géis estão nas Figuras 11 e 12.

Na Figura 11 encontra-se o perfil bidimensional da amostra G1 onde podemos ver que as proteínas na faixa de pI 3 não foram separadas com eficiência. Verificamos a presença de 3 grupos de proteínas nessa amostra: um grupo formado por proteínas de pI entre 5-7 e de peso molecular entre 35-75 KDa, um grupo de proteínas de baixo peso molecular com pI entre 5-7 e uma faixa de proteínas na região de 25-30 KDa com pI entre 4-8. Ainda verificamos a presença de um arraste no final do gel formado por proteínas com pH próximo a 10 (Figura 11) .

Na Figura 12 encontra-se o perfil bidimensional da amostra G2 onde podemos verificar também a presença de proteínas ácidas que não foram separadas, igual ao G1, porém podemos verificar a presença de mais pontos protéicos quando comparado ao G1, sendo possível visualizar pontos protéicos na faixa de 10-100 KDa e com pH entre 5-9, com um grupo protéico mais intenso na faixa de 25-30 KDa com pH variando entre 4-8. Os pontos protéicos presentes na faixa de 25-30 KDa, onde provavelmente se encontram a cadeia leve da imunoglobulina, apresentam valores de pI entre 4 e 9, corroborando com os dados da literatura (PRIN *et al.*, 1995).

Ambos os resultados confirmam a separação ocorrida no gel unidimensional, apresentando o mesmo grupo de amostra nas mesmas regiões de peso molecular (Figura 10).

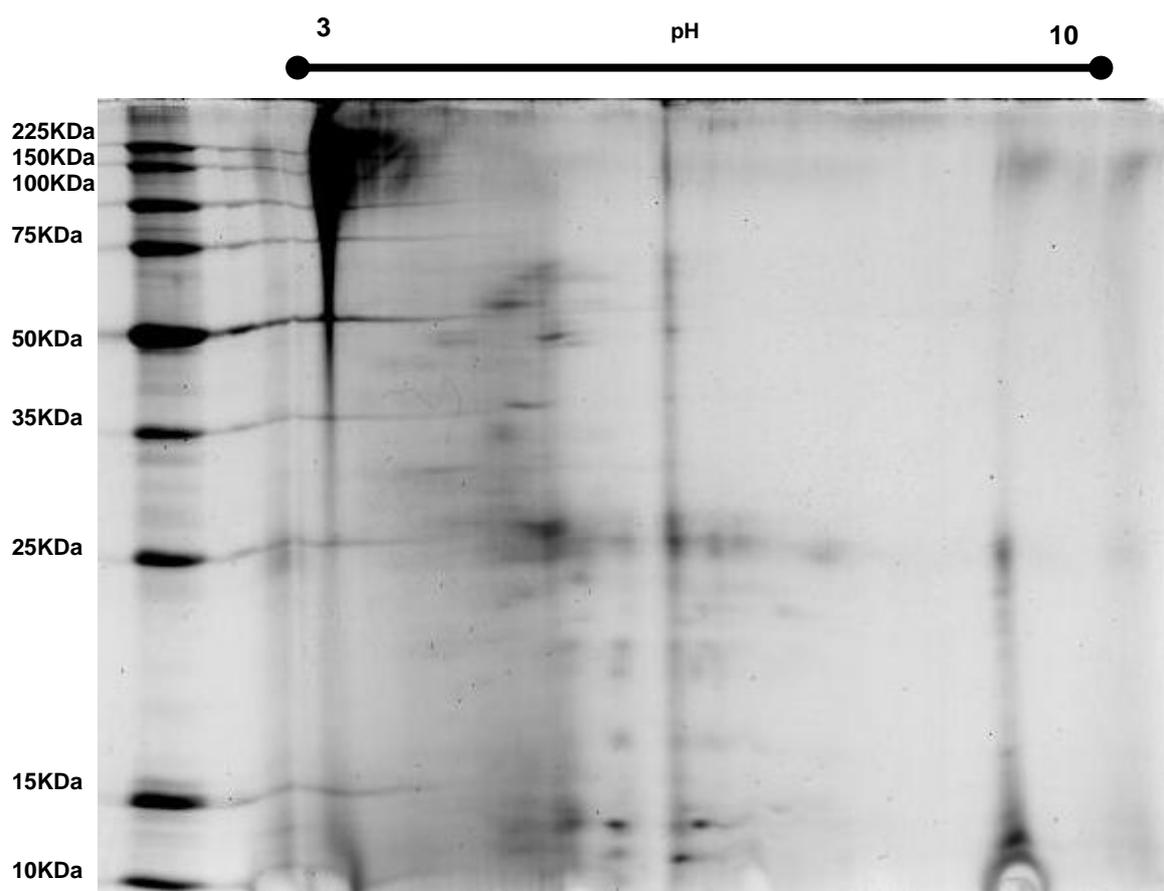


Figura 11: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.

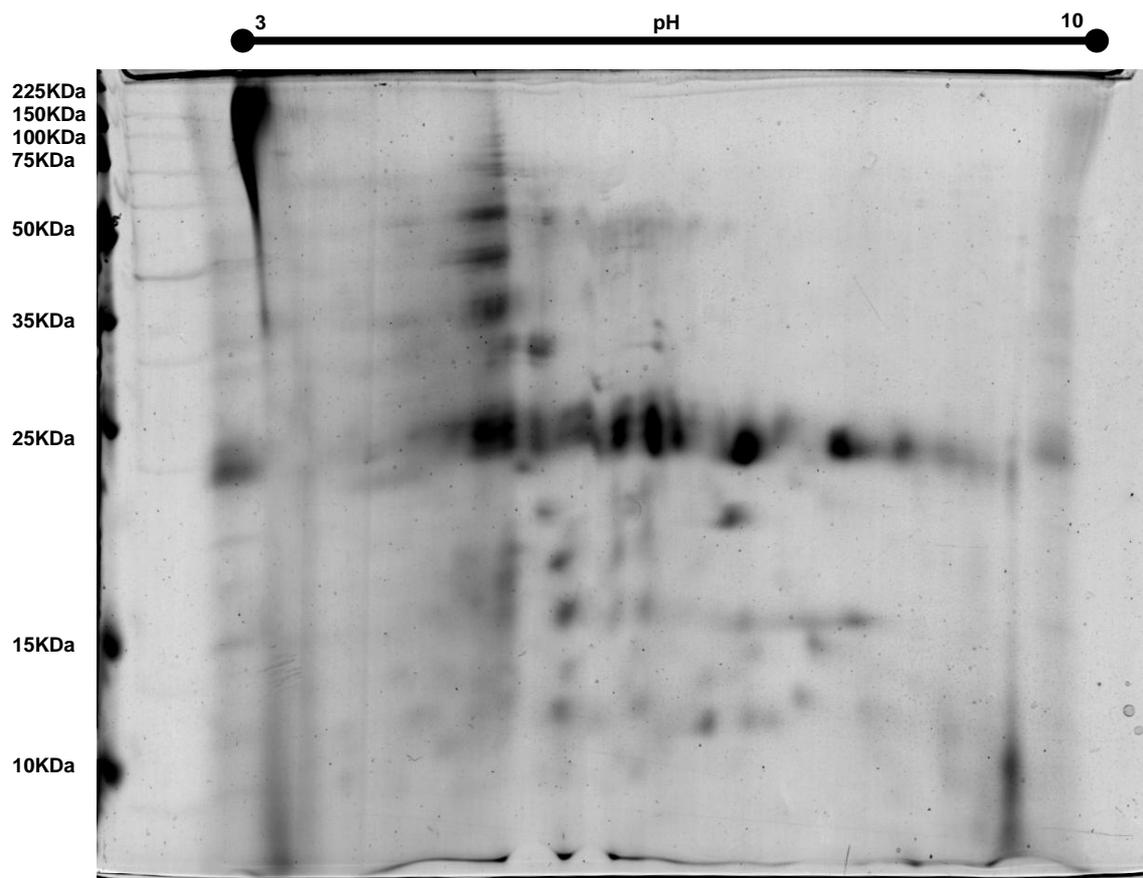


Figura 12: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G2 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.

5.6.4. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA) da amostra do grupo G1, eletroforese bidimensional, revelação e análise da imagem

Como o gel bidimensional da amostra do grupo 1 não mostrou uma boa separação das proteínas decidiu-se utilizar a precipitação com o ácido tricloroacético (TCA -MP Biomedicals LLC).

Foi adicionado volume suficiente de TCA 100% à amostra do grupo 1, contendo 50µg de proteínas, até que fosse alcançada a concentração de TCA de 10%.

O gel foi escaneado utilizando-se o programa LabScan v. 5.0 (GEHealthcare) no ImageScanner (Amersham Biosciences) com sistema integrado de transparência e detecção dos spots que foram manualmente excisados.

Na Figura 13 encontra-se o perfil bidimensional da amostra G1 precipitada com TCA e verificamos que a presença de proteínas de alto peso molecular e de pl ácido diminuiu consideravelmente quando comparado com o método de precipitação com etanol/acetona realizado na mesma amostra (Figura 11). Podemos ver na figura 13 a presença de pontos protéicos na faixa que vai de 10 a 150 KDa e com pH variando entre 3-5, apresentando um grupo protéico mais intenso presente na faixa de 25-30 KDa com pH variando entre 4 e 8.

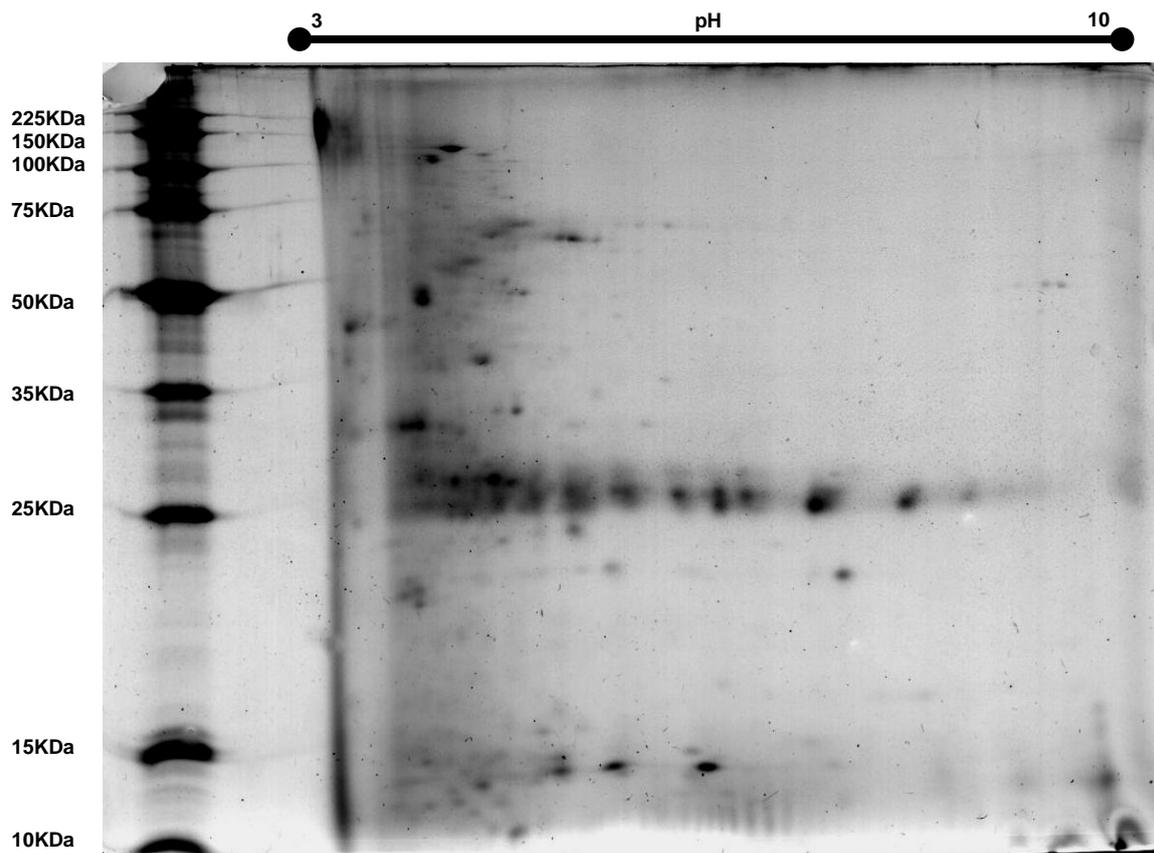


Figura 13: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo 1 precipitada com TCA/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue.

5.6.5. Seleção e processamento dos *spots* para espectrometria de massa

As proteínas de interesse foram cortadas dos géis bidimensionais e transferidas para tubos Eppendorfs, onde foram hidrolisadas com tripsina, de acordo com o método de Hellman e colaboradores (HELLMAN *et al.*, 1995) com algumas alterações.

