

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

Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra os
isótipos IgM e IgG de *Alouatta guariba clamitans*: aplicação no
diagnóstico sorológico da toxoplasmose em animais de vida livre
e mantidos em cativeiro

HERCÍLIO HIGINO DA SILVA FILHO

UBERLÂNDIA - MG

Mai - 2012

HERCÍLIO HIGINO DA SILVA FILHO

Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra os isótipos IgM e IgG de *Alouatta guariba clamitans*: aplicação no diagnóstico sorológico da toxoplasmose em animais de vida livre e mantidos em cativeiro

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

Áreas de concentração: Imunologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo

Coorientadora: Profa. Dra. Zelinda Maria Braga Hirano

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

UBERLÂNDIA - MG

Maio – 2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586p
2012 Silva Filho, Hercílio Higinio da, 1965-
 Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra os
 isótipos IgM e IgG de *Alouatta guariba clamitans*: aplicação no dia-
 gnóstico sorológico da toxoplasmose em animais de vida livre e man-
 tidos em cativeiro / Hercílio Higinio da Silva Filho. -- 2012.
 109 f. : il.

Orientador: José Roberto Mineo.

Coorientadora: Zelinda Maria Braga Hirano.

Coorientador: Tiago Wilson Patriarca Mineo.

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

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Parasitologia - Teses. 3. Toxoplasmose
em animais - Diagnóstico - Teses. 4. Guariba (Macaco) - Teses. I. Mi-
neo, José Roberto. II. Hirano, Zelinda Maria Braga. III. Mineo, Tiago
Wilson Patriarca. IV. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. V. Título.

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas
- E-Mail: colpe@ufu.br - Telefex: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333



Hercílio Higino da Silva Filho

"Produção de anticorpos monoclonais murinos dirigidos contra os isótipos IgM e IgG de *Alouatta guariba clamitans*: aplicação no diagnóstico sorológico da toxoplasmose em animais de vida livre e mantidos em cativeiro"

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 18 de maio de 2012.

Prof. Dra. Solange Maria Gennari
USP/SP

Prof. Dra. Deise Aparecida de O. Silva
ICBIM/UFU

FAMEX/UFU

Prof. Dr. André Luiz Quagliotto Santos

ICBIM/UFU

Prof. Dra. Fernanda Maria Santiago

Prof. Dr. José Roberto Mineo – orientador
ICBIM/UFU

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia, com auxílio financeiro da Universidade Regional de Blumenau, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Com amor dedico este trabalho a minha
querida esposa Rosana e ao nosso filho
Davi.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, Mestre maior que me ilumina e ampara, capacitando-me para seguir o caminho de novos aprendizados e conquistas.

Aos meus pais, Hercílio e Varlene que dedicaram a vida à educação dos filhos, com exemplos de amor, trabalho e fé.

Aos meus avós Tilinho, Júlia, Izidro e Joaquina (*in memorian*) pelo amor singelo e incondicional.

Aos meus tios Valmir, Valter, Vailto e a minha sogra Deusdedith (*in memorian*) pelo convívio, carinho e ensinamentos que deixaram.

Ao meu cunhado e amigo Mauro Scharf, pelo apoio familiar e agradável convivência.

Aos meus irmãos Hercilene, Maurício, Márcio e Daniel pela amizade e a formação de uma família.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Roberto Mineo, por sua eterna amizade, paciência e dom, e por me acolher e ajudar com precisas pontuações dando-me confiança e suporte científico.

Aos coorientadores Prof^a Dra. Zelinda Maria Braga Hirano e Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo pelo profissionalismo e pelas valiosas contribuições.

À Universidade Regional de Blumenau, especialmente aos colegas do Departamento de Ciências Naturais, pelo incentivo e permissão da minha saída para o doutorado.

À Profª Dra. Keila Zaniboni Siqueira Batista, pela amizade e apoio ao assumir as disciplinas de minha responsabilidade junto a FURB no período do afastamento.

Ao Médico Veterinário, Júlio César de Souza Júnior, pelo manejo e respeito com os animais utilizados nesse trabalho, pelo auxílio nas coletas de materiais e pela amizade.

À Profª Dra. Juliane Araújo Greinert Goulart, pelo apoio, incentivo e preciosa amizade.

Ao Médico Veterinário Paulo H. de Castro do Centro Nacional de Primatas – CENP, pelo auxílio na captura dos bugios não cativos.

Aos docentes da UFU: Profª Dra. Eloísa Amália Vieira Ferro (Laboratório de Fisiologia da Reprodução), Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi (Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica), Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva (Laboratório de Tripanosomatídeos), Prof. Dr. Fábio de Oliveira (Laboratório de Biofísica) e Prof. Dr. Luiz Goulart Filho (Laboratório de Genética Molecular), pelo uso de seus laboratórios em algum momento dos trabalhos dessa tese.

Aos docentes pesquisadores do Laboratório de Imunoparasitologia: Profª. Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, Profª. Dra. Fernanda Maria Santiago, Prof. Dr. Jair Pereira Cunha Júnior, Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva, Profª. Dra. Mônica Sopelete, pelo bom convívio, valiosas conversas e sugestões científicas.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia: Cristina Rostkowska, Álvaro Ferreira Júnior, Fernando Reis de Carvalho, Arlindo Macedo Júnior, Fernanda Pantaleão, Silas Santana, Caroline Martins, Ana Carolina Moraes, Dâmaso Pacheco Ribeiro, Mariana Damas, pela alegre convivência e amizade.

À doutoranda Priscila Silva Franco do Laboratório de Fisiologia da Reprodução, pelo auxílio na técnica de imunohistoquímica.

Aos técnicos de laboratório: Dra. Ana Cláudia Marquez Pajuaba, Marley Dantas Barbosa, Zilda Mendonça Cardoso e Edilge Gouveia pelo auxílio na preparação de materiais, pela disposição e amizade.

Aos técnicos administrativos Max Aor Marques, Luceleide Freitas Queiroz Damásio e Lucélia da Costa Assis pela presteza e competência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – ICBIM - UFU, pela contribuição para a minha formação acadêmica.

A todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização desse trabalho.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
I – INTRODUÇÃO.....	22
II – OBJETIVOS.....	38
III – MATERIAL E MÉTODOS.....	41
III.1 – ANIMAIS E LOCAL DE COLETA.....	41
III.2 – COLETA DE AMOSTRAS DE ANIMAIS DE VIDA LIVRE.....	43
III.3 – COLETA DE AMOSTRAS DE ANIMAIS CATIVOS.....	45
III.4 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	46
III.5 – CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO.....	47
III.6 – <i>DOT-BLOTING</i> DE IgG E IgM PURIFICADAS DE BUGIO.....	48
III.7 – PRODUÇÃO DE MONOCLONAL DE ANTI-IgM E ANTI-IgG DE BUGIO.....	49
III.8 – ELISA E <i>DOT-BLOTING</i> PARA SELEÇÃO DOS MONOCLONAIS.....	50
III.8.1 – ELISA Direto.....	50
III.8.2 – <i>Dot-Blotting</i>.....	51
III.8.3 – <i>Western-blotting</i> para IgG de macaco bugio.....	52
III.9 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DOS AcMo.....	52
III.10 – ENSAIOS SOROLÓGICOS.....	53

III.10.1 – ELISA Indireto com Conjugado de Afinidade.....	53
III.10.2 – ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo.....	54
III.10.3 – ELISA Indireto com Anticorpo Monoclonal Homólogo.....	55
III.10.4 – Cálculo do Índice ELISA (IE).....	56
III.10.5 – RIFI.....	57
III.10.6 – Imunoturbidimetria.....	57
III.10.7 – Imunohistoquímica.....	58
III.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
IV – RESULTADOS.....	61
IV.1 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	61
IV.2 – CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO.....	64
IV.2.1 – Fracionamento e Purificação de Anticorpos IgM de Bugios.....	64
IV.3 – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IgM DE BUGIO.....	67
IV.4 – REATIVIDADE CRUZADA.....	70
IV.5 – RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS.....	72
IV.5.1 – ELISA Indireto com Conjugado de Afinidade.....	72
IV.5.2 – ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo Anti-IgM de Rhesus.....	74
IV.5.3 – ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo Anti-IgG de Rhesus.....	76
IV.5.4 – ELISA Indireto com Anticorpo Monoclonal AL1B4.....	78
IV.5.5 – Reação de Imunofluorescência Indireta Utilizando o Anticorpo Monoclonal AL1B4.....	80
IV.5.6 – Imunoturbidimetria para Anticorpos IgM de Bugio Utilizando o Anticorpo Monoclonal AL1B4.....	82

IV.5.7 – Imunohistoquímica.....	84
V – DISCUSSÃO.....	87
VI – CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ACF	Adjuvante Completo de Freund
AIF	Adjuvante Incompleto de Freund
Ag	Antígeno
BSA	Albumina de Soro Bovino
°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
CEPESBI	Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay).
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
HAT	Meio de Cultura Hipoxantina, Aminopterina e Timidina
HT	Meio de Cultura Hipoxantina e Timidina
HRP	Enzima “Horseradish Peroxidase”
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
H₂SO₄	Ácido Sulfúrico
IE	Índice ELISA
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	kiloDaltons
M	Molar
AcMo	Anticorpo Monoclonal
2ME	2β-mercaptoetanol
mg	Miligrama

μg	Micrograma
μL	Microlitro
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
OPD	Orto-fenil-diamina - “o-phenylenediamine dihydrochloride”
PBS	Salina Tamponada com Fosfato (“Phosphate Buffered Saline”)
PBS-T	Solução Salina Tamponada contendo Tween 20 0,05%
PBS-T-M	PBS-T acrescido de Leite desnatado 1%
rpm	Rotações por Minuto
RPMI	Meio de Cultura de Células desenvolvido no Roswel Park Memorial Institute (1969)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
STAg	Antígeno Solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i>
T20	Tween 20
TBE	Tampão Tris (0,89M) /Acido Bórico (0,89M) /EDTA (0,02M)

RESUMO

RESUMO

A União Internacional para Conservação da Natureza coloca o *Alouatta guariba clamitans*, bem como outras espécies do gênero *Alouatta*, na *Red List of Threatened Species* em situação vulnerável. Testes sorológicos envolvendo animais selvagens possuem limitações devido à dificuldade de se obter reagentes imunológicos espécie-específicos. A soropositividade pode variar conforme o conjugado utilizado: heterólogo, homólogo ou de afinidade, tanto em reação imunoenzimática como teste de imunofluorescência. O presente estudo foi realizado no Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia-MG. Nós produzimos um anticorpo monoclonal contra o isotipo IgM de *Alouatta guariba clamitans* (macaco bugio) e verificamos a soropositividade, para *Toxoplasma gondii*, de animais mantidos em cativeiro científico e de vida livre da cidade de Indaial-SC, Brasil. Com o uso do anticorpo monoclonal AL1B4 dois animais de cativeiro apresentaram soropositividade pelos métodos de ELISA (7,7%) e RIFI (7,7%). Foi constatada a ocorrência de infecção por *T. gondii* em 58,3% dos animais, conforme expresso pela detecção de anticorpos IgG e 5,6% desta população foi detectada para IgM anti-*T. gondii*. Pela imunoturbidimetria observou-se maior concentração de IgM em dois animais soropositivos que também foram positivos pela técnica da imunohistoquímica. O anticorpo monoclonal desenvolvido mostrou ter sensibilidade adequada para ser utilizado em imunoensaios podendo ser utilizado para o diagnóstico de outras doenças infecciosas, prejudiciais para os primatas não-humanos.

ABSTRACT

ABSTRACT

The International Union for Conservation of Nature includes the *Alouatta guariba clamitans*, as well as other species of the genus *Alouatta*, in the Red List of Threatened Species, considering them vulnerable. Serological assays involving wild animals have limitations due to the difficulty of obtaining immunological species specific reagents. Seropositivity may vary depending upon the conjugate used: homologous, heterologous or affinity immunoenzymatic and immunofluorescence assays. This study was conducted at the Laboratory of Immunoparasitology of the Federal University of Uberlândia-MG. We produced a monoclonal antibody against IgM isotype howler monkey (*Alouatta guariba clamitans*) and verify the positivity, to *Toxoplasma gondii*, in captivity and free-living animals from the town Indaial, S.C., Brazil. Using the monoclonal antibody AL1B4, two captive animals showed seropositivity for *T. gondii* by ELISA (7.7%) and IFA (7.7%). The occurrence of infection with *T. gondii* was found in 58.3% of the animals, as expressed by the detection of IgG while 5.6% of this population was detected for IgM anti-*T. gondii*. By immunoturbidimetry a higher concentration of IgM was shown in two seropositive animals that were also positive by technique of immunohistochemistry. The monoclonal antibody showed to have a sensitivity suitable for the use in immunoassays and also could be used for the diagnosis of other infectious diseases, harmful to non-human primates.

I – INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

I.1 – Primata (*Alouatta guariba clamitans*)

Os primatas do Novo Mundo são um grupo diversificado de mamíferos Neotropicais que surgiram na América do Sul há cerca de 26 milhões de anos. São descendentes de ancestrais que habitavam o continente africano no período Eoceno. Os ancestrais da família Atelidae surgiram há 12,4 milhões de anos o que faz com que essa família seja a mais jovem dos primatas do Novo Mundo (SCHRAGO, 2007).