No total foram selecionados 53 *spots* da amostra do grupo G2 precipitada com etanol/acetona, 11 *spots* da amostra do grupo G1 precipitada com etanol/acetona e 22 *spots* da amostra do grupo G1 precipitada com TCA. Para a seleção dos *spots* decidiu-se por escolher aqueles de maior intensidade, sem nenhum método pré-determinante para tal, visto que não há nenhum tipo de referência na literatura para esse tipo de material. Os *spots* selecionados manualmente e numerados encontram-se nas Figuras 14, 15 e 16.

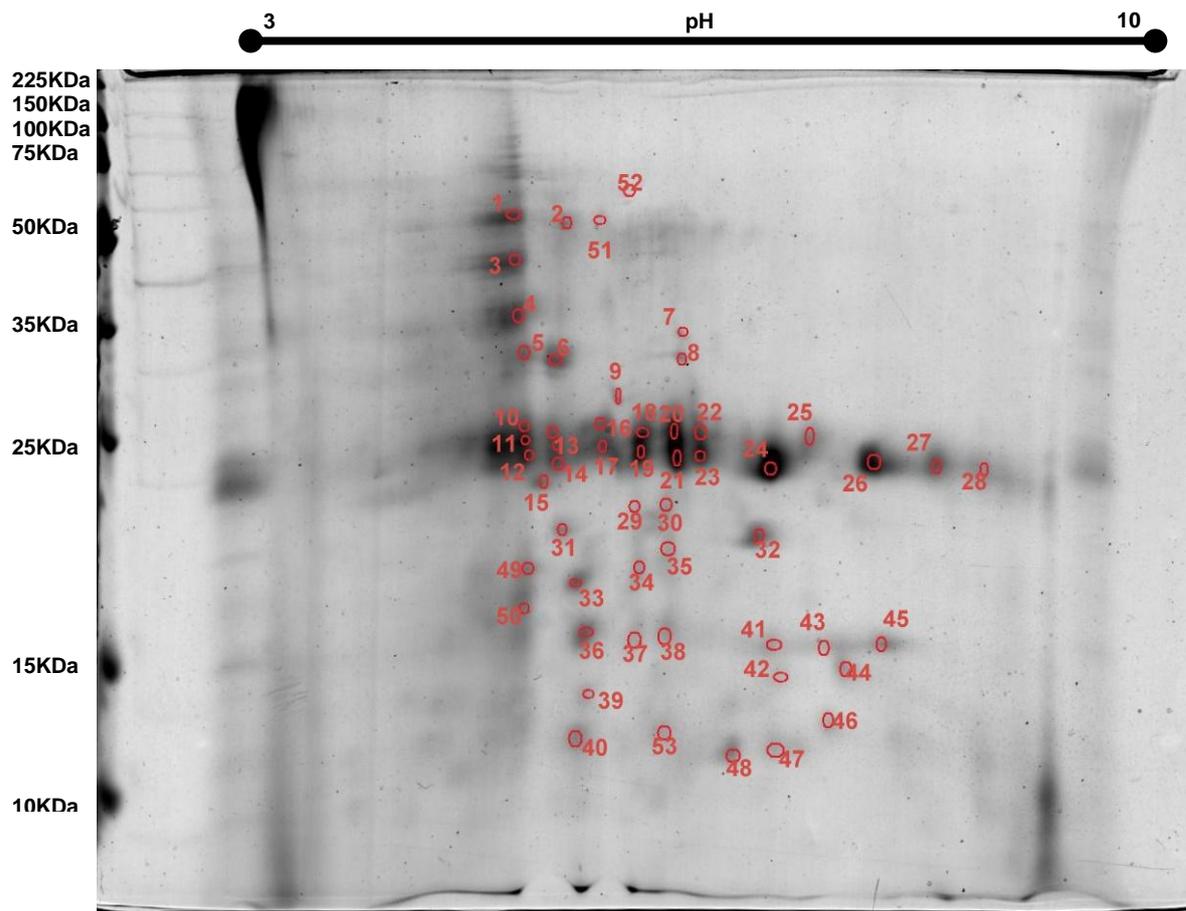


Figura 14: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G2 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os spots analisados por espectrometria de massa estão numerados.

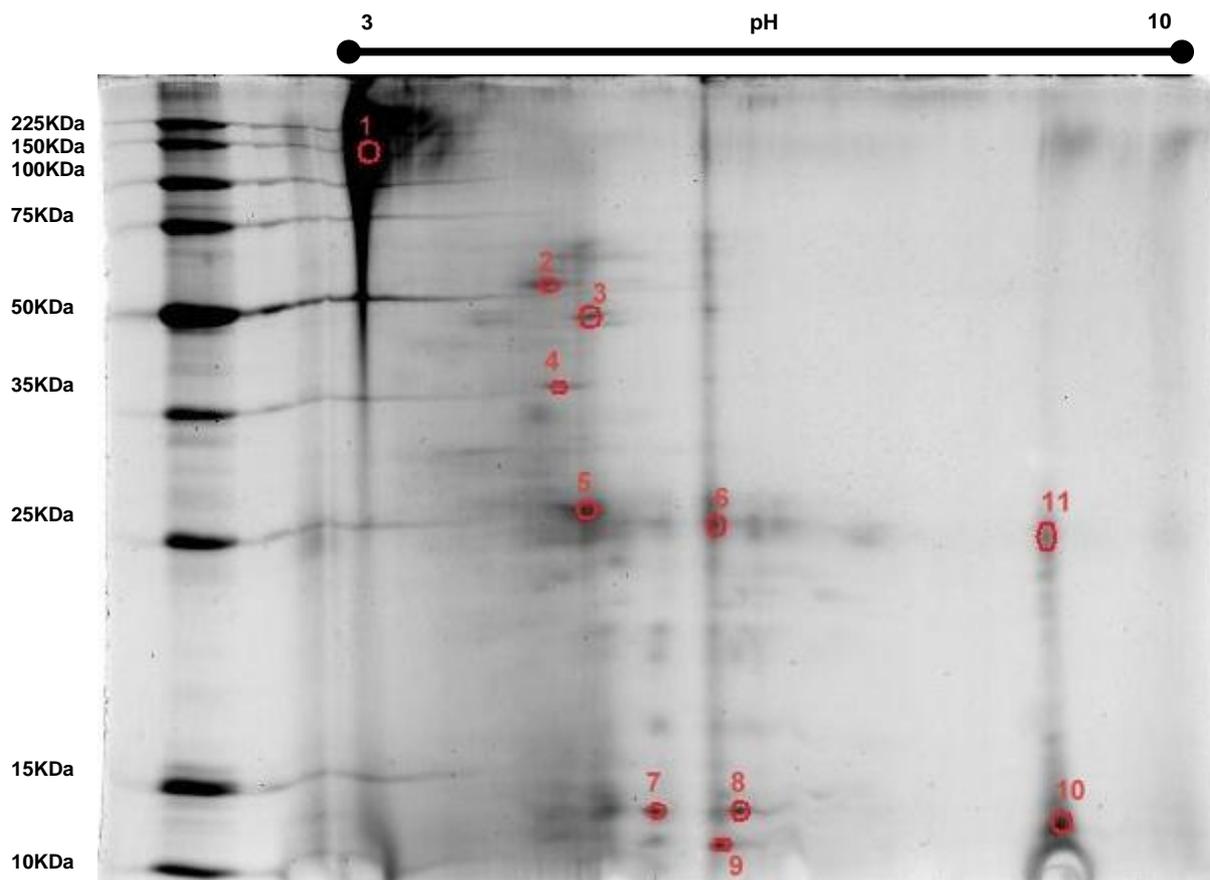


Figura 15: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com etanol/acetona. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os spots analisados por espectrometria de massa estão numerados.

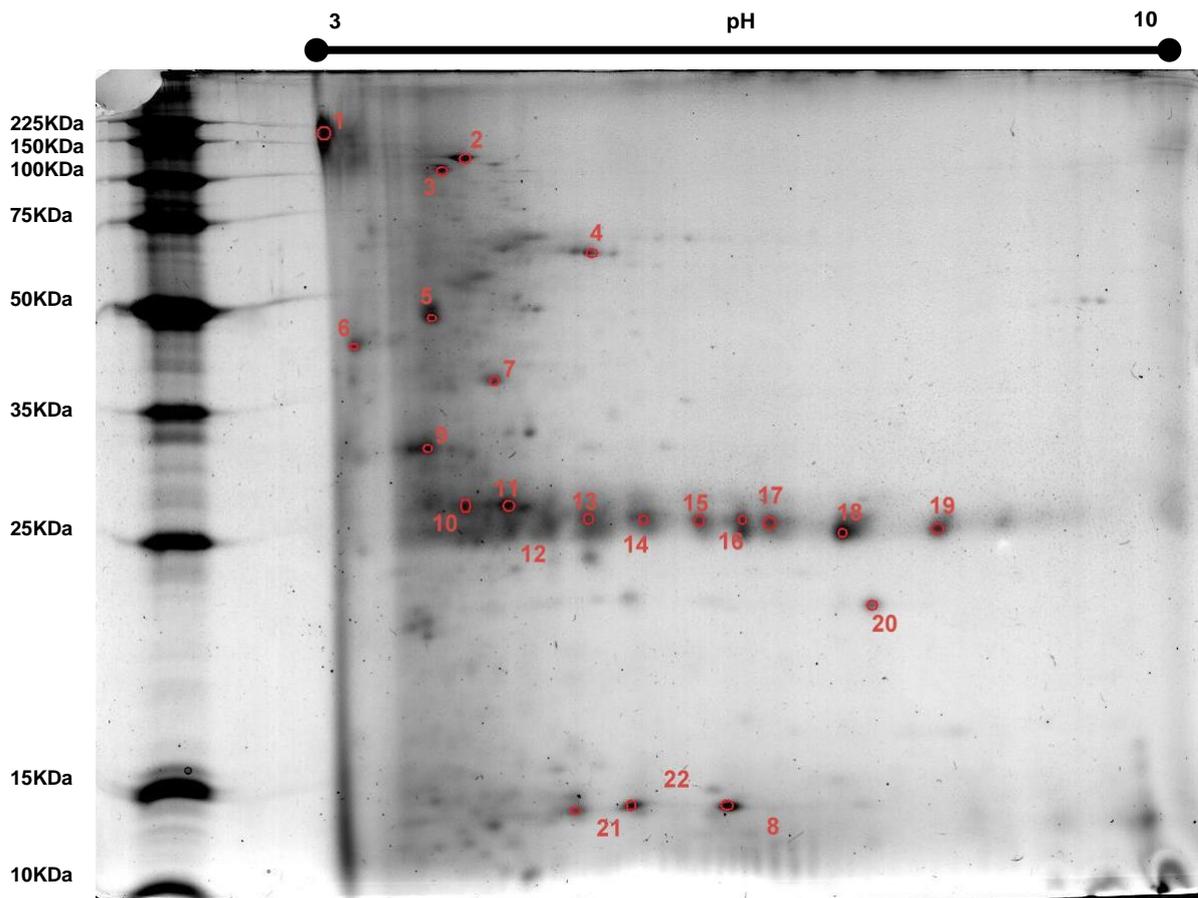


Figura 16: Perfil bidimensional da amostra de fezes do grupo G1 precipitada com TCA. As proteínas foram separadas na primeira dimensão utilizando tiras de IPG na faixa de 3-10. A quantidade de proteína aplicada foi de 50 μ g; após a eletroforese na segunda dimensão, os géis foram corados com Coomassie brillante blue. Os *spots* analisados por espectrometria de massa estão numerados.

5.6.6. Identificação de proteínas da amostra do grupo G1 e G2 por espectrometria de massa MALDI TOF-TOF

Os dados obtidos após o processamento de todos os *spots* foram pesquisados no banco de dados NCBI para todos os grupos taxonômicos e alguns para o grupo taxonômico *Homo sapiens* (Tabela 5).

Dos 3 géis avaliados, a amostra do grupo G2 precipitada com Etanol/Acetona, a amostra do grupo G1 precipitada com Etanol/Acetona e a amostra do grupo G1 precipitada com TCA, somente a primeira amostra obteve resultados significantes na pesquisa no banco de dados do NCBI, tanto para todas as espécies, como somente no banco de dados *Homo sapiens*.

Na Tabela 5 estão listadas as proteínas identificadas na amostra do grupo G2, bem como as massas moleculares e os pI, teóricos e experimentais, de cada *spot*, o *protein score* e o *ion score* de cada identificação e as descrições das proteínas.

Tabela 5: Identificação das proteínas por MS/MS dos *spots* selecionados no gel do grupo 2 precipitado com Etanol/Acetona.