Registros mencionam que esses ancestrais africanos migraram para o continente americano através de troncos secos ou massas vegetais flutuantes ou por natação e ocupação de pequenas ilhas que foram sendo formadas durante o período de separação dos dois continentes. Cogita-se ainda a possibilidade da migração desses animais através da Antártica. Entretanto, essa hipótese tem poucos apoiadores devido a falta de ligação terrestre entre a Antártica e América do Sul (MOREIRA et al., 2010).

O primata do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 é considerado monofilético. Apresenta uma ampla distribuição geográfica na região Neotropical, ocorrendo desde o Estado de Vera Cruz, no México, até o Estado do Rio Grande do Sul, no Brasil e Corrientes, na Argentina (CABRERA, 1940; CRESPO, 1954). Esta distribuição geográfica engloba um número variado de formações vegetais e diversos biomas da América do Sul e da América Central. As primeiras espécies de *Alouatta* foram descritas por Linnaeus em 1766 e incluídas no gênero *Simia* Linnaeus. Posteriormente, outros autores descreveram muitos táxons utilizando-se de nomes variados para se

referir aos macacos bugios. A partir do final do século XIX, o nome *Alouatta* foi aceito, estabilizando a nomenclatura para o gênero, enquanto o número de táxons do grupo da espécie elevou-se com a descrição ininterrupta de forma ao longo de toda sua história taxonômica. Em 1958, Cabrera, em seu catálogo dos mamíferos sul-americanos, considerou 14 táxons para *Alouatta*, em cinco espécies. Hill (1960) baseou-se na coloração da pelagem e secundariamente em outros aspectos da morfologia geral para a definição dos táxons. Desde então, o gênero *Alouatta* tem sofrido pequenas revisões na tentativa de esclarecer sua taxonomia e nomenclatura, com melhor tratamento dos dados biométricos mediante testes estatísticos, e com o emprego de caracteres moleculares e citogenéticos complementares aos morfológicos, para as proposições de relações de parentesco e a definição dos táxons. Ocorrem no Brasil 10 espécies de *Alouatta*. São elas: *Alouatta caraya* (Humboldt, 1812), *A. fusca* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), *A. clamitans* Cabrera, 1940, *A. belzebul* (Linnaeus, 1766), *A. discolor* (Spix, 1823), *A. ululata* Elliot, 1912; *A. juara* (Linnaeus, 1766), *A. macconnelli* (Humboldt, 1812), *A. puruensis* Lönnberg, 1941 e *A. nigerrima* Lönnberg, 1941 (GREGORIN, 2006).

Os bugios analisados nesse trabalho, taxonomicamente, pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe Mammalia, ordem Primates, subordem Haplorrhini, família Atelidae, gênero *Alouatta*, subespécie *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940. São conhecidos popularmente como bugio-ruivo e habitam área de Mata Atlântica, distribuídos em diferentes fisionomias vegetais, desde o Espírito Santo até o Rio Grande do Sul e o norte da Argentina (Fig. 1) (CABRERA, 1957; HIRSCH et al., 1991; GREGORIN, 2006)

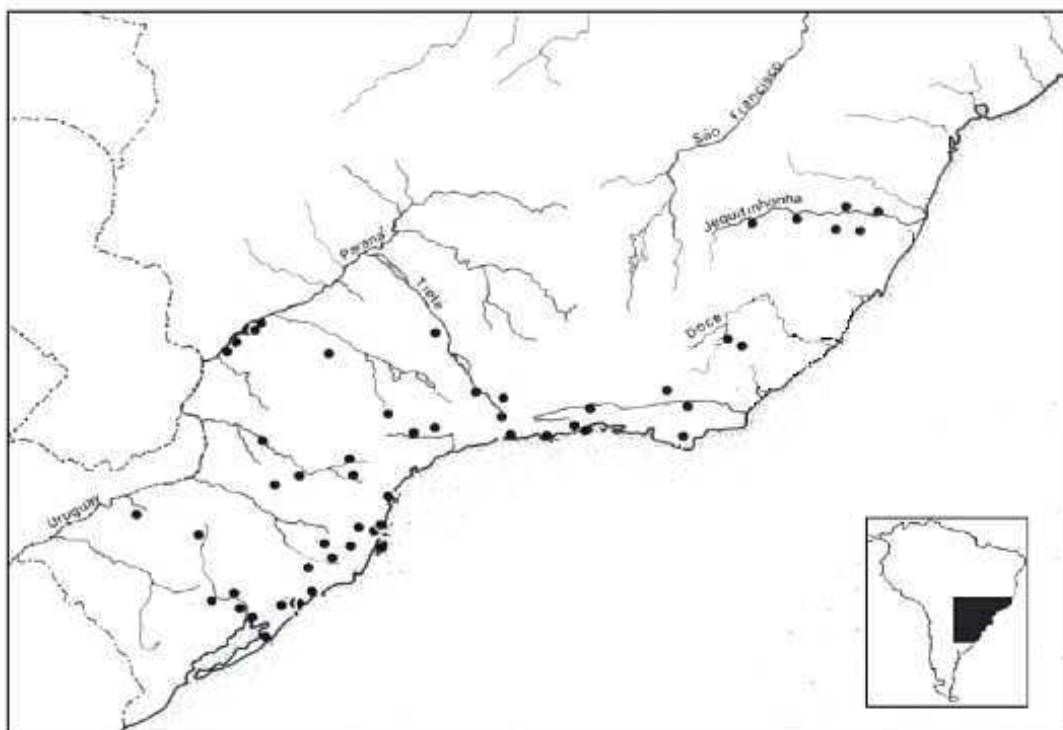


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica de *Alouatta guariba clamitans*, círculos escuros, no Brasil. (Modificado de GREGORIN, 2006).

Muitas espécies de primatas, incluindo as do gênero *Alouatta*, são consideradas ameaçadas, devido principalmente à fragmentação de seu habitat. O continuado processo de fragmentação leva à formação de manchas florestais dispersas que isolam grupos de primatas, dificultando ou impossibilitando o encontro com outros grupos animais existentes no habitat original (ARROYO-RODRIGUEZ; MANDUJANO, 2006).

Além disso, a fragmentação altera o microclima dentro e ao redor das manchas florestais com aumento da temperatura, da incidência de radiação e vento, e consequentemente a diminuição da umidade provocando mudanças na estrutura e composição da flora (LAURENCE et al., 1998).

A extração de produtos florestais leva a perda adicional de recursos alimentares importantes para os macacos. O *Alouatta* é vegetariano e entre as várias espécies de plantas que ingere destacam-se a *Albizia purpusii*, *Ampelocera hottlei* e *Aracairaia* sp (BICCA-MARQUES, 2003). Espécies pioneiras, como *Mimosa scabrella* e *Gochnatia polymorpha* e exóticas, como *Diospyrus kaki* e *Eryobothrya japonica* além de frutos e sementes também fazem parte da dieta dos bugios (MIRANDA; PASSOS, 2004; MORO-RIOS et al., 2008).

Os limites de habitat podem variar em estrutura e composição, normalmente são abruptos compostos principalmente de pastagens ou casas em zonas urbanizadas, com as fronteiras gradualmente compostas por vegetação em regeneração em estágios de crescimento diferentes (LAURENCE et al., 1998).

As pressões humanas sobre o habitat dos bugios se devem, principalmente, pela exploração de madeira, especulação imobiliária e caça. A entrada de humanos e seus animais em áreas ocupadas pelos primatas, mesmo sem caça direta, também exercem pressão negativa nas populações destes. Por exemplo, no Brasil e México moradores removem plantas e árvores, que fazem naturalmente parte da alimentação dos bugios, para permitir a agricultura e pecuária. A formação de áreas de fazendas, as quais possuem várias espécies de animais domésticos como ovinos, caprinos, suínos, aves, gatos e cães, que somados ao humano são potenciais introdutores de parasitas nesses nichos (ARROYO-RODRIGUEZ; DIAS, 2010).

Alouatta guariba clamitans Cabrera, 1940 é o primata não-humano mais abundante no Estado de Santa Catarina. A espécie é caracterizada por animais de grande porte, longa pelagem, cauda prênscil, barba espessa e face nua. No Brasil são conhecidos pelo nome popular de guaribas, barbados ou gritadores (AURICCHIO,

1995). São animais arborícolas, sociais e vivem em grupos formados por indivíduos de ambos os sexos, de diferentes idades, com tamanho médio de 3,3 a 20,8 animais (NEVILLE et al., 1988; BICCA-MARQUES, 1991; MIRANDA et al., 2006). Apresentam dicromatismo sexual acentuado, sendo que os machos adultos possuem pelagem dorsal com tonalidades de vermelhos, desde o ruivo profundo ao ruivo-amarelado (avelã) e as fêmeas são escuras, com coloração da pelagem dorsal e membros castanho-enegrecidos a castanho-avermelhados (Fig. 2). O osso hióide é singular em *Alouatta*, quando comparado com outros primatas. A estrutura hióidea é desenvolvida e modificada em um aparato de ressonância (GREGORIN, 2006).

A União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) coloca a espécie, bem como outras espécies do gênero *Alouatta*, na Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas considerando-as em situação vulnerável na última década nesta região, com tendência a diminuir sua população (MARQUES, 2003; INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE- IUCN, 2011).



Figura 2. Fotografia de indivíduos, macho e fêmea, da subespécie *Alouatta guariba clamitans*, Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (SC). (Foto: Dra. Zelinda Hirano).

A manutenção dos bugios em cativeiro vem auxiliando na sua conservação, embora seja uma prática difícil em decorrência da falta de adaptação à dieta e porque muitos animais morrem no primeiro ano por causas muitas vezes não explicadas (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; SOUZA JUNIOR, 2007). Animais mantidos em cativeiro e/ou de vida livre expostos a ambientes humanos podem adquirir uma variedade de patógenos e tornarem-se vetores potenciais de várias doenças infecciosas virais, bacterianas, parasitárias e fúngicas, as quais são causas importantes de óbito em primatas. Pesquisas destacam que muitas zoonoses têm sido mantidas, ciclicamente, devido ao contato de primatas com humanos e seus animais domésticos (BAKER; SORAE, 2002; EKANAYAKE et al., 2004; SOUZA JUNIOR, 2007).

Diante do conhecimento de que muitas doenças acometem os primatas brasileiros, o Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA realiza mapeamento das ocorrências de doenças nas populações de vida livre e cativas de primatas. Uma base de dados está sendo formada pelo Centro de Proteção de Primatas Brasileiros e serve de indicativo para ações de conservação das espécies ameaçadas de extinção e para o manejo de populações selvagens envolvidas em ciclos epidemiológicos (VALENÇA-MONTENEGRO et al. 2005; CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS BRASILEIROS, 2011).

1.2 – Parasito (*Toxoplasma gondii*)

A descoberta do parasito *Toxoplasma gondii* deve-se aos pesquisadores Nicolle e Manceaux (1908), os quais encontraram um protozoário no tecido de um roedor

africano denominado *Ctenodactylus gundi*. Achava-se, inicialmente que o protozoário seria um piroplasma, entretanto, estudos posteriores determinaram que se tratava de um novo organismo. No Brasil, também em 1908, Splendore observou o mesmo parasita, erroneamente confundido com a *Leishmania*, em outro hospedeiro, o coelho. Hoje se sabe que *Toxoplasma* pode ser encontrado em várias espécies de animais, incluído humanos e primatas não humanos (FERGUSON, 2009).

T. gondii tem distribuição mundial e apresenta diversidade genética, sendo que algumas dessas variantes genéticas são encontradas, exclusivamente, no Brasil e outras distribuídas pelo mundo. A virulência de *T. gondii* varia conforme o hospedeiro, assim o parasita com baixa virulência em aves pode ser altamente virulento em camundongos, e, parasitas virulentos para camundongos necessariamente não gerariam processos patológicos similares em outros hospedeiros humanos ou não humanos (DUBEY, 2008).

Toxoplasma gondii pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Apicomplexa, classe Sporozoea, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidiia, subordem Eimeriina, família Sarcocystidae e gênero *Toxoplasma* (REY, 2001).

Este parasita se apresenta com um formato de lua crescente de 2-6 µm com um grande núcleo central (Fig. 3). Seu ciclo de vida é constituído por uma fase assexuada, que se passa na maioria dos animais, e uma fase sexuada, que acontece nos felinos (Fig. 4). Ao longo de todo este ciclo, há três formas infectivas: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos são conhecidos por sua forma livre e proliferativa, e multiplicam-se rapidamente em células nucleadas dos hospedeiros intermediários e definitivos durante a fase aguda da infecção. Podem ser encontrados no sangue, secreções e grande variedade de tecidos. Somente sobrevivem algumas horas em

tecido animal morto. Os bradizoítos são consideradas formas de *Toxoplasma* em estado latente, sendo encontrados no interior de cistos em tecidos e estão presentes em infecções que podem ser congênita ou adquirida, crônica ou assintomática. Os cistos teciduais variam de tamanho que vão de 10 a 100 μm , aproximadamente, sendo que os mais jovens podem ser pequenos e conter somente dois bradizoítos em seu interior, enquanto os mais velhos podem conter milhares deles. O tamanho dos cistos também pode variar de acordo com a sua localização, sendo os encontrados no cérebro, geralmente, menores do que os encontrados no músculo esquelético. Fatores relacionados ao desenvolvimento da imunidade induzem a formação de cistos tissulares. São menos suscetíveis à destruição por enzimas proteolíticas do que os taquizoítos. O oocisto é a forma infectante proveniente da reprodução sexuada do parasita no interior das células do epitélio intestinal dos felinos. Os oocistos são eliminados nas fezes de felinos e são altamente resistentes, podendo sobreviver no ambiente por vários meses. Após a ingestão pelo hospedeiro intermediário, ocorre o processamento gástrico, os oocistos se rompem no intestino liberando os esporozoítos, que penetram e dividem-se rapidamente nas células intestinais, gerando taquizoítos, que invadem outras células do hospedeiro, atingindo os demais órgãos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998).

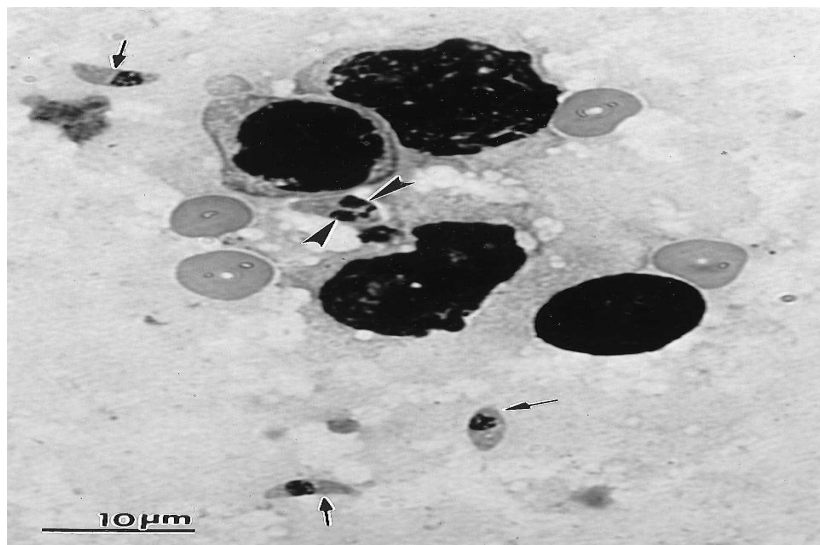


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de tecido pulmonar de felino mostrando taquizoítos de *T. gondii* (setas) (Fonte: DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998)

O ciclo assexuado tem lugar nos inúmeros hospedeiros intermediários e consiste em dois estágios de vida distintos, dependendo da fase da infecção. A fase aguda é decorrente da alta taxa de proliferação dos taquizoítos com conseqüente ativação de uma forte resposta inflamatória pelo hospedeiro. Os taquizoítos também são os responsáveis pela transmissão vertical para o feto via placenta. Sob pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítos diferenciam-se em bradizoítos (fase crônica), de multiplicação lenta e metabolismo baixo, que formam os denominados cistos teciduais. O desenvolvimento de cistos tissulares em vários locais do organismo infectado define a fase crônica do ciclo assexuado. São encontrados predominantemente no encéfalo, tecido hepático, músculo esquelético, tecido renal e músculo cardíaco. Na forma encistada, *T. gondii* pode permanecer pelo resto da vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória; eventualmente com a queda da resposta imune a forma cística é perdida e os taquizoítos podem ser gerados levando a

respostas inflamatórias diversas com danos teciduais graves, podendo causar a morte do hospedeiro. Os cistos tissulares são a fase terminal do ciclo assexuado nos hospedeiros intermediários e uma fonte importante de contaminação quando ingeridos na carne crua ou mal cozida de animais infectados, já que bradizoítos são resistentes às enzimas presentes no suco gástrico (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; DUBEY, 2008).

A fase sexuada ocorre somente em felinos, sendo o gato doméstico, do ponto de vista epidemiológico, o hospedeiro mais importante para a toxoplasmose humana e de outros animais. Na maioria das vezes o ciclo sexuada tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo, pela ingestão de carne de roedores, aves e outros animais como: ovinos, caprinos, suínos e bovinos, esses últimos abatidos na maioria das vezes pelo homem. Após a ingestão, vários ciclos das formas evolutivas do parasita sucedem-se até a geração de micro e macro gamontes, de cuja fusão resultam oocistos que serão eliminados com as fezes do hospedeiro e disseminados no ambiente, infectando mamíferos e aves quando ingeridos através da água ou alimentos. Estes liberam esporozoítos no aparelho digestivo que, então, infectam células epiteliais do intestino, dando origem aos taquizoítos da fase aguda da infecção (DUBEY, 2009; SOUZA et al., 2010).

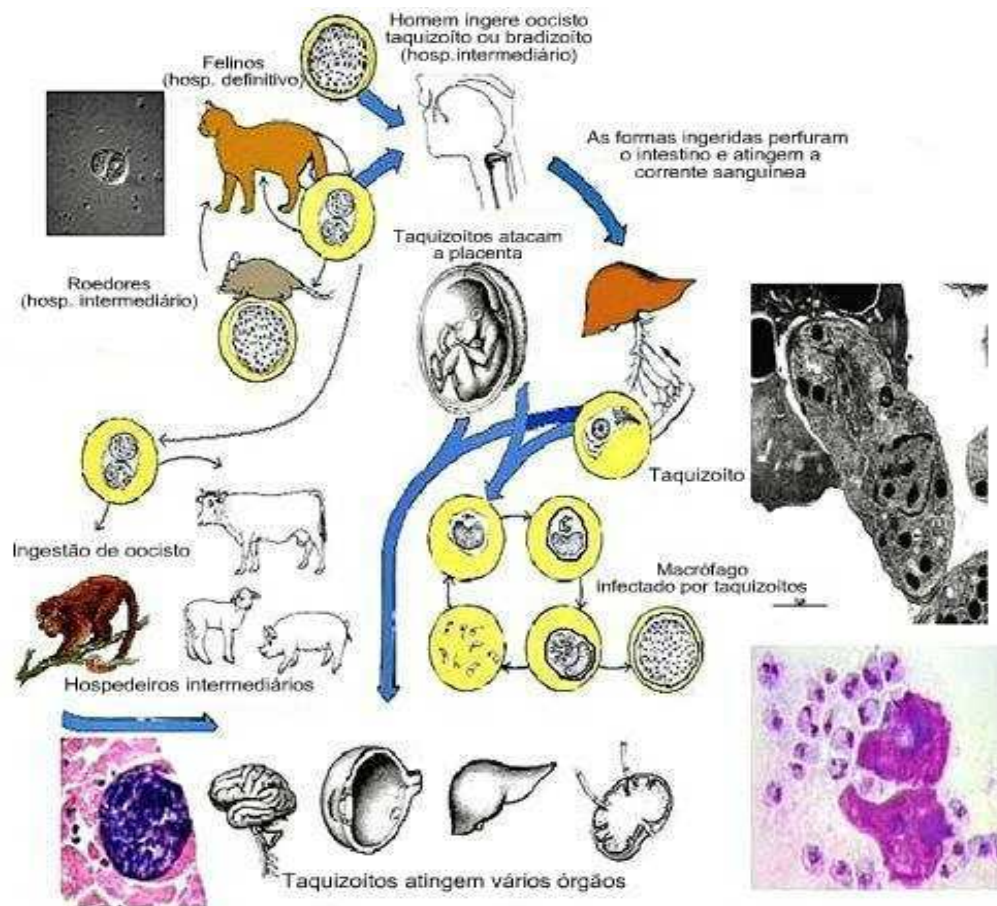


Figura 4. Ciclo evolutivo de *Toxoplasma gondii*. (Modificado de www.ebah.com.br/ABAAABP_OLA/toxoplasma)

Todas as três formas parasitárias, a saber, taquizoítos (formas de multiplicação rápida da fase aguda), bradizoítos (formas de multiplicação lenta, encontrada dentro de cistos tissulares) e esporozoítos (formas encontradas nos oocistos) são infectivas, tanto para os hospedeiros intermediários quanto para os hospedeiros definitivos. As formas de transmissão incluem a via congênita (transplacentária), a via fecal-oral pela ingestão de oocistos presentes em alimentos ou água contaminada com fezes de felinos e o carnivorismo pela ingestão de carne crua ou mal cozida (DUBEY, 2008).

O carnivorismo explica a transmissão de *T. gondii* em animais que ingerem carne, mas não explica ou não elucida a transmissão de *T. gondii* em animais exclusivamente vegetarianos. Um dos primeiros estudos a abordar esse aspecto foi um estudo realizado em Bombaim, na Índia, onde foi encontrada prevalência de *T. gondii* em humanos que eram vegetarianos estritos, relacionando esses resultados com os não-vegetarianos estritos, os quais tiveram resultados similares de infecção (Rawal (1959) *apud* DUBEY, 2009). Em 1965 Hutchison descobriu que *T. gondii* tinha capacidade de infectar por via oral outros animais, quando esses ingeriam alimentos ou água associados com fezes de gato. Esta descoberta foi um avanço importante, porque até então, as formas conhecidas de *T. gondii*, taquizoítos e bradizoítos, eram mortas pela água. Mas finalmente, em 1970, o conhecimento do ciclo de vida de *T. gondii* foi concluído pela descoberta da fase sexual do parasita no intestino delgado do gato. Os oocistos de *Toxoplasma gondii*, produto de esquizogonia e gametogonia, foram encontrados em fezes de gato e caracterizados morfolologicamente e biologicamente (HUTCHISON et al., 1971).

As respostas imunes associadas à infecção por *T. gondii* variam de acordo com o tipo de cepa, evolução clínica da doença, da idade, sexo, e da espécie do hospedeiro. As respostas locais e sistêmicas podem variar entre os indivíduos, sendo que a resposta imune parece depender fortemente da base genética e do estado imune do hospedeiro. Semelhante à infecção natural nos seres humanos, em outros animais a maioria dos casos passa despercebido ou sinais e sintomas só se desenvolvem semanas após a infecção. Pesquisas têm sido realizadas para esclarecer as respostas imunológicas a *T. gondii* em humanos e outras espécies animais. No estudo de respostas imunes a patógenos intracelulares geralmente são utilizados modelos

murinos, no entanto não há um modelo único animal que contemple todas as situações clínicas observadas em humanos (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

1.3 – *Toxoplasma gondii* em primatas não humanos

As infecções causadas por *T. gondii* em primatas não-humanos têm sido descritas como processos agudos com grau de morbidade variável e dependente da espécie do primata e há relatos de que os primatas do Novo Mundo são mais susceptíveis as infecções do que os do Velho Mundo (EIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003). A soroprevalência pode variar conforme o tipo de teste sorológico utilizado, a diluição inicial, a espécie do primata e a sua origem (EKANAYAKE et al., 2004).

No Brasil, trabalhos com *T. gondii*, associados à infecção de primatas do gênero *Alouatta*, são normalmente voltados a estudos sorológicos por microaglutinação. A espécie *Alouatta caraya* é a mais estudada a nível histoquímico e sorológico com grau de produção de anticorpos totais anti-*T. gondii* variável (GARCIA et al., 2005).

Devido a sinais clínicos inespecíficos, a hipótese diagnóstica de toxoplasmose em primatas de cativeiro e silvestres deve ser confirmada laboratorialmente. Os sinais clínicos são diversos e podem ser facilmente confundidos com sinais clínicos de outros processos patológicos, por isso se faz necessário o diagnóstico laboratorial periódico para doenças infecciosas, e particularmente a toxoplasmose (BOUER et al., 2010).

Testes sorológicos envolvendo animais selvagens possuem limitações devido à dificuldade de se obter reagentes imunológicos espécie-específicos. A soropositividade pode variar conforme o conjugado utilizado: heterólogo, homólogo ou de afinidade, e

isso tanto para ensaios imunoenzimáticos (ELISA) como para reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (SILVA et al., 2005).

Os recentes aumentos na magnitude e taxa de mudanças ambientais, incluindo a perda de habitat, alterações climáticas e sobre-exploração, têm sido diretamente ligada à perda global de biodiversidade. As taxas de extinção da vida selvagem são estimadas entre 100 a 1000 vezes maior do que a normal histórica, e até 50% dos grupos taxonômicos superiores estão criticamente em perigo (CHAPIN et al., 1998). Embora muitos tipos de mudanças ambientais ameacem a sobrevivência de espécies em todo o planeta, as doenças infecciosas raramente têm sido citadas como a principal causa de extinções de espécies globais. No entanto, há evidências substanciais de que as doenças podem afetar muito as espécies de populações locais, causando danos temporários ou permanentes. Um dos parâmetros mais importantes a se considerar é o grau de interação dos patógenos com outros fatores determinantes, tais como perda de habitat, alterações climáticas, sobre-exploração de recursos, espécies invasoras e poluição ambiental, de modo a contribuir para a extinção local e global de espécies. Os patógenos podem ser uma ameaça significativa para espécies que já estão em processo de extinção. Identificar estratégias de controle de determinados patógenos pode ajudar a reduzir os efeitos negativos da doença sobre a vida selvagem possibilitando a discussão crítica e levantamento de estratégias que possibilitem o manejo e a conservação das espécies ameaçadas (SMITH; ACEVEDO-WHITEHOUSE; PEDERSEN, 2009).