Spot*	Prot Score	MW (KDa) / pI		Descrição das proteínas ordenadas por grupos
		Teórico	Exp.	
<i>Proteína Ligadora da porção Fc de imunoglobulina</i>				
1*	37	63.9/5.0	46.5/5.1	PREDICTED: similar to Fc fragment of IgG binding protein [Homo sapiens]
6	96	31.4/5.1	32.4/5.61	Human Fc gamma BP [AA 1-2843] [Homo sapiens]
<i>Cadeia Leve de Imunoglobulina</i>				
12	100	23.5/5.7	24.3/5.17	immunoglobulin kappa 1 light chain [Homo sapiens]
20	139	29.4/6.1	26/6.57	immunoglobulin kappa light chain VLJ region [Homo sapiens]
21	122	23.6/6.9	24.8/6.5	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
23	128	26.1/5.7	25.4/6.7	kappa 1 immunoglobulin light chain [Homo sapiens]

* Originados do gel bidimensional da amostra do grupo G2 – figura 15

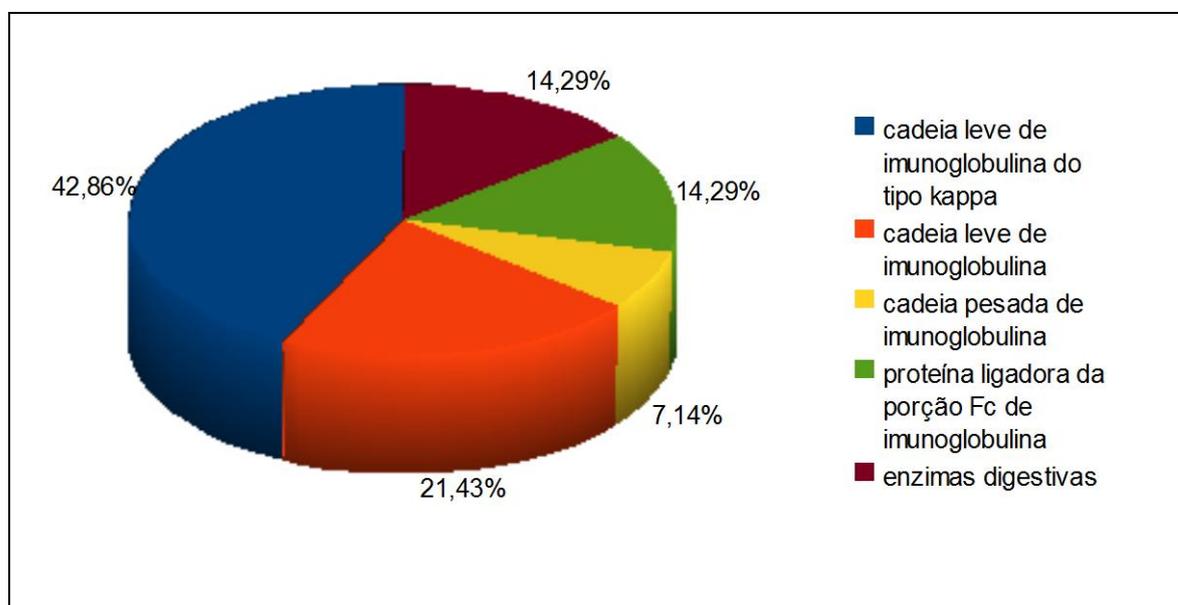
♦ Resultado para o banco de dado: Taxonomia – *Homo sapiens*

24	223	23.6/6.9	24.7/7.3	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
26	156	23.6/7.8	25/ 8.1	immunoglobulin light chain [Homo sapiens]
27	151	25.9/8.7	25.1/ 8.6	immunoglobulin kappa light chain [Homo sapiens]
36	119	15.3/ 5.5	16.6/ 5.8	immunoglobulin kappa chain V-J-C [Homo sapiens]
40	84	11.8/ 5.5	12.5/ 5.8	kappa 1 immunoglobulin light chain constant region [Homo sapiens]
Enzimas				
33 [♦]	42	16.1/ 5.7	18.8/ 5.8	superoxide dismutase 1, soluble [Homo sapiens]
44 [♦]	50	28.5/ 6.7	15.6/ 7.9	chymotrypsin [Homo sapiens]
Cadeia Pesada de Imunoglobulina				
51	63	45.6/ 5.7	54.7/ 6.1	Immunoglobulin heavy chain variant [Homo sapiens]

[♦] Resultado para o banco de dado: Taxonomia – *Homo sapiens*

Dos 53 spots avaliados na amostra do grupo G2, 14 proteínas foram identificadas, sendo estas separadas em 4 grupos de proteínas distintas: 9 proteínas cadeia leve de imunoglobulina, 1 proteína cadeia pesada, 2 proteínas ligadora da porção Fc de imunoglobulina e 2 enzimas digestivas, apresentando, respectivamente, 64%, 7%, 14% e 14% do total de proteínas identificadas (Gráfico 2). Considerando as proteínas cadeias leve do tipo kappa como um grupo de proteínas isoladamente, vemos que essas proteínas representam 42,86% do total das proteínas identificadas pelo programa (Gráfico 2).

Gráfico 2: Valores em porcentagem das proteínas identificadas da amostra do grupo 2 pelo bando de dados do MASCOT:



DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO:

Por ser uma região de alta prevalência para a Toxoplasmose, principalmente na população de baixo poder aquisitivo que recebe pouca atenção médica, o município de Campos dos Goytacazes é adequado à realização de estudos acerca do perfil de resposta imune de indivíduos expostos a grandes pressões de infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii*. Visto que a prevalência da infecção toxoplásmica na faixa etária de 0-4 de idade é menor do que se supunha, a avaliação da presença de imunoglobulinas fecais anti-*T. gondii* nessa faixa etária da população é pertinente e com potencial para distinguir entre a doença congênita ou neonatal e subsidiar o acompanhamento da infecção por pediatras e oftalmologistas.

Em trabalho realizado em 2006, observou-se ser viável a identificação de anticorpos nas amostras fecais de crianças moradoras de comunidades carentes do município de Campos dos Goytacazes com intuito de investigar exposição dessas crianças à infecção pelo *T. gondii* (MANGIAVACCHI, 2006).

A Toxoplasmose em Campos dos Goytacazes é prevalente em 84% da população de baixa renda enquanto que nas populações de médio/baixo e médio/alto poder aquisitivo as prevalências são de 62% e 23% respectivamente (BAHIA-OLIVEIRA *et al*, 2003). As curvas de prevalências mostram que na população de baixa, bem como de media/baixa renda na faixa de 0 a 9 anos o percentual de positividade está em torno de 60%. No entanto no ensaio de ELISA realizado com amostras de fezes de crianças obtivemos 100% de positividade (Tabela 3). Isso pode ser reflexo da “imaturidade” na produção de IgA sérica em crianças já que o nível de produção desses anticorpos no soro alcançam seu pico por volta dos 12 anos, enquanto que na mucosa esse nível é alcançado até 1 ano de idade, refletindo a resposta imune local (MELLANDER *et al.*, 1984). Além do mais, os testes sorológicos utilizados no estudo por Bahia-Oliveira em 2003, avaliaram somente a presença de anticorpos da classe IgG em contraste com a IgA avaliada em nosso ensaio.

Para purificar a IgA, especificamente a SIgA, das amostras de fezes, utilizamos a cromatografia de afinidade em coluna de jacalina, por ser um método bastante eficiente para a purificação dessas imunoglobulinas (HUSE *et al.*, 2002). As lectinas, como a jacalina, são proteínas conhecidas pela sua capacidade de se ligarem a glicoproteínas (ROBERTSON & KENNEDY, 1996), se ligando a resíduos α -D-galactose presente na região de dobradiça da imunoglobulina, sendo capaz de separar principalmente a IgA1, tanto na forma monomérica quanto a dimérica, e a IgD, não se ligando nem a IgM e IgG (KUMAR *et al.*, 1982; AUCOUTURIER *et al.*, 1987).

As cadeias pesadas de IgA1 e IgA2 humanas diferem em apenas 22 aminoácidos, predominantemente pela deleção de 13 aminoácidos na região da dobradiça na IgA2. Essa região na IgA1 é composta por sequências repetidas ricas em prolina, serina e treonina, onde as serinas apresentam glicosilações do tipo O (KAZEEVA & SHEVELEV, 2007). O papel dessa região na IgA2 a torna resistente a ação de um grande número de proteinases bacterianas que clivam a IgA1 na região da dobradiça e são importantes na patogenicidade dessas bactérias (KAZEEVA & SHEVELEV, 2007). A intensidade de ligação da IgA1 na sua forma monomérica e dimérica, principalmente a SIgA, com a jacalina é muito maior que com a IgA2 (AUCOUTURIER *et al.*, 1987, 1988; KONDOH *et al.*, 1986).

Por se tratar de amostra de fezes, que sabidamente apresentam a SIgA, utilizamos a coluna de jacalina para a purificação das mesmas. No gráfico das frações obtidas da coluna de jacalina obtivemos 2 picos de absorbâncias (Gráfico 1). Esse fracionamento do material em 2 picos também foi observado em trabalho realizado por Campos-Neto e Roque-Barreira com amostras de soro humano, onde através da eletroforese eles viram que o primeiro pico obtido correspondia a IgA juntamente com outras proteínas que apresentam uma ligação fraca com a jacalina, e o segundo pico constituído somente por IgA (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985).

Apesar da correspondência dos resultados com Roque-Barreira e Campos-Neto, em nosso estudo não conseguimos identificar, por espectrometria de massas, a cadeia pesada da imunoglobulina após a etapa purificação, sendo identificada apenas a cadeia leve da mesma. Isso pode ser explicado visto que a quantidade de material aplicado na coluna foi bem menor (500ul) que o volume de material aplicado no estudo por Roque-Barreira e Campos-Neto (30ml), onde eles obtiveram a identificação da IgA por imunoeletroforese (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985), além disso nós só avaliamos o volume de material eluído referente ao primeiro pico do material.

Especialmente para a purificação da IgA humana, a cromatografia de afinidade utilizando a coluna de jacalina é bastante eficiente, não acontecendo o mesmo para IgA de outros mamíferos (HUSE *et al.*, 2002). Porém alguns trabalhos mostram a ligação da SIgA intestinal e lacrimal à jacalina (COYLE *et al.*, 1989; KUIZENGA *et al.*, 1991; KABIR, 1993.). Kabir em seu estudo avaliou a presença da SIgA no lavado intestinal de coelhos após a infecção entérica com *V. cholerae* (KABIR, 1993). A SIgA, bem como a IgG, foram purificadas através de métodos cromatográficos utilizando, respectivamente, a jacalina e a proteína A, mostrando ser um método rápido e eficiente na purificação dessas imunoglobulinas intestinais (KABIR, 1993). Kuizenga e colaboradores avaliaram a presença da SIgA em amostras de lágrima humana com e sem solução redutora por SDS-PAGE, identificando a presença do componente secretório e a cadeia pesada da IgA e a SIgA íntegra, respectivamente (KUIZENGA *et al.*, 1991).

O desenvolvimento de técnicas e métodos de purificação de proteínas tem sido um pré-requisito essencial para muito dos avanços feitos na biotecnologia (PANDEY & MANN, 2000). A utilização de proteínas purificadas vem sendo difundida em testes de diagnóstico com o objetivo de aumentar a especificidade e sensibilidade desses testes. A análise de proteínas presentes em fluidos corporais para pesquisa de novos biomarcadores tem sido utilizada, porém para estudar o conjunto das proteínas expressas deve-se utilizar ferramentas proteômicas (SOARES *et al.*, 2007; PETRICOIN *et al.*, 2004; JACOBS *et al.*, 2005; ANG *et al.*,

2009. Uma estratégia básica dentro da proteômica é o uso de géis bidimensionais (2D) para separar centenas ou milhares de proteínas a partir de um extrato total (O'FARREL, 1975), seguido da identificação das mesmas isoladamente por espectrometria de massas (HANASH, 2003). Dois procedimentos são comumente usados: a caracterização geral do proteoma com a identificação do maior número possível de proteínas ou a identificação apenas das proteínas diferencialmente expressas entre duas amostras com características fenotípicas contrastantes. Por não existir dados na literatura sobre a presença diferencial de imunoglobulinas em amostras de fezes humanas, decidimos por identificar o maior número de proteínas possíveis nas amostras avaliadas por espectrometria de massas tanto nos géis unidimensionais quanto para os bidimensionais.