Muitos dos bugios levados para Centros de Conservação Animal ou para zoológicos morrem no período de um a dois anos, em consequência de uma resposta imune inapropriada ou suprimida e, freqüentemente, associada a infecções

generalizadas em conjunto com situações de estresse. Isso dificulta a manutenção desses animais em cativeiro e sua posterior reintrodução em ambiente silvestre. A obtenção de ferramentas imunológicas como anticorpos monoclonais e o uso das já existentes para animais ameaçados como os primatas não humanos e particularmente *A. guariba clamitans*, facilitará o mapeamento de zoonoses e o acompanhamento clínico veterinário das alterações de parâmetros normais de respostas imunes, preservando a saúde animal e humana.

II – OBJETIVOS

II – OBJETIVOS

II.1 – Geral

Produzir anticorpos monoclonais dirigidos contra os isótipos IgM e IgG de *Alouatta guariba clamitans* visando o estudo de processos infecciosos nesses animais submetidos a condições de cativeiro ou em ambiente silvestre.

II.2 – Específicos

- 1 – Isolar por fracionamento em colunas de afinidade e gel filtração, IgG e IgM de bugio, respectivamente.
- 2 – Produzir anticorpos monoclonais contra IgM e IgG de bugios.
- 3 – Utilizar anticorpos monoclonais contra IgG e IgM de bugio em técnica de ELISA Indireto e Imunofluorescência Indireta (RIFI) para quantificar anticorpos de bugios infectados com *Toxoplasma gondii*.
- 4 – Verificar soropositividade de macacos bugios de cativeiro e de ambiente silvestre, utilizando anticorpos monoclonais anti-IgM e anti-IgG de bugio, comparando-se com anticorpos policlonais anti-IgM e anti-IgG de macaco Rhesus.

5 – Verificar o uso do conjugado proteína G-Peroxidase como ferramenta imunológica para diagnóstico sorológico de toxoplasmose em macacos bugios.

6 – Quantificar IgM e IgG de bugios utilizando-se técnica de Turbidimetria.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III – MATERIAL E MÉTODOS

III.1 – ANIMAIS E LOCAL DE COLETA

Os primatas utilizados nesse estudo são da subespécie *Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940, do Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI) e Observatório de Primatas do Morro Geisler localizado no Município de Indaial, Estado de Santa Catarina (Fig. 5).

O CEPESBI foi criado através da Lei Municipal nº 2.099, de março de 1992 e é mantido por meio de convênio entre a Prefeitura Municipal de Indaial e a Fundação Universidade Regional de Blumenau - FURB.

No Centro, registrado como criadouro científico no IBAMA sob o nº 1/42/1998/000708-9, encontram-se bugios de ambos os sexos e diferentes faixas etárias trazidos por agentes do IBAMA ou pela Polícia Ambiental após apreensão em cativeiros não autorizados. Alguns animais chegam ao Centro trazidos pela população local quando são encontrados feridos após atropelamento ou eletrocução.

No CEPESBI é desenvolvido o “Projeto Bugio” que se trata de um amplo estudo científico da espécie *Alouatta clamitans*, denominada popularmente como bugio-ruivo. Nesse estudo animais cativos e de vida livre são avaliados sob diferentes aspectos desde os comportamentais até os de saúde, visando a preservação da espécie e a formação de grupos para reintrodução na natureza.

Além das atividades de pesquisa relacionadas a primatologia, como as coletas de dados científicos, são também desenvolvidas atividades de educação ambiental

junto a população que objetiva criar uma visão positiva da comunidade em relação aos primatas e a integração com os estudantes universitários e os pesquisadores.

Os bugios cativos recebem alimentação balanceada em dieta de quatro refeições diárias composta de ração canina, frutas, verduras e folhas de *Cecropia glazioui* e *Sechium edule*. Os recintos possuem troncos, cordas, pneus e brinquedos para que o animais desenvolvam atividades semelhantes àquelas dos não cativos. Além disso, há o acompanhamento veterinário de rotina visando o bem-estar e a saúde dos animais.

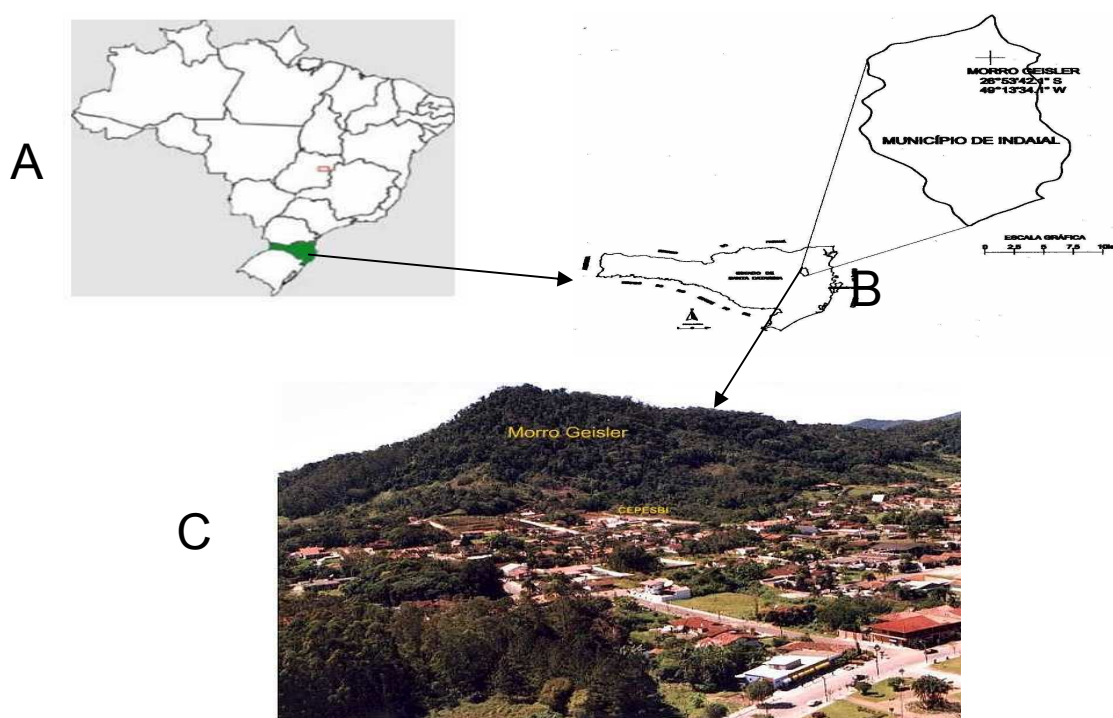


Figura 5. (A) Mapa do Brasil; (B) Mapa de Santa Catarina com a projeção do município de Indaial e as coordenadas do CEPESBI; (C) Vista do município de Indaial mostrando o morro do Geisler e, na sua base, Centro de Pesquisas Biológicas de Indaial (CEPESBI) [0,1 2653'42 "S e 4913'34 0,1" W]. (Fonte: modificado de HIRANO, 2004)

III.2 – COLETA DE AMOSTRAS DE ANIMAIS DE VIDA LIVRE

Em março de 2011 foi realizada a coleta de material de 10 primatas no Morro de Geisler, Município de Indaial. Os animais foram capturados com auxílio de dardos contendo anestésico (Tiletamina e Zolazepam 3,9 mg/kg) injetado por via intramuscular, utilizando-se uma carabina (Dist-Inject modelo 70) a ar comprimido, cedida pelo Ministério da Saúde. Foi coletado de cada animal 5 ml de sangue periférico da veia femoral (Fig. 6). Após a coleta o sangue foi encaminhado para a separação do soro do coágulo, ambos armazenados em freezer na temperatura de -20°C. Nenhum primata foi sacrificado no procedimento sendo todos devolvidos ao seu habitat natural (SOUZA JUNIOR, 2007; AGUIAR et al, 2007).

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética na Utilização de Animais na Pesquisa Científica da Fundação Universidade Regional de Blumenau - SC (Protocolo CEUA - FURB nº029/2007) e da Universidade Federal de Uberlândia - MG (Protocolo CEUA - UFU nº 001/2009).



Figura 6. Fotografias ilustrando a coleta de amostras dos animais de vida livre no morro Geisler- Indaial - SC [0,1 2653'42 "S e 4913'34 0,1" W]. (Foto: Dra. Zelinda Hirano)

III.3 – COLETA DE AMOSTRAS DE ANIMAIS CATIVOS

No período de abril de 2009 a dezembro de 2010, amostras de sangue de 26 bugios cativos do CEPESBI (Fig. 7) foram coletadas da veia braquial, no máximo 5 ml por animal, logo após estes serem anestesiados com a mistura de Tiletamina (25 mg/mL) e Zolazepam (25 mg/mL), injetada por via intramuscular (3,9 mg/kg de peso do animal). Após a coleta o sangue foi centrifugado a 500g por 15 minutos, e o soro foi guardado em freezer a -80°C até o uso.



Figura 7. Fotografia ilustrando a coleta de amostras dos animais de cativeiro. (Foto: Hercílio H. Silva Filho)

III.4 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Para a obtenção da IgG, um pool de amostras de soros de bugios foi diluído na proporção de 1:1 em tampão fosfato pH 8,0. A solução foi passada na coluna contendo a proteína G (sigma: P3296) e o *void* foi armazenado em freezer - 20°C para ensaios subseqüentes. A seguir, a coluna foi lavada várias vezes com tampão fosfato 0,1M pH 8,0 com monitoramento a 280nm até a obtenção da D.O. igual a solução de tampão fosfato. A eluição da coluna foi feita com tampão glicina-HCl 0,2M pH 2,5. As imunoglobulinas da classe IgG foram evidenciadas pela leitura das frações em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm e também pelo reativo de Bradford, utilizando-se 200 µl do reagente adicionados de 20 µl da amostra. O pH das amostras foi neutralizado com tampão Tris 0,5M pH 7,5. O material foi dialisado em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 7,5, dividido em alíquotas, liofilizado e armazenado em freezer - 20°C até uso (YAN et al., 2007; COLIGAN et al., 2007).

As amostras de IgG purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não-redutoras (SDS-PAGE), sendo empregado o gel de separação 8% e o gel de empilhamento a 5%, no sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Sistema Hoefer Mighty Small, San Francisco, EUA). As amostras foram solubilizadas em tampão de amostra SDS e submetidas a 100°C por 3 minutos. As imunoglobulinas foram eletroforéticamente separadas utilizando-se corrente fixa de 20 mA, por aproximadamente 90 minutos. Após a separação, o gel foi corado pelo Coomassie blue (CHEONG et al., 2007) e, posteriormente, digitalizado para a análise de imagens por programas computadorizados.

III.5 – CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

Com o *void* obtido da cromatografia de afinidade, procedeu-se a purificação da IgM, por cromatografia de exclusão de peso molecular, utilizando-se a resina Sephacryl S-300, em coluna de 60 cm por 1,5 cm de diâmetro; 1,5 mL da solução em tampão fosfato foram cromatografados por 6 horas a baixa pressão. Utilizou-se como tampão o bicarbonato de amônio 40 mM pH 7,5. A leitura das frações foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm e também pelo reativo de Bradford. As amostras foram aliquotadas, liofilizadas e armazenadas em freezer - 20°C até uso (COLIGAN et al., 2007). As proteínas purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não-redutoras (SDS-PAGE), sendo empregado o gel de separação 8% e o gel de empilhamento a 5%, no sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Sistema Hoefer Mighty Small). A amostra foi aquecida a 100°C por 3 minutos. As imunoglobulinas foram eletroforéticamente separadas utilizando-se corrente fixa de 20 mA, por aproximadamente 90 minutos. Após a separação, o gel foi corado pelo Coomassie blue (CHEONG et al., 2007).

Os componentes de peso molecular acima de 200 kDa oriundos da gel filtração foram tratados com 0,2 M de β -mercaptoetanol por 10 minutos a temperatura de 37°C e posteriormente separados em SDS-PAGE 8%, procedendo-se ao aquecimento por 100°C por 3 minutos, antes da aplicação. A eletroforese foi realizada utilizando-se corrente fixa de 20 mA, por aproximadamente 90 minutos. Após a separação, o gel foi corado pelo Coomassie blue (BUTCHKO; INMAN, 1972).

III.6 – DOT-BLOTTING DE IgG E IgM PURIFICADAS DE BUGIO

Para o *dot-blotting* das imunoglobulinas purificadas, preparações contendo 500 µg/mL de IgG ou IgM de bugios foram adicionadas sobre tiras de nitrocelulose (2,5 µL por ponto) em determinados pontos dentro de placas apropriadas. Como controle negativo utilizou-se uma proteína irrelevante, soro albumina bovina (BSA, Sigma). Após secar as tiras em estufa a 37°C, estas foram bloqueadas a temperatura ambiente com 500 µl de PBS-T-M (PBS-Tween 20 0,05%, leite desnatado 1%). Ao término desse tempo as tiras foram lavadas, 5 vezes com solução PBS-T (PBS-Tween 20 0,05%), em intervalos de 5 minutos. Após a última lavagem, um novo ciclo de incubação foi iniciado com a adição sobre as tiras de uma solução de 500 µl de anticorpo de cabra anti-IgG (KPL, Gaithersburg, EUA) ou anti-IgM (KPL, Gaithersburg, EUA) de macaco Rhesus, diluídos 1:1000 em PBS-T-M e incubados por uma hora a temperatura ambiente. Com o término da incubação as tiras foram novamente lavadas e 500 µl do conjugado anti-IgG de cabra marcado com peroxidase (Sigma) diluído 1:2000 em PBS-T-M, foram adicionados e incubados a temperatura ambiente por 1 hora. Finalizado esse período as tiras foram novamente lavadas com PBS, procedendo-se em seguida à revelação com DAB em tampão TBE pH 8,3 (Tris (0,89M) /ácido bórico (0,89M) /EDTA (0,02M) contendo H₂O₂ (HARLOW; LANE, 1988).

III.7 – PRODUÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-IgM E ANTI-IgG DE BUGIO

Com IgG e IgM purificadas de bugio obtidas pela cromatografia, camundongos BALB/c foram inoculados com uma solução contendo adjuvante completo de Freund (ACF), na proporção de 1:1 com 25 µg de proteína, procedeu-se a emulsão, perfazendo um volume final por inóculo de 0,2 mL. Posteriormente, seguiu-se 5 inóculos com intervalos de 15 dias e utilizando-se para a emulsão adjuvante incompleto de Freund. Três dias antes dos animais serem sacrificados foi feito um último inóculo da IgM ou da IgG. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, o baço exposto e macerado em meio de cultura RPMI sem soro fetal bovino (SFB). Em seguida o macerado esplênico foi centrifugado a 400g por 10 minutos, 4°C. Os esplénocitos viáveis foram fusionados às células tumorais (SP₂O) na proporção de uma célula SP₂O para cada 10 células esplênicas (YOKOYAMA et al., 2006). Com auxílio de polietilenoglicol 1500 50%, procedeu-se a fusão. Após, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI com 20% de SFB e cultivadas em garrafa de 75 mL por 18 horas. Transcorrido este período as culturas tiveram 50% do volume do meio substituídas por meio HAT. O meio foi trocado nos dias 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 e 13, subsequentes à primeira troca com meio HAT. No décimo quarto dia o meio foi trocado pelo meio HT por 18 horas. Os hibridomas foram posteriormente cultivados, por 48 horas, em meio RPMI 20% de SFB com antibióticos e antifúngico. Uma parte dos hibridomas foi aliquoteada e congelada em nitrogênio líquido para sua manutenção. Uma outra parte dos hibridomas foi semeada em placas de 96 poços, por 48 horas, pela técnica da diluição-limite, até isolar uma 01 célula no poço, em RPMI 20% de SFB com

antibióticos e antifúngico. Desta forma, inicialmente, foram isolados vários clones, os clones foram posteriormente crescidos em meio RPMI 20% de SFB e os sobrenadantes foram colhidos e testados pelo método ELISA. Os clones secretores e positivos anti-Ac de bugio, foram expandidos em garrafas de 25 mL e testados pela técnica de *dot-blotting*. Os clones selecionados foram congelados em nitrogênio líquido para sua manutenção (YOKOYAMA et al., 2006).

III.8 – ELISA E *DOT-BLOTTING* PARA SELEÇÃO DOS MONOCLONAIS

III.8.1 – ELISA Direto

Para ELISA foram utilizados os anticorpos purificados de bugios conforme a seleção IgM ou IgG de bugio. A reação foi iniciada pela adsorção de placas de fundo chato de baixa afinidade de 96 poços (Kartell, Milão, Itália) com 50 µl/poço de uma solução de IgM ou IgG na concentração de 15 µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas e posteriormente foram lavadas com PBS-T. Após o período os sobrenadantes de cultura dos clones selecionados foram incubados por 120 minutos a 37°C. Procedeu-se a uma nova série de lavagem das placas e a seguir foi adicionado o conjugado anti-IgG total de camundongo, marcado com peroxidase (Sigma A9044), diluído 1:2000 em PBS-T-M, incubado a 37°C por 60 minutos. Ao término desse período, as placas foram novamente lavadas e o substrato enzimático H₂O₂ contendo o cromógeno OPD (o-

phenylenediamine dihydrochloride) foi adicionado, 50 µl por poço, e incubado por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, em câmara escura. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi feita a 492 nm em leitor de microplacas (ARCE et al, 2002).

III.8.2 – *Dot-Blotting*

Após a seleção pelo ELISA, os sobrenadantes dos clones secretores e/ou AcMo purificado, por cromatografia de afinidade, foram testados por *dot-blotting*. Para a realização deste ensaio, preparações contendo 500 µg/mL de IgG ou IgM purificadas de bugios foram adicionadas sobre determinados pontos em tiras de nitrocelulose (2,5 µL por ponto). Como controle negativo utilizou-se uma proteína irrelevante, soro albumina bovina (BSA), e para o controle positivo utilizou-se IgG total de camundongo purificadas a partir de soro de camundongo passado em coluna contendo proteína G (sigma: P3296). Após secar as tiras em estufa a 37°C, estas foram incubadas com amostras de AcMo pelo método de ELISA, a reação foi realizada sob agitação e a temperatura ambiente por 18 horas. Ao término do período as tiras foram lavadas, 5 vezes, com solução de PBS-T. Posteriormente, as tiras foram incubadas com o conjugado anti-IgG total de camundongo, marcado com peroxidase (Sigma A9044), diluído 1:2000 em PBS-T-M. Após 2 horas procedeu-se à revelação com DAB (diaminobenzidina) em tampão TBE contendo H₂O₂ (HARLOW; LANE, 1988; CUNHA-JÚNIOR et al, 2010).

III.8.3 – *Western-blotting* para IgG de macaco bugio

As IgGs purificadas de bugios foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes e não-redutoras (SDS-PAGE), sendo empregado o gel de separação 8% e gel de empilhamento a 5%, utilizando o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Sistema Hoefer Mighty Small). A IgG foi eletroforéticamente separada utilizando-se corrente fixa de 20 mA, por aproximadamente 90 minutos. Terminado o período de corrida das amostras, as proteínas foram transferidas do gel de migração para uma membrana de nitrocelulose através da aplicação de corrente elétrica em cuba de eletrotransferência. Finalizada a transferência, as amostras fixadas no papel de nitrocelulose foram expostas, em placas para *Western-blotting*, ao conjugado anti-Fc γ de camundongo marcado com peroxidase (Sigma A0168), diluído 1:5000 em PBS-T-M por 1 hora a temperatura ambiente. Foram feitas três lavagens com PBS-T para retirada do excesso do conjugado. A revelação da banda ocorreu pela adição do DAB (diaminobenzidina) em tampão TBE contendo H₂O₂ (CHEONG et al., 2007).

III.9 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE PARA PURIFICAÇÃO DOS AcMo

Para a obtenção do monoclonal anti-IgM de bugio purificado, o sobrenadante de cultura do hibridoma positivo para o monoclonal anti-IgM de bugio foi passado, individualmente conforme cada monoclonal, na coluna contendo a proteína G (Sigma P3296). A seguir, a coluna foi lavada várias vezes com tampão fosfato pH 8,0 0,1M

com monitoramento a 280nm até a obtenção da D.O. igual à solução de tampão fosfato na sua forma original. A eluição da coluna foi feita com tampão glicina-HCl 0,2M pH 2,5. O monoclonal foi evidenciado pela leitura das frações em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm, também pelo reativo de Bradford e posteriormente por *dot-blotting*. O pH das amostras foi neutralizado com tampão Tris 0,5M pH 7,5. O material foi dialisado em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 7,5, dividido em alíquotas, liofilizado e armazenado em freezer - 20°C até uso (YAN et al., 2007; COLIGAN et al., 2007).

III.10 – ENSAIOS SOROLÓGICOS

III.10.1 – ELISA Indireto com Conjugado de Afinidade

Para testar o conjugado de afinidade (proteína-G marcado com HPR), a reação foi iniciada pela adsorção de placas de fundo chato de baixa afinidade (Kartell, Milão, Itália) com 50 µl/poço de uma solução de antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) na concentração de 15 µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas e lavadas 6 vezes com PBS-T. Após o período os soros testes de bugio foram diluídos a partir de 1:16 até 1:512, na razão de 2, em PBS-T-M e soros controles diluídos 1:16 em PBS-T-M (duas amostras de soros positivos de bugio e duas amostras de soros negativos de bugio). As amostras testes e controles foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Procedeu-se a uma nova série de

lavagens das placas, com adição subsequente do conjugado de afinidade, proteína G-peroxidase (Sigma P8170), 50 µl por poço diluído 1:1000 em PBS-T-M e incubados a 37°C por 60 minutos. Novamente as placas foram lavadas e o substrato enzimático H₂O₂ e o cromógeno OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) foram adicionados, 50 µl por poço, e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, em câmara escura. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi feita a 492 nm em leitor de microplacas (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980; BARBOSA et al, 2007).

III.10.2 - ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo

Placas de fundo chato de baixa afinidade (Kartell, Milão, Itália) foram sensibilizadas com 50 µl/poço de uma solução de STAg na concentração de 15 µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas e posteriormente lavadas com PBS-T. A seguir foram bloqueadas com PBS-T-M por uma hora a temperatura ambiente, e lavadas no final desse tempo com PBS-T. Após o período os soros testes de bugio foram diluídos a partir de 1:16 até 1:512, na razão 2, em PBS-T-M e para controles diluídos 1:16 em PBS-T-M, foram incubados por 60 minutos a 37°C. Procedeu-se a uma nova série de lavagens das placas, com adição subsequente dos anticorpos secundários, anticorpo policlonal anti-IgG ou anti-IgM de macacos Rhesus produzidos em cabra (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, USA), 50 µl por poço, diluídos 1:1000 em PBS-T-M a 37°C por 60

minutos. Novamente as placas foram lavadas e o conjugado anti-IgG de cabra marcada com HPR (Sigma A5420), diluído 1:2000 foi adicionado a cada poço e incubado a 37°C por 30 minutos. Ao término desse período, as placas foram lavadas e o substrato enzimático H₂O₂ associado ao cromógeno OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) foi adicionado, ao volume de 50 µl por poço, e incubado por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, em câmara escura. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi feita a 492 nm em leitor de microplacas (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980; BARBOSA et al, 2007).

III.10.3 - ELISA Indireto com Anticorpo Monoclonal Homólogo

Para a reação de ELISA com anticorpo monoclonal anti-IgM de bugio, iniciou-se pela adsorção de placas de fundo chato de baixa afinidade (Kartell) com 50 µl/poço de uma preparação de STAg na concentração de 15 µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas, posteriormente foram lavadas com PBS-T, bloqueadas com PBS-T-M por uma hora a temperatura ambiente, e lavadas no final desse período com PBS-T. Após o período os soros testes foram diluídos a partir de 1:16 até 1:512, na razão 2, em PBS-T-M e soros controles diluídos 1:16 em PBS-T-M, foram incubados por 60 minutos a 37°C. Procedeu-se a uma nova série de lavagens das placas, com adição subsequente do anticorpo secundário, 50 µl por poço, diluído 1:1000 (1mg de anticorpo monoclonal anti-

IgM purificado, diluído em 1mL de PBS) em PBS-T-M e incubado a 37°C por 60 minutos. Novamente as placas foram lavadas e o conjugado anti-Fc de IgG de camundongo (Sigma A0168) diluído 1:5000 foi adicionado a cada poço e incubado a 37°C por 30 minutos. Ao término desse período, as placas foram lavadas e o substrato enzimático H₂O₂ associado ao cromógeno OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride) foi adicionado, 50 µl por poço, e incubado por 5 a 10 minutos em temperatura ambiente, em câmara escura. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura das densidades ópticas (DO) foi feita a 492 nm em leitor de microplacas (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980; BARBOSA et al, 2007).

III.10.4 - Cálculo do Índice ELISA (IE)

O índice ELISA foi calculado segundo a fórmula: $IE = DO \text{ amostra} / DO \text{ cut off}$. O *cut off* da reação foi determinado pela média da DO dos soros controles negativos somados a 3 desvios padrões. As amostras positivas foram definidas a partir dos títulos com maior diluição do soro que apresentou um valor de DO acima do *cut off*. Os valores de $IE > 1,0$ ou $IE\% > 100\%$ foram considerados positivos. Objetivando-se excluir os valores no limiar da positividade, estabeleceu-se um limite adicional de 20%, adotando-se valores de $IE > 1,2$ como resultados positivos.