Nesse estudo ficou comprovado, pelo percentual de fragmentos de imunoglobulinas identificados, objetivo principal de nosso estudo, que os géis bidimensionais são melhores na identificação dessas proteínas quando comparados os géis unidimensionais, onde nas amostras avaliadas, conseguimos identificar 64% (Tabela 5) dessas proteínas. Além do mais, os géis bidimensionais são vantajosos na medida em que conferem uma visão global do proteoma da amostra e permitem a pré-separação das proteínas da amostra por ponto isoelétrico (pI) e massa molecular (Mr).

No entanto só obtivemos a identificação de proteínas da amostra do grupo G2, amostras essas que se apresentaram positivas ao teste de ELISA para o controle amostra-conjugado (Tabela 5). Apesar de identificarmos alguns *spots* nas amostras do grupo G1, amostras essas que se apresentaram negativas ao teste de ELISA para o controle amostra-conjugado (Figura 12 e 13), acreditamos que pela baixa concentração de proteínas aplicadas na eletroforese ficou inviável a identificação de proteínas nesse material. Muitos trabalhos na literatura relatam a utilização de grande quantidade de proteínas para identificação proteômica, com a concentração variando de 500ug (CUERVO *et al.*, 2007) até 1mg (GHAFOURI *et al.*, 2003) de proteína a ser aplicada no processo de focalização, enquanto que no

nosso ensaio utilizamos 50ug das amostras dos grupos G1 e G2, visto que estávamos padronizando a técnica para esse tipo de material.

A provável explicação para a não visualização expressiva nos géis SDS-PAGE e 2D da IgA nas amostras do grupo G1 pode estar relacionada ao próprio estado de saúde, ou seja ausência de doença nessas crianças. É sabido que a infecção por *T. gondii* aumenta a produção de IgA intestinal (MCLEOD E MACK, 1986) e essa situação pode ser demonstrada no esquema de reação do ensaio de ELISA onde o grupo G1 não apresentou reatividade no teste quando comparada ao grupo G2, e conseqüentemente, não apresentaram quantidade considerável de IgA que pudesse ser identificada no SDS-PAGE e no gel 2D.

O material fecal contém múltiplas proteínas e essas proteínas servem como marcadores no diagnóstico de um grupo importante de doenças, como inflamatórias, neoplásicas e parasitárias, visto que esta é uma técnica não invasiva (OLEKSIEWICZ *et al.*, 2005). A constituição das fezes é de 75% de água e os 25% sólidos são, predominantemente microorganismos mortos (30%), 30% resíduos do *turn-over* celular do epitélio da mucosa intestinal e matéria inorgânica, 20 a 30% resíduos alimentares não digeridos, e os restantes 10% a 15% são gorduras.

O primeiro estudo com análise do proteoma do material fecal foi realizado em modelo murino através do seqüenciamento das proteínas presentes em amostras de fezes de animais saudáveis por espectrometria de massas, mostrando a presença de proteínas do próprio indivíduo, como enzimas e proteínas ligadoras de imunoglobulinas, proteínas provenientes da alimentação, como a soja, e de produtos bacterianos, como a flagelina (OLEKSIEWICZ *et al.*, 2005).

As amostras de fezes avaliada nesse estudo sofreram um tratamento de forma que as imunoglobulinas presentes nesse material fossem concentradas, produzindo, portanto, um material rico nessas proteínas. Corroborando com o tratamento aplicado, obtivemos como resultado da identificação de proteínas a presença de imunoglobulinas (Tabela 5). No entanto não utilizamos o extrato fecal bruto neste trabalho, por isso não podemos afirmar a eficiência na purificação

dessas proteínas comparada com o extrato inicial do material. Com isso daremos continuidade a essa etapa de purificação analisando também o material bruto. No entanto a presença de anticorpos nas fezes de crianças pode ter potencial no diagnóstico precoce de algumas doenças que primeiro atingem a mucosa indicando uma resposta imune local, antes mesmo do desenvolvimento da resposta imune sistêmica, fato que pode explicar a soronegatividade de anticorpos anti-*T. gondii* das crianças nos teste de ELISA no estudo de Bahia-Oliveira (BAHIA-OLIVEIRA, 2003).

Através da técnica de análise por espectrometria de massas, conseguimos identificar a presença da cadeia leve e pesada da imunoglobulina nas amostras de fezes do grupo G2, onde conseguimos identificar 64% de proteínas tipo cadeia leve de imunoglobulina, sendo o isotipo kappa em maior proporção. Woloschak e Krco analisando células B presentes na Placa de Peyer que estavam expressando as cadeias leves κ e λ , observaram que a porcentagem de cada cadeia nesses linfócitos correspondia com a mesma porcentagem presente nas amostras de soro, sendo 90% κ e 10% λ na mucosa, e 95% κ e 5% λ no soro (WOLOSCHAK & KRCO, 1987). Esses dados confirmam o nosso achado nas amostras do grupo G2, onde o isotipo identificado para a cadeia leve foi do tipo kappa (Tabelas 4 e 5).

Peters e colaboradores em 2004, avaliaram a presença de imunoglobulinas em amostras de fezes de cães mostrando que é possível a identificação e a concentração de IgG, IgA e IgM nessas amostras (PETERS *et al.*, 2004). A concentração dessas imunoglobulinas nas fezes de cães foi similar, porém esse fato não era esperado visto que a IgG não consegue ser transportada ativamente nas secreções de mucosa, e essa IgG provavelmente provem da bile, já que nesse fluido já foi identificada a presença de IgG em estudos anteriores (GERMAN *et al.*, 1998). Tanto a IgM quanto a IgA usam o receptor polimérico no processo de transcitose para o lúmen intestinal.

Nas amostras de fezes do grupo G2 identificamos fragmentos de 2 proteínas pertencentes a categoria das proteínas ligadoras da porção Fc da IgG, sendo cada uma de aproximadamente 32 e 46 KDa e pH por volta de 5. Tyska e colaboradores em 2009 identificaram por espectrometria de massas a presença de proteínas nas vesículas luminiais provenientes dos enterócitos mostrando estas proteínas como

marcadores da membrana dessas células (TYSKA, 2009). Dentre as proteínas identificadas se encontram a proteína ligadora da porção Fc – Fc γ BP – (KOBAYASHI *et al.*, 2002) e o receptor polimérico da IgA (SANO, 2008).

Kobayashi e colaboradores (KOBAYASHI *et al.*, 2002) identificaram a presença de Fc γ BP nas membranas da mucosa e nos fluidos corporais. Essa proteínas mantêm a atividade da IgG nesses fluidos e pode inibir a reação mediada por complemento, sugerindo esta proteína como importante na imunologia das mucosas.

Kobayashi e colaboradores em 1989 descreveram a ligação da porção Fc da IgG com as células caliciformes (globo cells) no intestino humano (KOBAYASHI *et al.*, 1989). Esses receptores são diferentes dos encontrados em leucócitos, e parecem ser secretados juntamente com o muco no lúmen intestinal (KOBAYASHI *et al.*, 1991). A Fc γ BP também está presente nas secreções de outros tecidos. Essa proteína apresentam um peso molecular de 70-80 KDa porém já foram encontrados fragmentos dessa proteínas em estudos utilizando imunoprecipitação. Provavelmente, uma vez liberado no lúmen intestinal, essas proteínas sofrem degradação por enzimas digestivas, que resulta na inibição da atividade da IgG nessa região, porém estudos mostram que quando esta proteína está ligada a IgG torna-se mais difícil de ser degradada.

A Fc γ BP se liga fortemente a IgG e a complexos de IgG auxiliando na proteção da superfície de mucosa e facilitando a liberação desses complexos (HARADA *et al.*, 1997). Normalmente não há muita IgG presente em secreções visto que seu transporte não ocorre facilmente através da mucosa (KOBAYASHI *et al.*, 1989). No entanto, em doenças inflamatórias, a Fc γ BP pode impedir a ocorrência de reações mediadas por complemento se ligando a qualquer IgG viável. Curiosamente a esse respeito, Kobayashi e colaboradores, observaram um aumento da Fc γ BP antigênica em soros de pacientes com doença inflamatória intestinal e doenças autoimunes (KOBAYASHI *et al.*, 2001).

Além das proteínas identificadas relacionadas com imunoglobulinas foram encontradas 4 enzimas de importância no trato gastrointestinal, entre elas a fosfatase alcalina, a maltase gluco-amilase, a quimiotripsina e a superóxido desmutase.

Tyska e colaboradores em 2009 mostraram a atividade catalítica das enzimas presentes nas vesículas liberadas no lúmen a partir das células do epitélio intestinal, mostrando a presença de fosfatases, maltases, sucrases e aminopeptidases (TYSKA, 2009). A identificação dessas proteínas no lúmen intestinal sustenta os nossos achados nas amostras de fezes das crianças (tabela 4), onde encontramos a presença de fosfatase e maltase nessas amostras.

A superóxido dismutase pertence a uma classe de enzimas que catalisam a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (FARKAS, *et al.*, 2003). São importantes antioxidantes na defesa das células contra os reativos de oxigênio (KRUIDENIER *et al.*, 2003). Os ataques a mucosa e a disfunção em doenças inflamatórias, com a colite ulcerativa e a úlcera péptica, são em partes causadas pela exposição contínua dos tecidos a reativos de oxigênio (KRUIDENIER *et al.*, 2003). No entanto não sabemos até que ponto essa enzima pode indicar a presença de inflamação da mucosa, visto que não há estudos que determinam uma concentração mínima dessa enzima no material fecal.

A fosfatase alcalina é uma hidrolase responsável por remover os grupos fosfatase de diversos tipos de moléculas, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcalóides. O processo de remoção do grupo fosfato é denominado defosforilação. Como o nome já sugere, a fosfatase alcalina é mais eficiente quando presente em meio alcalino. A fosfatase alcalina também está relacionada com a proteção da mucosa contra processos inflamatórios. Recentemente, Tuin e colaboradores mostraram que a expressão reduzida de mRNA para fosfatase alcalina intestinal em células do epitélio intestinal encontram-se reduzidos em pacientes com colite ulcerativa e doença de Cronh (TUIN *et al.*, 2009).

A maltase-glucoamilase é uma α -glicosidase que age sobre a maltose catalizando a liberação de glicose na última etapa da digestão do amido. Essa

enzima fica ancorada nas células epiteliais da mucosa intestinal (SIM *et al.*, 2008). Já foi relatado na literatura o peso molecular da enzima purificada sendo essa 210 KDa (KELLY & ALPERS, 1993), confirmando a identificação da mesma proteínas na amostra do grupo G2 (Tabela 5).

A quimotripsina é uma enzima digestiva capaz de promover proteólise, clivando os peptídeos no lado carboxil da tirosina, triptofano a fenilalanina porque esses 3 aminoácidos apresentam agrupamento aromático. A quimotripsina é sintetizada no pâncreas na sua forma enzimática inativa, o quimotripsinogênio. Huntley e colaboradores identificaram a quimotripsina presente em células de ovinos (HUNTLEY, *et al.*, 1986) e identificaram o peso molecular dessa enzima, sendo entre 19 a 25 KDa, o que parece similar ao identificado nas amostras do grupo G2, onde a quimotripsina identificada apresenta uma massa molecular provável de aproximadamente 16 KDa (Tabela 5). Em humanos a identificação da quimotripsina em amostras de fezes de crianças pode ser um indicativo de insuficiência pancreática recorrente da fibrose cística (GIRELLA *et al.*, 1988; MOLINARI *et al.*, 2004) e a produção dessa enzima em indivíduos normais não ultrapassa de 1mg/dia (BOHE *et al.*, 1983).

Segundo o estudo realizado de 1997 a 1999, o principal fator de risco para a contaminação por *T. gondii* no município de Campos dos Goytacazes é ingestão de água não tratada, que pode conter oocisto desse parasita (BAHIA-OLIVEIRA, 2003). A parede do oocisto, no sistema digestivo do hospedeiro intermediário, é rompida por degradação realizada por enzimas presente no trato gastrointestinal, sendo liberados os esporozoítos na luz intestinal. Essa forma do parasito invade qualquer tipo de célula (preferencialmente as intestinais, por proximidade) e dá origem à forma de multiplicação rápida do *T. gondii*, o taquizoíto (TENTER *et al.*, 2000).

Os taquizoítos são sensíveis a enzimas proteolíticas e usualmente destruídos no trato digestivo. No entanto, crianças são mais susceptíveis a infecção por toxoplasma que os adultos por ter uma menor concentração dessas enzimas no seu trato gastrointestinal. (TENTER, 2009). Esse fato pode explicar a contaminação de crianças através do leite materno relatado em alguns estudos (BONAMETTI *et al.*,

1997; LAGO *et al.*, 2006). Além do mais, os taquizoítos podem ocasionalmente sobreviver por até 2 horas em soluções ácidas (DUBEY, 1998). Em adultos, as carnes podem aumentar a acidez estomacal por até 5 horas (SACKS *et al.*, 1982) e os taquizoítos podem se depositar no intestino, ou em raras ocasiões, pode penetrar à mucosa ganhando acesso a circulação sanguínea ou linfática antes de chegar ao estômago (RIEMANN *et al.*, 1975). Os bradizoítos são mais resistentes às enzimas digestivas que os taquizoítos. Por esse motivo, a ingestão de cistos teciduais por hospedeiros intermediários irá resultar em infecção por *T. gondii* (JACOBS *et al.*, 1960, DUBEY 1998).

Algumas cepas do toxoplasma podem estar relacionadas com o impacto da patologia intestinal em camundongos. No entanto não se sabe até que ponto o desenvolvimento dessa patologia intestinal ocorre em humanos após a infecção oral (SCHEINER & LIESENFELD, 2009). O parasita já foi detectado na reativação da doença em pacientes com AIDS tendo esses indivíduos apresentado patologia intestinal e diarreia (LIESENFELD, 1999). A presença ou ausência da patologia intestinal em humanos pode estar relacionada com a dose necessária para o desenvolvimento da infecção.

Em animais é necessário um inóculo de aproximadamente 100 oocistos ou 40-100 cistos teciduais, da cepa mais virulenta, para a indução da infecção aguda intestinal por *T. gondii* (LIESENFELD, 2002). Em humanos, as principais fontes de contaminação, como carnes e água não tratada, que é a principal fonte de contaminação no município de Campos, podem não conter quantidades suficientes dessas formas infectivas do parasita para a indução da patologia aguda. Considerando esses resultados, pode ser interessante avaliar até que ponto a infecção oral por *T. gondii* está associada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas intestinais em humanos.

É ainda interessante avaliar se a forte resposta local e/ou sistêmica durante a fase aguda ou crônica da infecção pode estar contribuindo para desequilíbrio da homeostase da resposta imune da mucosa em pacientes com desenvolvimento de quadro inflamatórios. Rattan e colaboradores em 1986 observaram a presença de

anticorpos anti- *T. gondii* em maiores níveis em pacientes com Doença de Crohn quando comparados com o grupo controle (RATTAN *et al.*, 1986). Considerando que a presença de patologias intestinais relacionadas com a infecção por *T. gondii* é comum no reino animal (SCHEINER & LIESENFELD, 2009) e a associação da infecção com outras patologias gastrointestinais, incluindo doenças inflamatórias importantes, como a Doença de Crohn, faz-se necessário avaliar o desenvolvimento de processos inflamatórios em crianças supostamente infectados por *T. gondii* no nível de mucosa.

A análise das amostras de fezes de crianças por eletroforese 2D associado à espectrometria de massa, empregada na identificação das proteínas descritas neste trabalho, possivelmente poderá ajudar na identificação da Toxoplasmose nessa faixa etária da população. Esse fato poderá auxiliar o acompanhamento clínico desses indivíduos, visto que o aumento da produção de IgA e demais proteínas relacionadas ao estado inflamatório podem estar relacionadas com a situação de infecção pelo *T. gondii*, isto é, com a presença ou ausência da infecção ativa.

CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÃO:

- O método de purificação em coluna de jacalina pode ser de grande auxílio na purificação de imunoglobulinas A do material fecal apesar de termos identificado somente a cadeia leve da imunoglobulina na espectrometria de massas devendo ser re-investigado em outra oportunidade;
- Os géis bidimensionais são mais adequados para a identificação de proteínas em amostras de fezes humanas quando comparados aos géis unidimensionais posto que se conseguiu identificar imunoglobulinas íntegras, tanto a cadeia pesada (7%) como a cadeia leve (64%), sendo um método viável para este tipo de análise;
- A identificação de imunoglobulinas A no material fecal pode ser considerada possível ferramenta imunoepidemiológica visto que a sua produção pode ser reflexo da situação de infecção local pelo *T. gondii*;

***REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

VII. REFERÊNCIAS

- ABREU, A. M. O. W. Estudo Epidemiológico da Toxoplasmose Congênita no Município de Campos dos Goytacazes, 2003. Tese De Doutorado. Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos Dos Goytacazes, Rj.
- ALFORD, C. A. Chronic congenital infections of man. *The Yale J Biol Medic* 55:187-92, 1982.
- ANDRADE, G. M. Q., CARVALHO, A. L., CARVALHO, I. R., NOGUEIRA, M. G. S., ORÉFICE, F. Congenital Toxoplasmosis – Treatment and Prevention Guideline. *Rev. Med. Minas Gerais*, 14 (3): 85-91. 2004.
- ANG C. S, ROTHACKER J, PATSIOURAS H, BURGESS AW, NICE EC. Murine fecal proteomics: A model system for the detection of potential biomarkers for colorectal cancer. *J Chromatogr A*. 2009.
- ASHBURN, D., A. W. JOSS, PENNINGTON, T. H., HO-YEN, D. O. “Do IgA, IgE , and IgG avidity test have any value in the diagnosis of toxoplasma infection in pregnancy?” *J Clin Pathol* 51 (4): 312-5, 1998.
- AUCOUTURIER P, DUARTE F, MIHAESCO E, PINEAU N, PREUD'HOMME JL. Jacalin, the human IgA1 and IgD precipitating lectin, also binds IgA2 of both allotypes. *J Immunol Methods*. 113(2):185-91, 1988.
- AUCOUTURIER, P., MIHAESCO, E., MIHAESCO, C., PREUD'HOMME, J.L.. Characterization of jacalin, the human IgA and IgD binding lectin from jackfruit. *Mol. Immunol*. 24, 503, 1987.
- AVRECH, O. M., SAMRA, Z.. Efficacy of the placental barrier for immunoglobulins: correlations between maternal, paternal and fetal immunoglobulin levels. *Int Arch Allergy Immunol* 103(2): 160-5, 1994.
- AZEREDO, D. S., BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., SHEN, S. K., KWOK, O. C. H., LEHMAN, T., DUBEY, J. P. Prevalence Of *Toxoplasma gondii* In Chickens From A Highly Endemic Area In Southern Brazil. *J Parasitol*, 2003.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G., JONES, J. L., AZEVEDO-SILVA, J., ALVES, C. C. F., ORÉFICE, F. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. *Emerg Infect Dis* 9 (1): 55-62, 2003.
- BENENSON, M. W., TAKAFUGI, E. T., LEMON, S. M., GREENUP, R. L., SULZER, A. J. Oocyst transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N Engl J Med* 307:666-9, 1982.

- BERTOZZI, L. C., SUZUKI, L. A., KOSSI, C. L. Serological diagnosis of toxoplasmosis: usefulness of IgA detection and IgG avidity determination in patient with a persistent IgM antibody response to *Toxoplasma gondii*. *Rev. Int. Med. Trop. São Paulo*. 41(3): 175-177, 1999.
- BICHARA, C. N. C. Perfil epidemiológico da Toxoplasmose humana na área metropolitana de Belém/PA: a experiência no serviço de parasitologia do Instituto Evandro Chagas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará, MPEG, EMBRAPA. 2001.
- BLISS, S. K., GAVRILESCU, L. C., ALCARAZ, A., DENKERS, E. Y. Neutrophil depletion during *Toxoplasma gondii* infection leads to impaired immunity and lethal systemic pathology. *Infect Immun* 69: 4898–4905, 2001.
- BOBIC, B., SIBALIC, D., DJURKOVIC-DJAKOVIC, O. High levels of IgM antibodies specific for *Toxoplasma gondii* in pregnancy 12 years after primary toxoplasma infection. *Gynecol. Obstet. Invest.* 31(3): 182-184, 1991.
- BOHE, M., BORGSTRÖM, A., GENELL, S., OHLSSON, K. Determination of immunoreactive trypsin, pancreatic elastase and chymotrypsin in extracts of human feces and ileostomy drainage. *Digestion*. 27(1):8-15, 1983.
- BONAMETTI, A. M., PASSOS, J. N., KOGA DE SILVA, E. M., MACEDO, Z. S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *J Trop Pediat* 43:116, 1997.
- BOULLIER S, TANGUY M, KADAQUI KA, CAUBET C, SANSONETTI P, CORTHÉSY B, PHALIPON A. Secretory IgA-mediated neutralization of *Shigella flexneri* prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits.. *J Immunol*. 183(9):5879-85, 2009.
- BOWIE, W. R., KING, A. S., WERKER, D. H., ISAAC-RENTON, J. L., BELL, A., ENG, S. B., MARION, S. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet* 350: 173-7, 1997.
- BOYER, K. M., REMIGNTON, J. S., McLEOD, R. Toxoplasmosis. In: Feigin and Cherry. Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 4^a ed, Philadelphia, W B Saunders Company p 2473-2490, 1998.
- BRADFORD, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-dye Binding. *Analytic Bioch* 72, 248-254, 1976.
- BRANDTZAEG P. Mucosal immunity: integration between mother and the breast-fed infant. *Vaccine*. 28;21(24):3382-8, 2003.
- BRANDTZAEG, P. Do “Salivary Antibodies Reliably Reflect Both Mucosal and Systemic Immunity?” *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1098: 288–311, 2007.

- BRISIGHELLI, N. A. Prevalência da Toxoplasmose em gestantes da cidade de Bragança Paulista - São Paulo, 1998. Dissertação de mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública.
- BUXTON, D. Ovine Toxoplasmosis: a review. *J R Soc Med.* 83:509-11 1990.
- BUZONI-GATEL, D. & WERTS, C. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Trends Parasitol.* 22(10):448-52, 2006.
- BUZONI-GATEL, D., SCHULTHESS, J., MENARD, L. C., KASPER, L. H. Mucosal defences against orally acquired protozoan parasites, emphasis on *Toxoplasma gondii* infections. *Cell Microbiol.* 8(4):535-44, 2006.
- CAIAFFA WT, CHIARI CA, FIGUEIREDO AR, OREFICE F, ANTUNES CM Toxoplasmosis and mental retardation. Report of a case-control study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 253-261, 1993.
- CAMARGO, M. E. Toxoplasmose. In: Ferreira AW, Ávila SLM, eds. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 278-286, 2001.
- 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*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 33: 213-218. 1991.
- CANTEY, J. R. Prevention of bacterial infections of mucosal surfaces by immune secretory IgA. *Adv. Exp. Med. Biol.* 107: 461-70, 1978.
- CARMO, E. L., TRINDADE, D. B., MACHADO, R. L. D., MESQUITA, M. P. M., POVOA, M. M. Levantamento da prevalência de *Toxoplasma gondii*, através de diferentes métodos sorológicos, em um grupo de grávidas e crianças (0-2 anos) da cidade de Belém-Pa. In: Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia, v. 1. p. 47-47, 1997.
- CASTRO, F. C., CASTRO, M. J. B. V., CABRAL, A. C. V., FILHO, G. B., VITOR, R. W. A., LANA, A. M. A., ANDRADE, G. M. Q. Comparação dos métodos para diagnóstico da Toxoplasmose congênita. *Rev Bras Gin Obst* 23: 277-282, 2001.
- CHARDES, T. & BOUT, D.: Mucosal immune response in toxoplasmosis. *Res Immunol* 144: 57-60, 1993.
- CHARDES, T., BOURGUIN, I., MEVELEC, M. N., DUBREMETZ, J. F., BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions and milk from orally infected mice and characterization of targets antigens. *Infect Immun.* 58: 1240-1246, 1990.
- CHATTERTON, J. M. W. Pregnancy. In: Ho-Yen DO, Joss AWL, editors. Human toxoplasmosis. Oxford: Oxford University Press, 144-183, 1992.