III.10.5 - RIFI

A reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) nos soros dos animais foi realizada a partir de lâminas contendo uma suspensão de 15 a 30 taquizoítos formolizados de *T. gondii*. Os soros dos animais foram diluídos, a partir de 1:16, na razão 2 perfazendo 8 diluições e colocados 20 µL em cada poço das lâminas, incubados em câmara úmida a 37°C por 40 minutos. Então, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS e secas sendo, logo após, adicionado a cada poço, 20 µL do anticorpo monoclonal anti-IgM de bugio purificado (1 mg/mL) diluído 1:1000 em PBS e incubado a 37°C por 30 minutos. Ao término do período as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS, secas e incubadas com o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com FITC (Sigma: F0257), diluído 1:2000 em solução de azul de Evans, a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas novamente, secas, e então foi colocada glicerina tamponada (pH 8,5) sobre os poços e coberto com lamínula. As lâminas foram lidas em microscópio digital AMG/EVOS (Euroclone, Bothell, Washington, USA) (MINEO et al., 2001).

III.10.6 - Imunoturbidimetria

O anticorpo monoclonal anti-IgM purificado foi utilizado na proporção de 5 mg/mL de tampão imidazol 0,1 M pH 7,5. Soros de bugio, curva padrão (30 µg/mL, 60 µg/mL, 120 µg/mL, 200 µg/mL e 400 µg/mL de IgM purificada de bugio) e branco

(H₂O) foram incubadas a 37°C por 10 minutos em placas de fundo em U de 96 poços (Nalgene Nunc Int., Rochester, NY, USA), na proporção de 250 µL de tampão imidazol, 50 µL do anticorpo monoclonal anti-IgM de bugio e 15 µL (soro de bugio positivo para IgM e branco, diluídas em tampão imidazol 1:5) e 15 µL curva padrão. Decorrido o tempo as placas foram lidas em 340 nm, em leitora de placa EXPECTRAMax M2e (Molecular Devices Corporation, Orleans Drive Sunnyvale, Califórnia, USA) (BAK; KYHSE-ANDERSEN; THOMAS, 2007).

III.10.7 - Imunohistoquímica

Os órgãos dos primatas (baço, fígado, rim e pulmão) foram coletados de animais que foram a óbito por causas naturais, e posteriormente analisados para verificação da presença de *T. gondii*. As amostras foram fixadas em formalina 10% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 18 horas e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes de 4 µm foram depositados em lâminas. Os cortes foram desparafinados, hidratados em álcoois de concentrações decrescentes e por fim em água corrente. Após a hidratação, os cortes foram incubados por 8 minutos em solução de ácido acético a 5% para bloqueio de fosfatase alcalina endógena, em seguida lavados em água corrente e em solução salina tamponada com TRIS 0,02 M, pH 7,4 (TBS) por 5 minutos. Para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação, o material foi incubado com soro normal de cabra a 2,5% em TBS por 45 minutos a 37°C. Após esta etapa, o material recebeu anticorpo policlonal de coelho dirigido contra *T. gondii*, na diluição de 1: 100 em TBS por 12 horas a 4°C. Após sucessivas lavagens em TBS, as

lâminas foram incubadas com IgG biotinilado de cabra anti-IgG de coelho (Sigma) na diluição de 1:600 em TBS por uma hora a 37°C. Em seguida a novas lavagens, a reação foi amplificada pelo complexo avidina/biotina (ABC)-fosfatase alcalina (Biomeda, Foster, City, USA) na diluição de 1: 100 em TBS, a 37°C por 30 minutos. Procedeu-se novas lavagens em TBS e revelação da enzima fosfatase alcalina com *fast red-naftol* (Sigma), em tampão TBS. Posteriormente, foram realizadas lavagens em TBS e água corrente e contra-coloração com hematoxilina de Mayer por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a diferenciação do corante em água amoniacal, as lâminas foram montadas em glicerina e o material analisado e fotografado em microscópio de luz (FERRO et al, 2002; FRANCO et al., 2011).

III.11 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram utilizados os programas Excel (Microsoft Co., Redmond, EUA) e GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças entre as médias, medianas ou proporções foram analisadas pelo teste-*t* de Student, Mann-Whitney, Qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando apropriado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

IV – RESULTADOS

IV – RESULTADOS

IV.1 – CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE

Os anticorpos da classe IgG foram fracionados do soro de bugios por cromatografia de afinidade utilizando-se proteína G-Sepharose equilibrada em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e eluídos em tampão glicina 0,2M pH 2,5 (Fig. 8). Os anticorpos obtidos dessa forma foram evidenciados por eletroforese. As massas moleculares estão expressas em kiloDaltons (kDa). As IgG purificadas foram analisadas pelo programa de imagens *Kodak Digital Science1D* e os resultados sugerem um peso entre 190 e 205 kDa. Observou-se também reação cruzada com anti-IgG de macacos Rhesus quando a reação de *dot-blotting* foi revelada com DAB (Fig. 9). A tabela 1 demonstra a massa total de IgG de bugio obtida por este método, cujo rendimento final foi de 3,5% do total da massa de proteínas utilizada no início deste processo.

Cromatografia de Afinidade para Purificação de IgG de Bugio

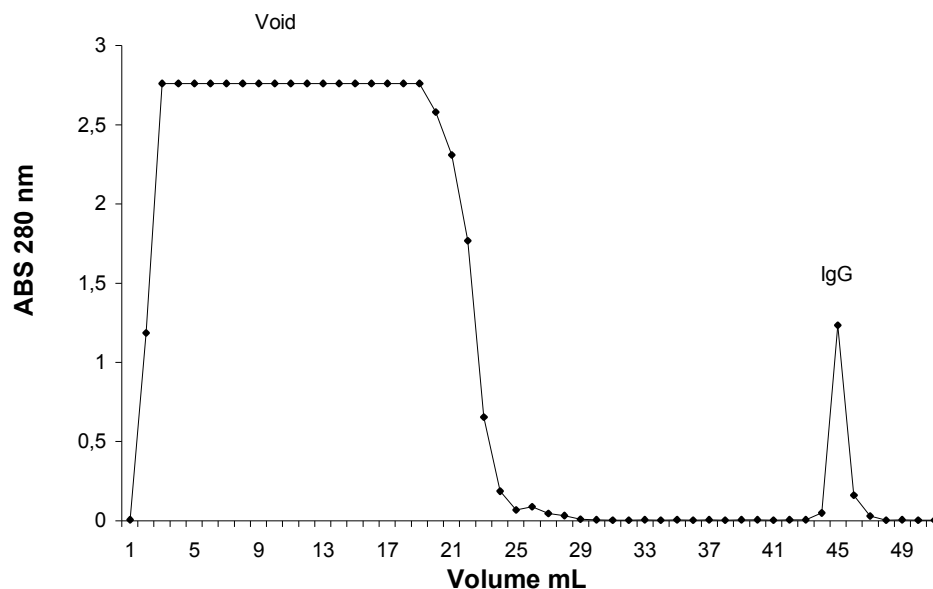


Figura 8. Perfil cromatográfico de IgG de bugio purificada em proteína G-Sepharose equilibrada em tampão fosfato 0,1M pH 8,0 e eluídos em tampão glicina 0,2M pH 2,5.

Tabela 1. Tabela de recuperação de IgG de bugio. Os resultados de concentração do *Void* e da IgG purificada são mostrados em relação as proteínas totais de um pool de soros de macacos bugios.

Amostra	Massa total (mg)	Recuperação (%)
Proteínas Totais do Soro de Bugio	38,45	100
<i>Void</i>	37,1	96,4
IgG purificada	1,350	3,5

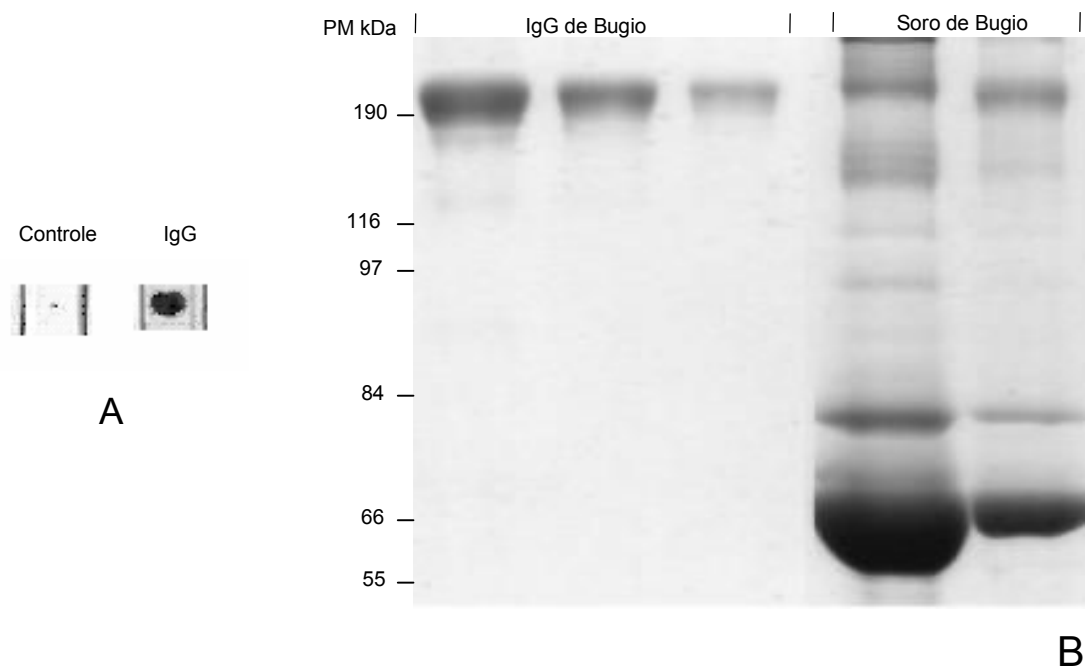


Figura 9. Perfil eletroforético de soros de bugios e IgG purificada de um pool de soros animais. (A) *Dot-blotting* de IgG com anticorpo primário anti-IgG de macaco Rhesus. Controle foi BSA 10%. Reação revelada com DAB. (B) perfil eletroforético (SDS-PAGE 8%) de proteínas totais do pool de soros e IgG de bugio purificadas.

IV.2 – CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO

IV.2.1 – Fracionamento e Purificação de Anticorpos IgM de Bugios

Na figura 10 estão demonstrados os resultados obtidos com a cromatografia de gel filtração, utilizando-se a resina Sephacryl S-300, para purificação de anticorpos IgM de bugio. Na tabela 2 podemos observar a concentração de IgM obtida durante o processo de purificação que foi de 2,7% da massa total aplicada na coluna. Na figura 11 observa-se o perfil eletroforético das proteínas obtidas dessa forma, sendo que as massas moleculares estão, expressas em kiloDaltons (kDa). As bandas protéicas foram analisadas pelo programa de imagens *Kodak Digital Science1D*, onde no primeiro pico foi estimada a detecção de uma proteína de peso molecular superior a 200 kDa e no segundo pico a detecção de várias proteínas variando de peso molecular de 80 a 200 kDa. A presença de IgM foi, posteriormente, comprovada por tratamento do pico I com β -mercaptoetanol (3A) e *dot-blotting* (B).

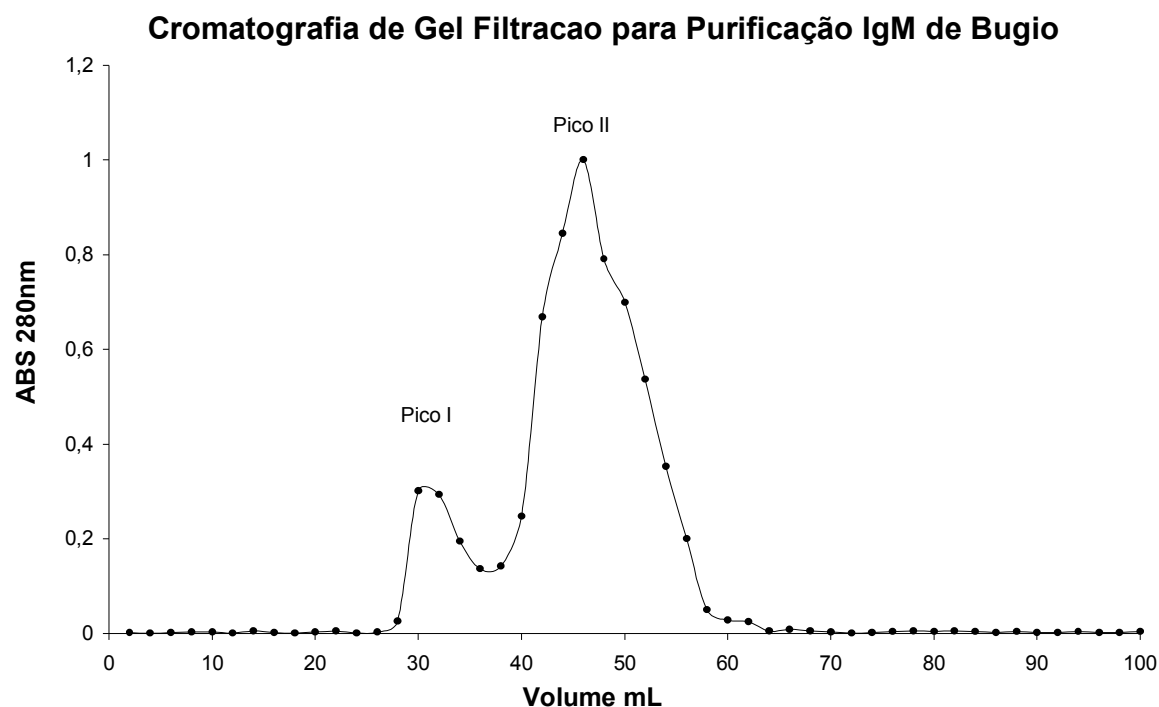


Figura 10. Perfil cromatográfico de IgM de bugio em Sephacryl S-300 em tampão bicarbonato de amônio 40 mM pH 7,8.