- CHIARI, C. A. & NEVES, D. P. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 79(3):337-340, 1984.
- CHUMPITAZI, B. F. P., BOUSSAID, A., PELLOUX, H. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by immunoblotting and relationship with other methods. *J. Clin. Microbiol* 33:1479-85, 1995.
- COHEN, A. M., RUMPEL, K., COOMBS, G. H. WASTLING, J. M. Characterisation of global protein expression by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry: proteomic of *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 32: 39-51, 2002.
- COMBE, C. L., CURIEL, T. J., MORETTO, M. M., KHAN, I. A. NK cells help to induce CD8 (+)-T-cell immunity against *Toxoplasma gondii* in the absence of CD4 (+) T cells. *Infect Immun* 73: 4913–4921, 2005.
- CONLEY ME, DELACROIX DL. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med.* 106(6):892-9, 1987.
- COOGAN MM, SWEET SP, CHALLA COMBE SJ. Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Infect Immun* 62:892-96, 1994.
- COSTA-CARVALHO, B. Imunologia do leite materno. *Rev Soc Brás Alerg Imunol* 15: 30-4, 1992.
- COURRET, N., DARCHE, S., SONIGO, P., MILON, G., BUZONI-GATEL, D., TARDIEUX, I. CD11c- and CD11b-expressing mouse leukocytes transport single *Toxoplasma gondii* tachyzoites to the brain. *Blood* 107: 309-316, 2006.
- COYLE PK, SIBONY PA, JOHNSON C. Electrophoresis combined with immunologic identification of human tear proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (8):1872-8, 1989.
- CRUZ, J. R., GIL, L., CANO, F., CACERES, P., PAREJA, G. Breast-milk anti- *Escherichia coli* heat-labile toxin IgA antibodies protect against toxin-induced infantile diarrhoea. *Acta Paediatr Scand* 77:658-62, 1988.
- CUERVO P, DE JESUS JB, JUNQUEIRA M, MENDONÇA-LIMA L, GONZÁLEZ LJ, BETANCOURT L, GRIMALDI G JR, DOMONT GB, FERNANDES O, CUPOLILLO E. Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 154(1):6-21, 2007.
- DAVIS, P. J. & PORTER, P. A mechanism for secretory IgA-mediated inhibition of the cell penetration and intracellular development of *Eimeria tenella*. *Immunol.* 36(3): 471–477, 1979.
- DE MOURA, L., BAHIA-OLIVEIRA, L. M., WADA, M. Y., JONES, J. L., TUBOI, S. H., CARMO, E. H., RAMALHO. W. M., CAMARGO, N. J., TREVISAN, R., GRAÇA, R. M.,

- DA SILVA, A. J., MOURA, I., DUBEY, J. P., GARRETT, D. O. Waterborne toxoplasmosis, Brazil, from field to gene. *Emerg Infect Dis.* 12:326-9, 2006.
- DECOSTER A. Detection of IgA anti-P30 (SAG1) antibodies in acquired and congenital toxoplasmosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 219:199-207, 1996.
- DECOSTER, A., DARCY, F., CARON, A., CAPRON, A. IgA antibodies against P30 as markers of congenital and acute Toxoplasmosis. *Lancet.* 2: 1104-1107, 1988.
- DELACROIX, D. L., DIVE, C., RAMBAUD, J. C., VAERMAN, J. P. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunol* 47:383-385, 1982.
- DELNERI, M. T., CARBONARE, S. B., SILVA, M. L. M., PALMEIRA, P., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. *Eur J Pediatr* 156(6): 493-498, 1997.
- DENKERS E. Y., SCHARTON-KERSTEN T., BARBIERI S., CASPER P., SHER A. A role for CD4+ NK1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection. *J Exp Med* 184: 131, 1996.
- DENKERS, E.Y., BUTCHER, B.A., DEL RIO, L., BENNOUNA, S. Neutrophils, dendritic cells and *Toxoplasma*. *Int J Parasitol* 34: 411-421, 2004.
- DESMONTS G, COUVREUR J, BEN RACHID MS. [Toxoplasmosis, the mother and the child]. *Arch Fr Pediatr.* 22(10):1183-200, 1965.
- DESMONTS, G., FORESTIER, F., THULLIEZ, P. H., DAFFOS, F., CAPELLA-PAVLOVSK, M., CHARTIER, M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 325(8427): 500-504, 1985.
- DRAKE RR, SCHWEGLER EE, MALIK G, DIAZ J, BLOCK T, MEHTA A, SEMMES OJ. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 5(10):1957-67, 2006.
- DUBEY, J. The History of *Toxoplasma gondii*—The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55(6): 467-475, 2008.
- DUBEY, J. P. & BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida - 220pp, 1988.
- DUBEY, J. P. Advances in the cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 28: 1019-1024, 1998.
- DUBEY, J. P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Vet Parasitol* 74(1):75-77, 1998.

- DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* oocyst survival under defined temperatures. *J Parasitol.* 82:957-61, 1998a.
- DUBEY, J. P., CAMARGO, M. E., RUFF, M. D., WILKINS, G. C., SHEN, S. K., KWOK, O.C., THULLIEZ, P. Experimental toxoplasmosis in turkeys. *J Parasitol* 79: 949-952, 1993.
- DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S., SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev.* p. 267-299. 1998.
- DUBEY, J. P., SHARMA, S. P. Prolonged excretion of *Toxoplasma gondii* in semen of goats. *Am J Vet Res* 41(5): 794-5, 1980.
- DUNN, D., WALLON, M., PEYRON, F., PETERSEN, E., PECKHAM, C., GILBERT, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet.* 353(9167):1829-33, 1999.
- EL KAISOUNI, J., BENE, M. C., THIONNOIS, S., MONIN, P., VIDAILHET, M., FAURE, G. C. Maturation of B cells in the lamina propria of human gut and bronchi in the first months of human life. *Dev Immunol.* 5(3):153-9, 1998.
- ERIKSEN, L., LOFTAGER, M., BOGH, H. O., LIND, P., NANSEN, P. Local and systemic immune response to *Ascaris suum* in pig. *Vet. Immunol. Immunophatol.* 54: 209, 1996.
- FARKAS R, SELMECI L, TULASSAY Z, PRONAI L. Superoxide-dismutase activity of the gastric mucosa in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Anticancer Res.* 23(5b):4309-12, 2003.
- FAVRE, L., SPERTINI, F., CORTHESEY, B. Secretory IgA possesses intrinsic modulatory properties stimulating mucosal and systemic immune responses. *J Immunol.* 175:2793-800, 2005.
- FERGUSON, D. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 104(2):133-148, 2009.
- FIELD, C. J. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 135(1):1-4, 2005.
- FILISSETTI, D. & CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Ann Ist Super Sanita.* 40(1):71-80, 2004.
- FRENKEL, J. K. & DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167, 1970.
- FRENKEL, J. K. Biology of *Toxoplasma gondii*. In: Ambroise-Thomas P. Peterse E, editors. Congenital Toxoplasmosis: scientific background, clinical management and control. Paris:Springer-Verag. pp 9-25.Frenkel JK Toxoplasmosis: parasite life cycle pathology

- and immunology. In Hammond DM, Long PL (eds): The Coccidia. Baltimore, University Park Press, 1973, pp 343-410, 2000.
- FRENKEL, J. K. Toxoplasma in and around us. *BioScience* 23: 343-352. 1973.
- FUBARA, E. S. & FRETER, R. Protection against enteric bacterial infections by secretory IgA antibodies. *J. Immunol.* 111: 395-403, 1973.
- GAVINET, M. F., ROBERT, F., FIRTION, G., DELOUVRIER, E., HENNEQUIN, C., MAURIN, J. R., TOURTE-SCHAEFER, C., DUPOUY-CAMET, J. C. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 35(5): 1276-77, 1997
- GAZZINELLI, R. T., HAKIM, F. T., HIENY, S., SHEARER, G. M., SHER, A. Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J Immunol.* 1;146(1):286-92, 1991.
- GERMAN AJ, HALL EJ, DAY MJ. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. *Vet Immunol Immunopathol.* 64(2):107-21, 1998.
- GHAFOURI B, TAGESSON C, LINDAHL M. Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 3(6):1003-15, 2003.
- GIRELLA E, FAGGIONATO P, BENETAZZO D, MASTELLA G. The assay of chymotrypsin in stool as a simple and effective test of exocrine pancreatic activity in cystic fibrosis. *Pancreas.* 3(3):254-62, 1988.
- GLASS, R. I., SVENNERHOLM, A. M., STOLL, B. J., KHAN, S. R., HASSAIN, K. M. B., HUQ, M. I. Protection against cholera in breast-fed children by antibodies in breast-milk. *N Engl J Med.* 308:1389-92, 1983.
- GORG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, HARDER A, SCHEIBE B, WILDGRUBER R, WEISS W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21(6):1037-1053, 2000.
- GÖRG A, OBERMAIER C, BOGUTH G, WEISS W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* 20(4-5):712-7, 1999.
- GÖRG A, POSTEL W, GÜNTHER S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 9(9):531-46, 1988.
- GORG, A., WEISS, W., DUNN, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12):3665-3685, 2004.

- GRABER, P., WILLIAMS, C.A. Methode permettant l'étude conjuguee des proprietes electrophoretiques et immunochemiques d'un mélange de proteines application au serum sanguine. *Biochim Biophys Acta*. 10:193-4, 1953.
- GUIMARÃES, A. C. S., KAWARABAY, M., BORGES, M. M.; ANDRADE JÚNIOR, H. F., TOLEZANO, J. E. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in Sao Paulo metropolitan region. *Rev. Inst. Med. Trop.* 35: 479-483, 1993.
- HALL, S. M.. Congenital toxoplasmosis. *BMJ* 305(6848): 291–297, 1992.
- HANASH, S. Disease proteomics *Nature* 422, 226-232, 2003.
- HANASH, S. Disease proteomics *Nature* 422, 226-232, 2003.
- HANSON, L. A., SILFVERDAL, S. A., STROMBACK, L., ERLING, V., ZAMAN, S., OLCEN, P., TELEMO, E. The immunological role of breast feeding. *Pediatr Allergy Immunol* 12:15-19 Suppl: 14, 2001.
- HARADA N, IJIMA S, KOBAYASHI K. Human IgG Fc binding protein (FcγBP) in colonic epithelial cells exhibits mucin-like structure. *J Biol Chem* 272:15232–41, 1997.
- HAYANI, K. C., GUERRERO, M. L., MORROW, A. L., GOMEZ, H. F., WINSOR, D. K., RUIZ-PALACIOS, G. M. Concentration of milk secretory immunoglobulin A against *Shigella* virulence plasmid-associated antigens as a predictor of symptom status in *Shigella*-infected breast-fed infants. *J Pediatr.* ; 121:852-6, 1992.
- HE, X. L., GRIGG, M. E., BOOTHROYD, J. C., GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat Struct Biol.* 9(8):606-11, 2002.
- HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., GONEZ, J., HELDIN, C. H. Improvement of an "In-Gel" digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224(1), 451-455, 1995.
- HILL, D., DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clin Microbiol Infect* 8(10): 634-640 2002.
- HINRICHSEN, S. L., VALENTE, A. Toxoplasmose. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 421-27, 2005.
- HOEHN GT & SUFFREDINI AF. Proteomics. *Crit Care Med* 33(12):S444-448, 2005.
- HONORIO-FRANÇA, A. C., CARVALHO, M. P., ISAAC, L., TRABULSI, L. R., CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol* 46: 59-66, 1997.
- HUNTLEY, J.F., GIBSON, S. , KNOX, D., MILLER, H.R.P. The isolation and purification of a proteinase with chymotrypsin-like properties from ovine mucosal mast cells. *Inter J Bioch* 18(8): 673-682, 1986.

- HUSE, K., BOHME, H. J., SCHOLZ, G. H. Purification of antibodies by affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* 51: 217–231, 2002.
- HUSKINSON, J., THULLIEZ, P., REMINGTON, J. S. Toxoplasma antigens recognized by human immunoglobulin-A antibodies. *J Clin Microbiol* 28(12): 2632-2636, 1990.
- HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 206:961-962, 1965.
- JACOBS, JM, JOSHUA N. ADKINS,, WEI-JUN QIAN,, TAO LIU,, YUFENG SHEN,, DAVID G. CAMP II, RICHARD D. SMITH. Utilizing Human Blood Plasma for Proteomic Biomarker Discovery. *J Prot Res* 4 (4), 1073-1085, 2005.
- JANKU, J. Pathogenesis and pathologic anatomy of coloboma of macula lútea in eye of normal dimensions and in microphthalmic eye, with parasites in retina. *Cas. Lek. Cesk.*, 62: 1021-1027, 1923.
- JONARD, P. P., RAMBAUD, J. C., DIVE, C., VAERMAN, J. P., GALIAN, A., DELACROIX, D. L. Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the jejunal mucosa. Transport rate and origin of polymeric immunoglobulin A. *J Clin Invest* 74:525–535, 1984.
- JONES, J. L., LOPEZ, A., WILSON, M., SCHULKIN, J., BIGGS, R. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Obstet Gynecol Surv*, 56 (5): 296- 305. 2001.
- JUNQUEIRA, M. R. Aplicação de Técnicas Proteômicas na Caracterização do Veneno da Serpente *Bothrops insularis* (Viperidae), 2005. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. 63p.
- KABIR, S. Simultaneous isolation of intestinal IgA and IgG from rabbits infected intraduodenally with *Vibrio cholerae* 01 by combined lectin affinity chromatography involving jacalina and protein A. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 153, 1993.
- KANIAK, C. E. A. Toxoplasmose congênita: estudo da forma inaparente em Brasília-DF, 1991. Dissertação de Mestrado. Brasília: Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília; 77.
- KASPER, L. H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 57(3):668-72 1989.
- KASPER, L., COURRET, N., DARCHE, S., LUANGSAY, S., MENNECHET, F., MINNS, L., RACHINEL, N., RONET, C., BUZZONI-GATEL., D. *Toxoplasma gondii* and mucosal immunity. *Int J Parasitol.* 34 (3): 401-409. 2004.
- KAWAZOE, U. In: Neves, DP. Parasitologia Humana, 9ª edição, São Paulo: Atheneu, p.174-187, 1995.

- KAZEEVA, T. N. & SHEVELEV, A. B. Unknown functions of immunoglobulins A . *Biochemistry (Moscow)* 72(5): 485-494, 2007.
- KELLY D & COUTTS AG. Early nutrition and the development of immune function in the neonate. *Proc Nutr Soc.* 59(2):177-85, 2000.
- KELLY, JJ & ALPERS, DH. Properties of human intestinal glucoamylase *Bioch Bioph Acta (BBA) - Enzymology* 315(1):113-122, 1973.
- KHAN, I. A., SMITH, K. A., KASPER, L. H. Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 15; 141(10):3600-5, 1988.
- KIM, K. & WEISS, L. M. Toxoplasma: the next 100 years. *Microbes Infect* 10(9):978-84, 2008.
- KOBAYASHI K, BLASER MJ, BROWN WR. Identification of a unique IgG Fc binding site in human intestinal epithelium. *J Immunol* 143:2569–74, 1989.
- KOBAYASHI K, HAMADA Y, BLASER MJ. The molecular configuration and ultrastructural location of an IgG Fc binding side in human colonic epithelium. *J Immunol* 146:68–74, 1991.
- KOBAYASHI K, YAGASAKI M, HARADA N. Detection of Fcγbinding-protein antigen in human sera and its relation with autoimmune diseases. *Immunol Lett* 79:229–35, 2001.
- KOBAYASHI, K., OGATA, H, MORIKAWA, M, IJIMA, S, HARADA, N, YOSHIDA, T, BROWN, WR, INOUE, N, HAMADA, Y, ISHII, H. Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *Gut.* 51:169–176, 2002.
- KONDOH H, KOBAYASHI K, HAGIWARA K, KAJII T. Jacalin, a jackfruit lectin, precipitates IgA1 but not IgA2 subclass on gel diffusion reaction. *J Immunol Methods.* 88(2):171-3, 1986.
- KOTULA, A. W., DUBEY, J.P., SHARAR, A. K., ANDREWS, C. D., SHEN, S. K., LINDSAY, D. S. Effect of freezing on infectivity of *Toxoplasma gondii* tissue cyst in pork. *J Food Protect* 54: 687-90, 1991.
- KRUIDENIER, L, KUIPER, I, VAN DUIJN, W, MARKLUND, SL, VAN HOGEZAND, RA, LAMERS, CBHW, VERSPAGET, HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 201(1) :7-16, 2003.
- KUIZENGA A, VAN HAERINGEN NJ, KIJLSTRA A. Identification of lectin binding proteins in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 32(13):3277-84, 1991.

- KUMAR, G. S., APPUKUTTAN, P. S., BASU, D. Alfa-D-Galactose-specific lectin from jack fruit (*Artocarpus integra*) seed. *J. Biosci* 4(3): 257-261, 1982.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- LAGO, E. G., ALMEIDA, M. A. B., SPERB, A. F., MELAMED, J., SEVERO, M. M. S. Surto intra-familiar de Toxoplasmose, Santa Vitória do Palmar-RS, julho de 2005. 2006. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_03_06.pdf
- LAMBERT, H., HITZIGER, N., DELLACASA, I., SVENSSON, M., BARRAGAN, A. Induction of dendritic cell migration upon *Toxoplasma gondii* infection potentiates parasite dissemination. *Cell Microbiol* 8: 1611-1623, 2006.
- LAMM ME. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol.* 51:311-40, 1997.
- LAPPALAINEN, M., KOSKELA, P., HEDMAN, K. Incidence of primary *Toxoplasma* infections during pregnancy in southern Finland: a prospective cohort study. *Scand J Infect Dis* 24(1): 97-104, 1992.
- LIESENFELD O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiol* 201(2):229-39, 1999.
- LIESENFELD, O. "Oral Infection of C57BL/6 Mice with *Toxoplasma gondii*: A New Model of Inflammatory Bowel Disease?" *J Infect Dis* 185:s1, S96-S101, 2002.
- MAGALDI, C., ELKIS, H., PATTOLI, D., QUIRÓZ, J. C., COSCINA, A. L., FERREIRA, J. M. Surto de Toxoplasmose: Aspectos clínicos, sorológicos e epidemiológicos. *Ver. Saúde Pub* 1(2):141-171, 1967.
- MANGIAVACCHI, BM. Avaliação da extração da IgA fecal anti-*Toxoplasma gondii* em amostras de fezes de crianças de 0 a 3 anos de idade expostas à infecção pelo parasita, 2006. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, UENF.
- MANN M & JENSEN ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21(3):255-261, 2003.
- MANN M, HENDRICKSON RC, PANDEY A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70:437-473, 2001.
- McCABE, R., REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis: The time has come. [Editorial]. *N Engl J Med* 318: 313-315, 1988.
- McLEOD, R., MACK, D. G. Secretory IgA específico for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 136: 2640-2643, 1986.

- MEILLET, D., RAICHVARG, D., TALLET, F., SAVEL, J., YONGER, J., GOBERT, J. G. Measurement of total, monomeric and polymeric IgA in human faeces by electroimmunodiffusion. *Clin Exp Immunol* 69:142–147, 1987.
- MELLANDER, L., CARLSSON, B., HANSON, L. Appearance of secretory IgM and IgA antibodies to *Escherichia coli* in saliva during early infancy and childhood. *J Pediat* 104(4) 1984,564-568, 1984.
- MESTECKY, M. W., RUSSELL, C., O ELSON. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* .44:2-5, 1999.
- MINEO, J. R., McLEOD, R., MACK, D., SMITH, J., KHAN, I. A., ELY, K. H., KASPER, L. H. Antibodies to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J Immunol* 1; 150(9):3951-64, 1993.
- MINKOFF, H., REMINGTON, J. S., HOLMAN, S., RAMIREZ, R., GOODWIN, S., LANDESMAN, S. Vertical transmission of *Toxoplasma* by human immunodeficiency virus-infected women. *Americ J Obstret Ginecol* 176(3): 555-9, 1997.
- MOLINARI I, SQUARE K, LAMIREAU T, FAYON M, LEMIEUX C, CASSAIGNE A, MONTAUDON D. Fecal chymotrypsin and elastase-1 determination on one single stool collected at random: diagnostic value for exocrine pancreatic status. *Clin Biochem*. 37(9):758-63, 2004.
- 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. *Eur. J. Pediat*. 162(10): 703-6, 2003.
- MONTAGNE P, DION C, BENE MC, FAURE G. Measurement of faecal immunoglobulin a levels in young children. *J Clin Lab Anal*. 18(3):195-9, 2004.
- MONTOYA, J. G., LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *Lancet* 363: 1965-1976, 2004.
- NETO, E. C., ANELE, E., RUBIM, R., BRITES, A., SCHULTE, J., BECKER, D., TUUMINEN T. High prevalence of congenital toxoplasmosis in Brazil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Inter J Epidemiol* 29:941-947, 2000.
- NEUTRA, M. R., PRINGAULT, E., KRAEHENBUHL, J. P. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 14: 275-300, 1996.
- NEVES, J. M., NASCIMENTO, L. B., RAMOS, J. G. L., MARTINS-COSTA, S. H. Toxoplasmose na gestação. *Rev Bras Ginecol Obst* 16(6):197-202, 1994.

- NGUYEN, T. D., DE KESEL, M., BIGAIGNON, G., HOET, P., PAZZAGLIA, G., LAMMENS, M., DELMEE, M. Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and bradyzoites in blood, urine, and brains of infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 3(6):635-9, 1996.
- NICOLLE, M. AND MANCEAUX, L. On a new protozoan in gundis (*Toxoplasma* N. Gen). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, (Supplementary file) 104(2), 2009.
- NIELSEN, H. V., SCHMIDT, D. R., PETERSEN, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by two-dimensional immunoblot differentiation of mother and child immunoglobulin G profiles. *J Clin. Microbiol.* 43(2): 711-15, 2005.
- OGRA, S. S., OGRA, P. L. Immunological aspects of human colostrum and milk. 1. Distribution characteristics and concentrations of immunoglobulins at different times after onset of lactation. *J Pediat* 92(4): 546-549, 1978.
- OLEKSIEWICZ MB, KJELDAL HO, KLENØ TG. Identification of stool proteins in C57BL/6J mice by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Biomarkers.* 10(1):29-40, 2005.
- ORÉFICE, F. & BAHIA-OLIVEIRA L. M. G. Toxoplasmose. In Uveítes de causa infecciosa – protozoários. Uveíte Clínica & Cirúrgica, Texto & Atlas. Vol. II, 2 ed. Fernando Oréfice. Rio de Janeiro: Cultura Médica, Cap 42 p 699-804, 2005.
- PANDEY, A. & MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405, 837-846, 2000.
- PATEL, B., YOUNG, Y., DUFFY, K., TANNER, R. P., JOHNSON, J., HOLLIMAN, R. E, Immunoglobulin A detection and the investigation of clinical toxoplasmosis. *J. Med. Microbiol.* 38:286-292, 1993.
- PEDREIRA, D. A. L. Contribuição ao estudo da Toxoplasmose congênita, 1995. Dissertação de Mestrado. São Paulo: Faculdade da Medicina, Universidade de São Paulo.
- PETERS IR, CALVERT EL, HALL EJ, DAY MJ. Measurement of immunoglobulin concentrations in the feces of healthy dogs. *Clin Diagn Lab Immunol.* (5):841-8, 2004.
- PETERSEN, E. Toxoplasmosis. *Sem Fet Neonat Med* 12(3):214-223, 2007.
- PETRICOIN EF, ORNSTEIN DK, LIOTTA LA. Clinical proteomics: Applications for prostate cancer biomarker discovery and detection. *Urol Oncol.* 22(4):322-8, 2004.
- PINKERTON, H., WEINMAN, D. *Toxoplasma* infection in man. *Acta Pathol.* 30: 374-392, 1940.
- POWELL, C. C., BREWER, M., LAPPIN, M. R. Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected lactating cats. *Vet Parasitol* 102(1-2):29-33, 2001.

- PRIN C, BENE MC, GOBERT B, MONTAGNE P, FAURE GC. Isoelectric restriction of human immunoglobulin isotypes. *Biochim Biophys Acta*. 23;1243(2):287-9,1995.
- RATTAN J, HALLAK A, SHVARTZMAN H, FELNER S, GILAT T. Sabin-Feldman dye test in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 29(6):402-4, 1986.
- REMINGTON, J. O. KLEIN. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 5 eds. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, p. 205-2346, 2001.
- REMINGTON, J. S., ARAUJO, F. G., DESMONTS, G. Recognition of different Toxoplasma antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns. *J Infect Dis* 152(5): 1020-1024, 1985.
- REMINGTON, J. S., McLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. Toxoplasmosis. In Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. 5 eds. J. S. Remington, J. O. Klein. Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders Company, p. 205-2346, 2001.
- RIEMANN, H. P., MEYER, M. E., THEIS, J. H., KELSO, G., BEHYMER, D. E. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J Pediat* 87:573-576, 1975.
- ROBERTSON ER, KENNEDY JF. Glycoproteins: a consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterization. *Bioseparation* 6:1-15, 1996.
- ROBINSON, S. A., SMITH, J. E., MILLNER, P. A. *Toxoplasma gondii* major surface antigen (SAG1): in vitro analysis of host cell binding. *Parasitology*. 128(4):391-6, 2004.
- RONET, C., DARCHE, S., LEITE DE MORAES, M., MIYAKE, S., YAMAMURA, T., LOUIS, J. A., KASPER, L. H., BUZZONI-GATEL, D. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 15; 175(2):899-908, 2005.
- ROQUE-BARREIRA, M. C. & CAMPOS-NETO. A. Jacalin: Na IgA-binding lectin. *J Immunol* 134: 1740-43, 1985.
- RUIZ-PALACIOS, G. M., CALVA, J. J., PICKERING, L. K., LOPEZ-VIDAL, Y., VOLKOW, P., PEZZAROSSO, H. Protection of breast-fed infants against Campylobacter diarrhea by antibodies in human milk. *J Pediatr*. ; 116:707-13, 1990.
- RUSH, A., LAPPIN, M., MILHAUSEN, M. Analysis of the humoral responses of *Toxoplasma gondii* – infected cats using immunofluorescent assays with tachyzoite, bradyzoite, and gametogenic stages. *J Parasitol* 87(1): 83-9. 2001.
- SABIN, A. B. & FELDMAN, H. A. Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoon parasite (Toxoplasma). *Science* 108: 660, 1948.
- SACKS JJ, ROBERTO RR, BROOKS NF. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA*. 248(14):1728-32, 1982.