Tabela 2. Tabela de recuperação de IgM de bugio. Os resultados de concentração do *Void* e da IgM purificada são mostrados em relação as proteínas totais de um pool de soros de macacos bugios.

Amostra	Massa total (mg)	Recuperação (%)
Proteínas Totais do Soro de Bugio	38,45	100
<i>Void</i>	37,4	97,3
IgM purificada	1,05	2,7

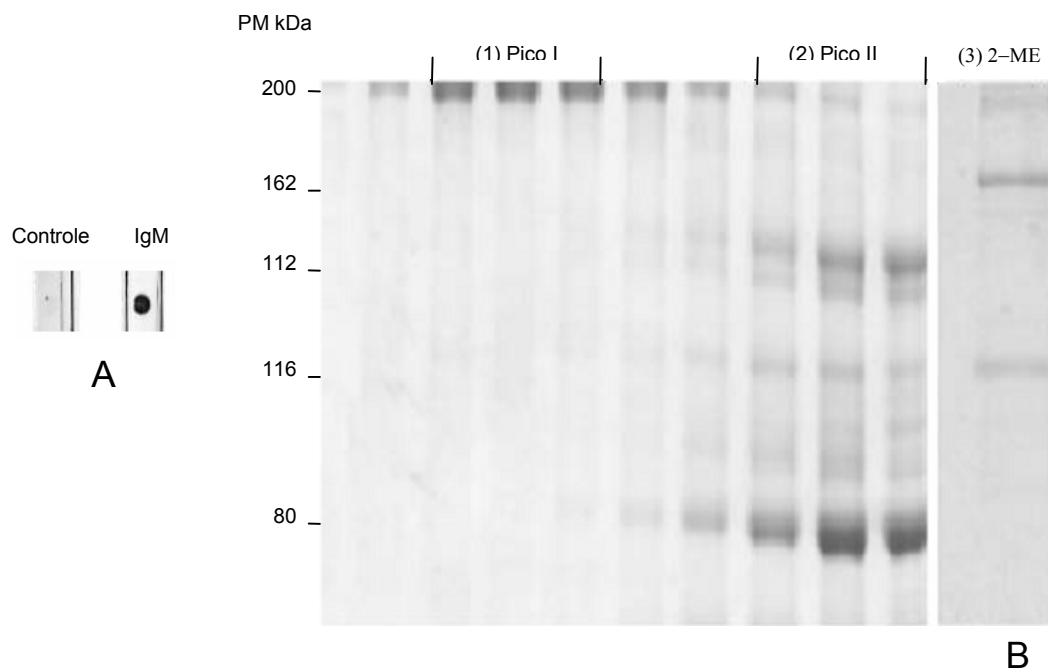


Figura 11. *Dot-blotting* de IgM de bugio purificada, perfil eletroforético (SDS-PAGE 8%) de IgM de bugio purificada e IgM de bugio purificada tratada com β -mercaptoetanol (2ME). Em (A) *dot-blotting* de IgM de bugio purificada, o conjugado utilizado foi anti-IgM de macacos Rhesus. Controle foi BSA 10%. Reação revelada com DAB. Em (1B) e (2B) picos I e II das proteínas fracionadas pela S-300, e no (3B) IgM de bugio (pico I) tratado com 2ME.

IV.3 – PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-IgM DE BUGIO

Para a purificação dos anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio, os sobrenadantes de cultura de hibridomas oriundos do cultivo de 1 a 5 células por poço, foram submetidos à cromatografia de afinidade utilizando-se proteína G-Sepharose equilibrada em tampão fosfato 0,1M em pH 8,0 e eluídos em tampão glicina 0,2M em pH 2,5 (Fig. 12). Após o processo de purificação os anticorpos obtidos foram testados segundo sua capacidade de se ligar a IgM de bugios, e assim serem caracterizados como anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio. Os métodos utilizados foram o ELISA e o *dot-blotting*. Os resultados desse processo de caracterização podem ser observados na figura 13. Dessa forma, quatro monoclonais foram selecionados e designados, segundo sua localização no poço na placa original do primeiro cultivo, como: AL1B4, AL2B9, AL2H1 e AL5C4. Para os ensaios posteriores do trabalho foi escolhido o monoclonal designado AL1B4.

Cromatografia de Afinidade para Purificação do Ac Monoclonal

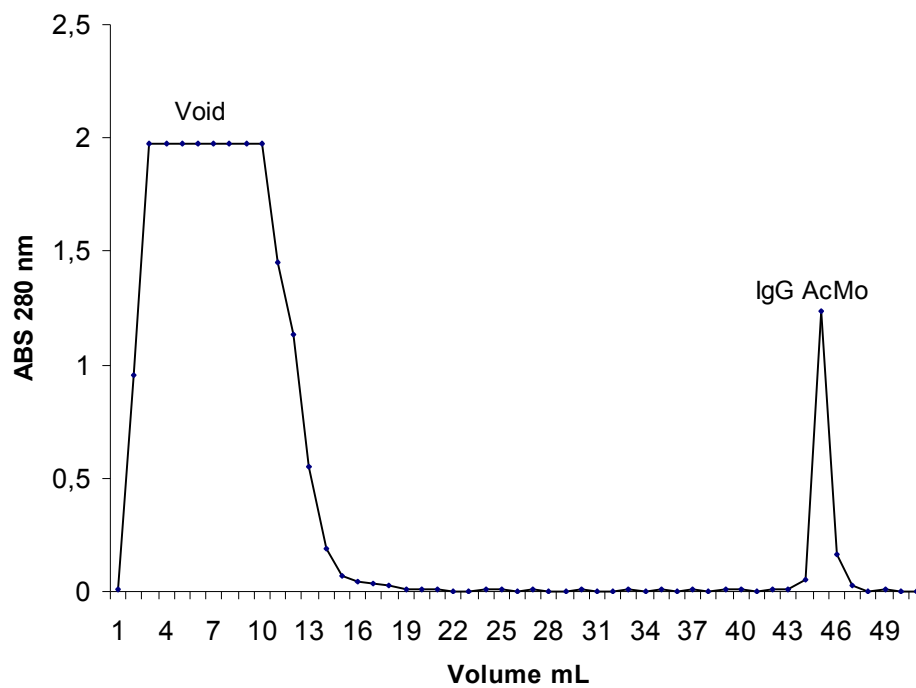


Figura 12. Purificação de anticorpos monoclonais direcionados para IgM de bugio (*A. guariba clamitans*) por cromatografia de afinidade em Proteína G - Sepharose. As frações cromatográficas foram obtidas após lavagem com tampão fosfato pH 8,0 (void) e eluição com tampão glicina pH 2,5 (IgG AcMo)

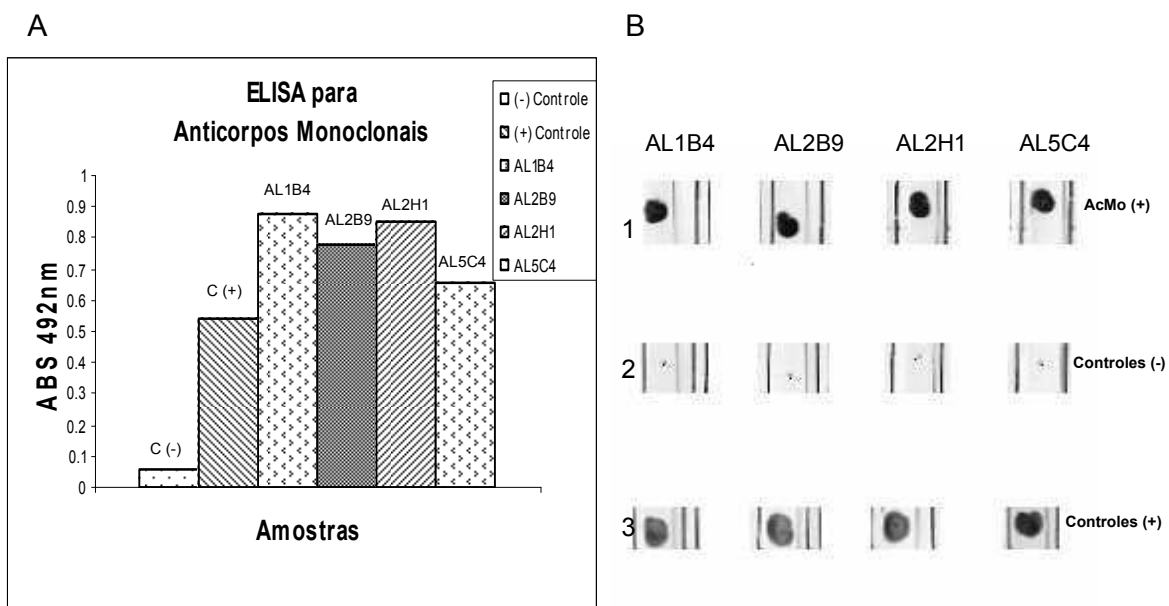


Figura 13. Caracterização de anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio (*A. guariba clamitans*) fracionados por cromatografia de afinidade. (A), análise por ELISA; (B), análise por *dot-blotting*, em (1) anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio, em (2) controle negativo com BSA e em (3) controle positivo com IgG total de camundongo. Entre os quatro diferentes anticorpos monoclonais das células híbridas secretoras, o AL1B4 foi escolhido para todos os demais experimentos.

IV.4 – REATIVIDADE CRUZADA

Observou-se durante os ensaios preliminares da produção de anticorpos monoclonais anti-IgG de bugio (*A. guariba clamitans*) que havia uma reação cruzada entre IgG de bugio e o conjugado anti-IgG de camundongo marcado com HPR. Para melhor caracterizar esses achados, anticorpos da classe IgG de camundongos e bugios foram fracionados em separado por cromatografia de afinidade utilizando-se proteína G-Sepharose. As imunoglobulinas foram separadas em SDS-PAGE 8% e eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Após o processo de transferência as tiras foram incubadas com conjugado anti-Fc de IgG de camundongo marcado com HPR, e o resultado pode ser evidenciado na figura 14. Observou-se a existência de reação cruzada desse conjugado com a IgG purificada de bugio. Devido a esse resultado, não foi possível continuar com os ensaios de produção, purificação e caracterização de anticorpos monoclonais anti-IgG do bugio.

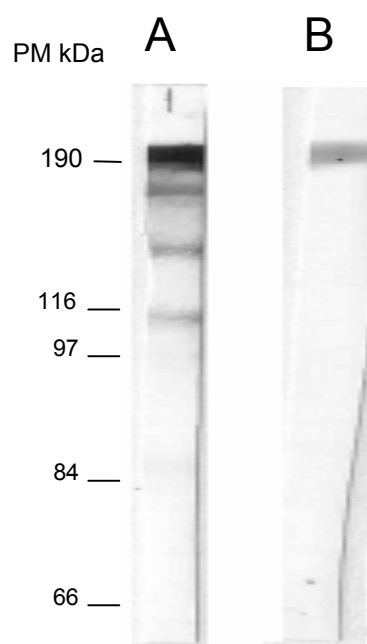


Figura 14. Análise por *Western-blotting* da reação cruzada do conjugado anti-Fc de IgG de camundongo marcado com HRP com anticorpos IgG de bugio (*A. guariba clamitans*). Em (A) observa-se a reação do conjugado anti-Fc de IgG de camundongo HRP com IgG de camundongo; em (B) a reação do conjugado anti-Fc de IgG de camundongo HRP com IgG de bugio. A reação foi revelada com DAB.

IV.5 – RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS

IV.5.1 – ELISA Indireto com Conjugado de Afinidade

Com o intuito de se determinar a percentagem de soropositividade para anticorpos da classe IgG anti-*T. gondii*, foi realizado um inquérito sorológico em bugios silvestres de cativeiro e de vida livre utilizando-se como método o ELISA indireto e conjugado de afinidade proteína G-Sepharose. Como se observa na figura 15, os resultados foram expressos em Índice ELISA, adotando-se os valores de IE > 1,2 como resultados positivos. Foram testados 26 animais de cativeiro e 10 de vida livre, os resultados mostram soropositividade em 16 animais de cativeiro (61,5%) e 5 animais de vida livre (50%). Dois dos animais de cativeiro os quais eram soropositivo para *T. gondii* foram a óbito um mês após a coleta de sangue.