- SAGUE, S. L., TATO, C., PURE, E., HUNTER, C. A. The regulation and activation of CD44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 24: 301–309, 2004.
- SANGER, V. L. & COLE, C. R. Toxoplasmosis: VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. *Americ J Vet Res*, 16:536-539, 1955.
- SANO, Y., F.E. GOMEZ, J.L. HERMSEN, W. KANG, J. LAN, Y. MAESHIMA, AND K.A. KUDSK. Parenteral nutrition induces organ specific alterations in polymeric immunoglobulin receptor levels. *J. Surg. Res.* 149:236–242, 2008.
- SCHREINER, M & LIESENFELD, O. Small intestinal inflammation following oral infection with *Toxoplasma gondii* does not occur exclusively in C57BL/6 mice: review of 70 reports from the literature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 104(2), 2009.
- SHEELAGH, L. & SOULSBY, E. J. L. The role of IgA immunoglobulins in the passive transfer of protection to *Taenia taeniaformis* in the mouse. *Immunol* 34: 939-945, 1978.
- SHEVCHENKO, A., WILM, M., VORM, O., MANN, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858, 1996.
- SIBLEY, L. D., BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprises a single clonal lineage. *Nature* 359:82-85, 1992.
- SIM L, QUEZADA-CALVILLO R, STERCHI EE, NICHOLS BL, ROSE DR. Human Intestinal Maltase–Glucoamylase: Crystal Structure of the N-Terminal Catalytic Subunit and Basis of Inhibition and Substrate Specificity. *J Mol Biol* 375(3):782-792, 2008.
- SINIBALDI, J., & DE RAMIREZ, J. Incidence of congenital Toxoplasmosis in live Guatemalan newborns. *Eur J Epidemiol.* 8(4):516-20, 1992.
- SIUZDAK, G. Mass Spectrometry for Biotechnology. Academic Press, 161 p. (1996).
- SKINNER, L. J., TIMPERLEY, A. C., WIGHTMAN, D., CHATTERTON, J. L., HOYEN, D. O. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand J Infect Dis* 22:359-361, 1990.
- SMITH, D. D., FRENKEL, J. K. Cockroaches as vectors of *Sarcocystis muris* and of other coccidia in the laboratory. *J Parasitol* 64:315-319, 1978.
- SOARES, AJC., SANTOS, MF., CHUNG J, DAVID CMN, DOMONT GB. Proteômica e sepsis: novas perspectivas para o diagnóstico. *Rev Bras Ter Intens* 19(1), 2007.
- SPALDING, M. S., AMENDOEIRA, M. R. R., RIBEIRO, L. C. Estudo prospectivo de gestantes e seus bebês com risco de transmissão de Toxoplasmosis congênita em município do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(4), 2003.

- SPLENDORE, A. A new protozoan parasite of rabbit found in histological lesions similar to human Kala-Azar. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, (Supplementary file) 104(2), 2009a.
- SPLENDORE, A. On a new protozoan parasite of rabbits. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, (Supplementary file) 104(2), 2009b.
- STEPICK-BIEK, P., THULLIEZ, P., ARAUJO, F. G., REMINGTON, J. S. IgA antibodies for diagnosis of acute congenital and acquired toxoplasmosis. *J Infect Dis* 162:270-3, 1990.
- TENTER, A. M., HECKEROTH, A. R., WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Inter J Parasitol* 30: 1217-1258, 2000.
- TENTER, A. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(2): 364-369, 2009.
- THULLIEZ, P., DAFFOS, F., FORESTIER, F. Diagnosis of *Toxoplasma* infection the pregnant woman and the unborn child: current problems. *Scan J Infect Dis* 84(Suppl.): 18-22, 1992.
- TOMAVO, S. The Major Surface Proteins of *Toxoplasma gondii*: Structures and Functions. In *Toxoplasma gondii* - Current Topics in Microbiology and Immunology, ed. U. Gross, p: 45 - 54. New York: Springer-Verlag Heindelber , 1996.
- TUIN A, POELSTRA K, DE JAGER-KRIKKEN A, BOK L, RAABEN W, VELDERS MP, DIJKSTRA G. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats. *Gut*. 58(3):379-87, 2009.
- TYSKA MJ, McCONNELL RE, HIGGINBOTHAM JN, SHIFRIN DA JR, TABB DL, COFFEY RJ. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. *J Cell Biol*. 185(7):1285-98, 2009.
- VAERMAN, J. P. Effector mechanisms of IgA. *Ann Biol Clin*. 42(1):61-70, 1984.
- Van EGMOND, M., DAMEN, C. A., van SPRIEL, A. B., VIDRASSON, G., van GARDEREN, E., van de WINKEL, J. G. IgA and the IgA Fc receptor. *Trends Immunol* 22: 205-211, 2001.
- VARELLA, I. S., WAGNER, M. B., DARELA, A. C. Prevalência de soropositividade para Toxoplasmose em gestantes. *J Pediatr* 79, 2003.
- VOGEL, N., KIRISITS, M., MICHAEL, E., BACH, H., HOSTETTER, M., BOYER, K., SIMPSON, R., HOLFELS, E., HOPKINS, J., MACK, D., METS, M. B., SWISHER, C. N., PATEL, D., ROIZEN, N., STEIN, M., WITHERS, S., MUI, E., EGWUAGU, C., REMINGTON, J. G., DORFMAN, R., McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin. Infect. Dis*. 23(5): 1055-60, 1996.

- WALLON, M., DUNN, D., SLIMANI, D., GIRAULT, V., GAY-ANDRIEU, PEYRON, F. Diagnosis of congenital toxoplasmosis at birth: what is the value of testing for IgM and IgA. *Eur J Pediatr* 158 (8):645-649, 1999.
- WALTERSPIEL, J. N., MORROW, A. L., GUERRERO, M. L., RUIZ-PALACIOS, G. M., PICKERING, L. K. Secretory anti-*Giardia lamblia* antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. *Pediatrics* 93:28-31, 1994.
- WESTERMEIER R & NAVEN T. Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis. Darmstadt-German: Wiley-VCH Verlag-GmbH Press; 2002.
- WILLIAMS, R. C. & GIBBONS, R. J. Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science* 177: 697-9, 1972.
- WILSON, C. B., REMINGTON, J. S. What can be done to prevent congenital toxoplasmosis? *Am J Obstet Gynecol* 15,138(4):357-63, 1980.
- WOLF, A., COWEN, D. Granulomatous encephalomyelitis due to an encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. *Bull. Neurol. Inst.* 6: 306-371, 1937.
- WOLOSCHAK, GE & KRICO, CJ. Regulation of κ/λ immunoglobulin light chain expression in normal murine lymphocytes *Mol Immunol* 24(7) 751-757, 1987.
- WONG, S. Y., HAJDU, M. P., RAMIREZ, R., THULLIEZ, P., MCLEOD, R., REMINGTON, J. S. Role of specific immunoglobulin E in diagnosis of acute *Toxoplasma* infection and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 31:2952-9, 1993.
- YOO, E. M. & MORRISON, S. L. IgA: An immune glycoprotein. *Clin Immunol* 116: 3 – 10, 2005.
- ZHOU, X. W., BLACKMAN, M. J., HOWELL, S. A., CARRUTHERS, V. B. Proteomic analysis of cleavage events reveals a dynamic two-step mechanism for proteolysis of a key parasite adhesive complex. *Mol. Cell Prot* 36: 565-75, 2004.

**FACULDADE DE MEDICINA DE CAMPOS (FMC)
FUNDAÇÃO BENEDITO PEREIRA NUNES (FBPN)**

CEP FMC/FBPN nº 027/07.

Campos dos Goytacazes, 05 de dezembro de 2007.

Do Coordenador do CEP da FBPN/FMC

A Sr^a. Pesquisadora : Lilian Maria Garcia Bahia de Oliveira

Assunto: Parecer sobre Projeto de Pesquisa.

Sra. Pesquisadora,

Informo a V.s^a, que o Comitê de Ética em Pesquisa constituído nos termos das Resoluções nº 196/96 do Conselho nacional de Saúde e devidamente registrado no Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa (**folha de rosto nº 164525**), intitulado "**IgA fecal como ferramenta imunoepidemiológica para estudar a prevalência da infecção toxoplásmica em crianças de 0 a 4 anos expostas a alto risco de contaminação pelo Toxoplasma gondii**" e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Como resultado desta análise e com base nas resoluções nº 196/96 e nº 340/2004, o referido projeto de pesquisa foi **APROVADO**.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Israel Nunes Alecrin
Coordenador do CEP da FBPN/FMC


Dr. Israel Nunes Alecrin
Coordenador do CEP
Comitê de Ética em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO Livre e Esclarecido

Eu,.....respondendo por mim e pelo(s)

menor(es).....

.....recebi informações sobre o projeto de pesquisa intitulado "IgA Fecal como Ferramenta Imunoepidemiológica para estudar a prevalência da Infecção Toxoplásmica em Crianças de 0 a 4 anos Expostas a Alto Risco de Contaminação pelo *Toxoplasma gondii*", estou ciente de que as informações obtidas por este tipo de pesquisa podem auxiliar na compreensão dos mecanismos que envolvem a Toxoplasmose. Concordo em participar e permitir que o(s) menor (es) participe como voluntário no referido projeto de pesquisa desenvolvido na Universidade Estadual do Norte Fluminense. A minha participação é voluntária e será limitada à doação de amostras de sangue venoso (no máximo cinco mililitros), amostras do meu próprio leite (no máximo 10ml) e amostras de fezes minha e do(s) menor (es), sobre os quais recebi a orientação dos possíveis riscos e desconfortos. Tais desconfortos podem ser pequena dor no momento da picadura e a formação de hematomas, após a coleta do sangue. Tenho consciência que a minha participação e a do(s) menor (es) como voluntário não trará nenhum benefício financeiro. No entanto, conhecer a minha sorologia para toxoplasmose traz-me o benefício de poder planejar, caso eu seja imune, visitas regulares a oftalmologistas para acompanhamento. Bem como estou consciente de que conhecer a condição de imunidade ao *Toxoplasma gondii* previamente à gravidez traz o benefício da orientação de prevenção da infecção congênita (isto é, durante a gravidez) necessária em pacientes não imunes. Caso eu concorde em participar como voluntária neste projeto de pesquisa, os meus dados não serão revelados a ninguém e a minha identidade será preservada. Somente a coordenadora do projeto, uma servidora técnica e uma aluna de mestrado terão acesso aos meus dados. Sei também que para preservar minha identidade, serão utilizados códigos, ao invés de nomes, durante todas as etapas do estudo.

Fui informada de que não devo esperar resultados imediatos ou pessoais a não ser o do diagnóstico sorológico, e que poderei a qualquer momento me retirar do projeto de pesquisa, por qualquer motivo, sem que isso acarrete em prejuízo à continuidade do meu acompanhamento médico como também a nenhum outro paciente do meu convívio ou membro de minha família. Estou ciente que as amostras que forneci, para o referido projeto de pesquisa serão armazenadas ou eliminadas, segundo minha autorização expressa no termo de consentimento para estocagem e uso futuro de espécimes coletados.

Qualquer dúvida dirigir-se ao Laboratório de Biologia do Reconhecer (UENF) ou aos pesquisadores envolvidos referidos abaixo:

Professora Lílian Maria Garcia Bahia Oliveira

Telefone: (22)27261400

Mestranda Bianca Magnelli

Telefone: (22)27261627

Campos dos Goytacazes, _____ de _____ de 20__

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador responsável

**Consentimento para Estocagem e Uso Futuro de Espécimes Coletadas com
Autorização do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa)**

Caso as amostras que eu forneci para o projeto de pesquisa intitulado, "IgA Fecal como Ferramenta Imunoepidemiológica para estudar a prevalência da Infecção Toxoplásmica em Crianças de 0 a 4 anos Expostas a Alto Risco de Contaminação pelo *Toxoplasma gondii*", não seja totalmente utilizado, eu autorizo que o restante seja:

- Eliminado
- Destruído depois de ___ anos
- Armazenado e possa ser usado em futuras pesquisas com o mesmo propósito do atual projeto de pesquisa
- Armazenado e possa ser usado em pesquisas futuras de qualquer tipo
- Armazenado indefinidamente
- Armazenado somente com autorização do CEP

Quero que minha identidade seja:

- Removida do material restante
- Mantida no material restante

NOME DO PARTICIPANTE :

P:

ID:

ASSINATURA DO PARTICIPANTE : _____

NOME DO RESPONSÁVEL : _____

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL : _____

NOME DA TESTEMUNHA :

ASSINATURA DA TESTEMUNHA : _____

DATA: ____/____/____.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)