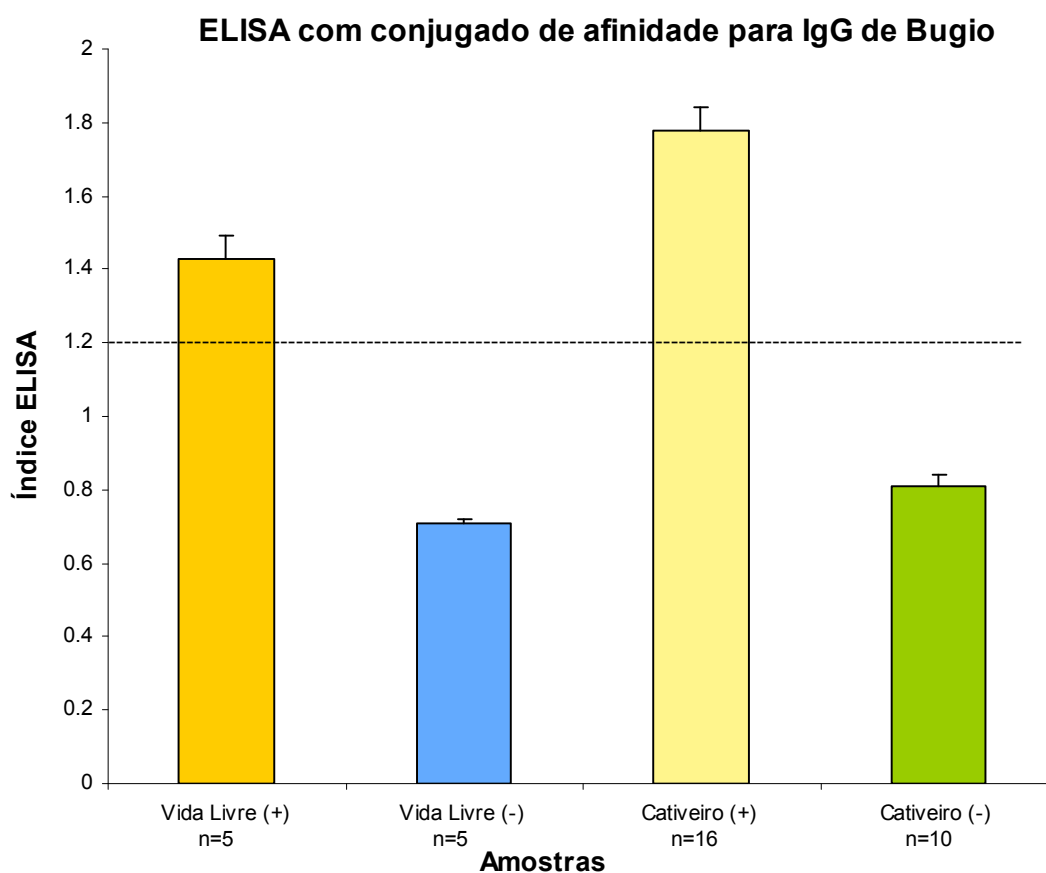


Figura 15. Níveis de anticorpos IgG de bugio anti-*T. gondii* determinados pela reação ELISA, utilizando-se conjugado de afinidade proteína G marcado com HPR. Resultados positivos obtidos em 16/26 animais de cativoiro (61,5%) e em 5/10 animais de vida livre (50%). Resultados expressos como média \pm SEM, adotando-se valores de índices ELISA IE > 1,2 como resultados positivos.

IV.5.2 – ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo Anti-IgM de Macaco Rhesus

Com o objetivo de se verificar os índices de soropositividade em bugios de cativeiro e de vida livre, utilizando-se a técnica de ELISA indireto para detectar anticorpos IgM de bugio contra *T. gondii*, utilizou-se o anticorpo heterólogo anti-IgM de macaco Rhesus produzido em cabra e o conjugado anti-IgG de cabra marcado com HPR. Na figura 16, os resultados do ELISA, são expressos em Índice ELISA (IE), adotando-se valores de $IE > 1,2$ como resultados positivos para IgM de bugio. Foram testadas 26 amostras de soros de animais de cativeiro e 10 de vida livre. Dos 36 animais testados pelo método, 25 animais de cativeiro foram negativos para IgM, 10 animais de vida livre foram negativos para IgM e 1 animal de cativeiro foi positivo para IgM (3,8%)

ELISA para IgM de bugio revelado com anti-IgM de Rhesus

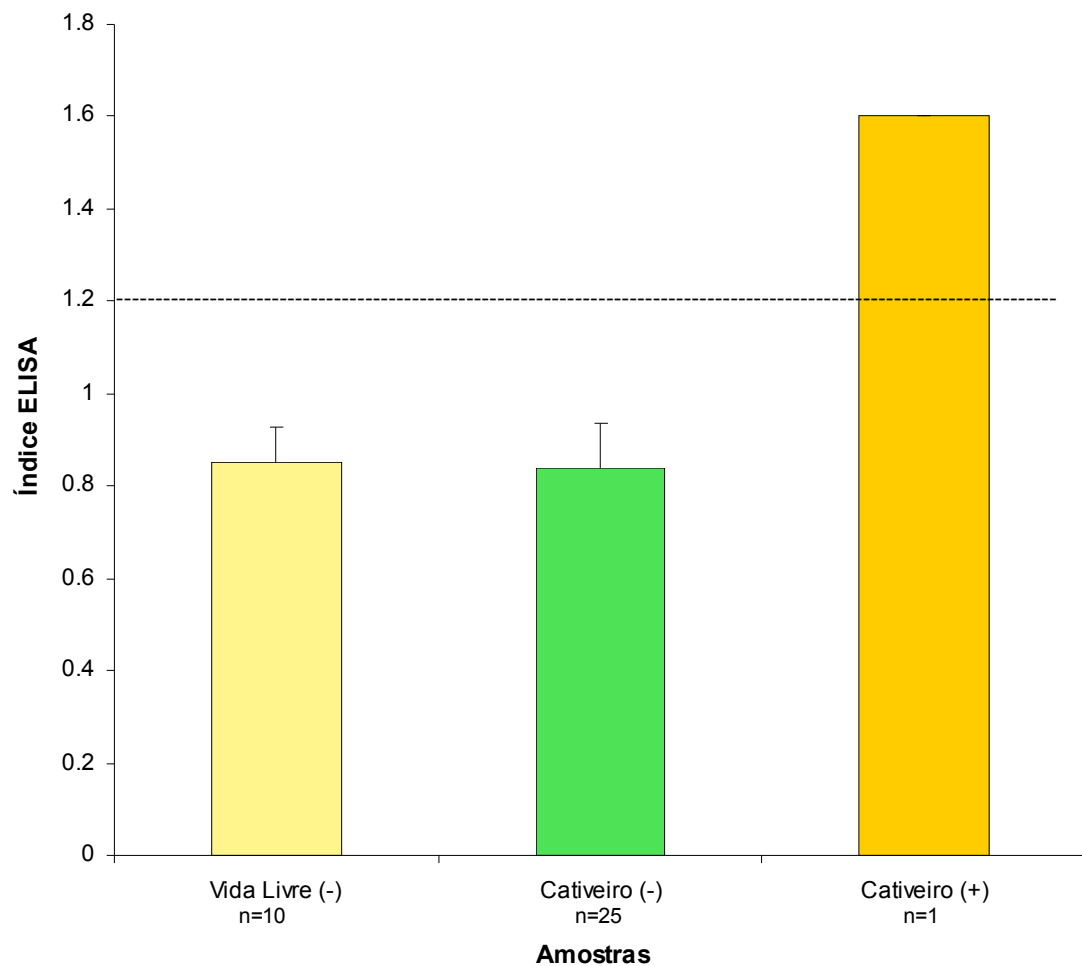


Figura 16. Índice ELISA para anticorpos IgM de bugio, revelado com anticorpo heterólogo anti-IgM de macaco Rhesus produzido em cabra e conjugado anti-IgG de cabra HRP. Resultados expressos pela média \pm SEM em vida livre (-) e cativoiro (-). Em Cativoiro (+) o resultado é expresso por apenas 1 animal positivo. Adotou-se valores de índices ELISA IE > 1,2 como resultados positivos.

IV.5.3 – ELISA Indireto com Anticorpo Heterólogo Anti-IgG de Macaco Rhesus

Da mesma forma que foi utilizado o conjugado de afinidade, em técnica de ELISA indireto, para determinar soropositividade de IgG de macacos bugio anti-*T. gondii*, procurou-se neste ensaio determinar soropositividade, utilizando anticorpo heterólogo anti-IgG de macaco rhesus. O resultado desse ensaio pode ser visto na figura 17. Os resultados do ELISA estão expressos em Índice ELISA. Para se detectar os anticorpos IgG de bugio (*A. guariba clamitans*) contra *T. gondii* utilizou-se anticorpo heterólogo anti-IgG de macaco rhesus produzido em cabra e conjugado anti-IgG de cabra marcado com HPR. Foram testados 26 animais de cativeiro e 10 animais de vida livre. Os resultados, similares aos observados com o conjugado de afinidade, mostram soropositividade em 16/26 animais de cativeiro (61,5%) e 5/10 animais de vida livre (50%). Adotou-se valores de IE > 1,2 como resultados positivos

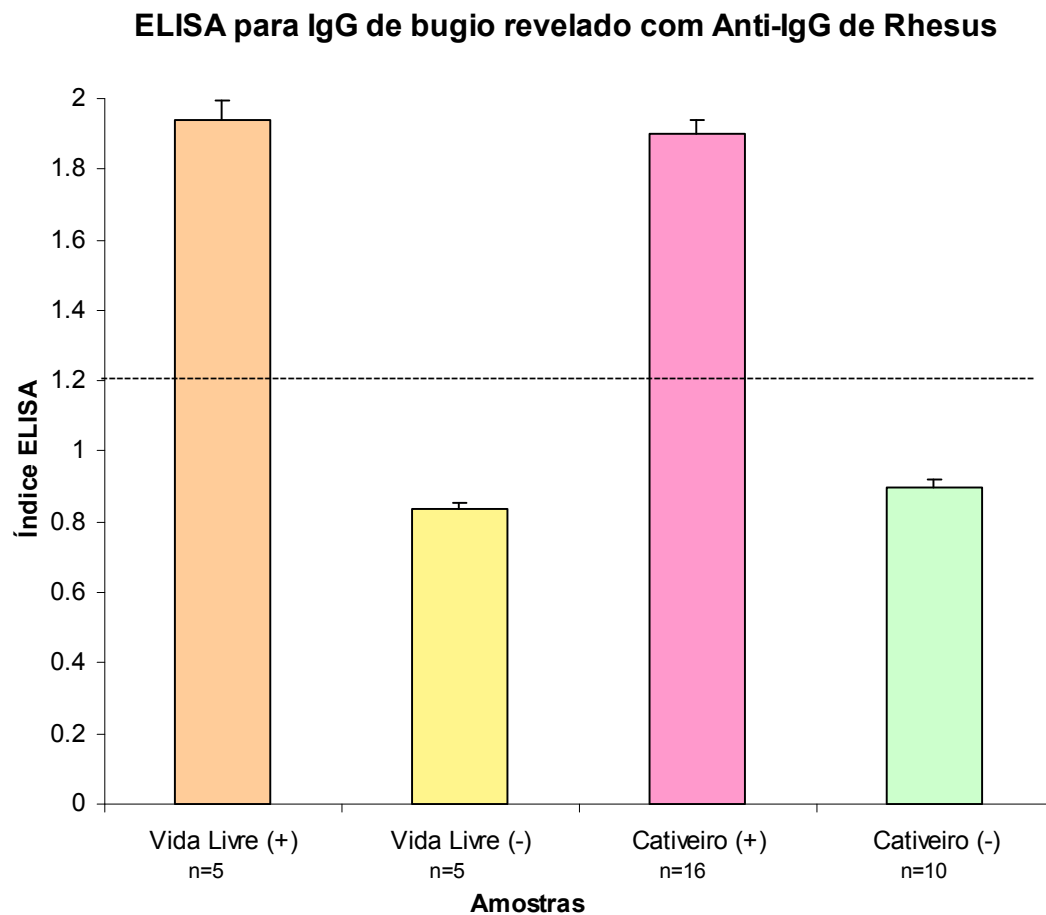


Figura 17. Índice ELISA para anticorpos IgG de bugio, revelado com anticorpo heterólogo anti-IgG de macaco rhesus produzido em cabra e conjugado anti-IgG de cabra marcado com HRP. Os resultados são expressos pela média \pm SEM, adotando-se valores de IE $>$ 1,2 como resultados positivos. Resultados positivos para IgG anti-*T gondii* foram encontrados em 5/10 (50%) vida livre e 16/26 (61,5%) de cativoiro.

IV.5.4 – ELISA Indireto com Anticorpo Monoclonal AL1B4

Após a caracterização e purificação dos anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio (*A. guariba clamitans*), o anticorpo monoclonal AL1B4 foi selecionado para os ensaios de ELISA indireto com o anticorpo homólogo. Os resultados estão na figura 18, onde o grau de soropositividade está expresso em Índice ELISA. Com o objetivo de se detectar anticorpos IgM contra *T. gondii* utilizou-se o anticorpo monoclonal (AL1B4) anti-IgM de macaco bugio e o conjugado anti-Fc de IgG de camundongo marcado com HRP. Foram testados 26 animais de cativeiro e 10 animais de vida livre. Os resultados demonstram soropositividade em 2 animais de cativeiro (7,7%).

ELISA para IgM de bugio revelado com anti-IgM de bugio

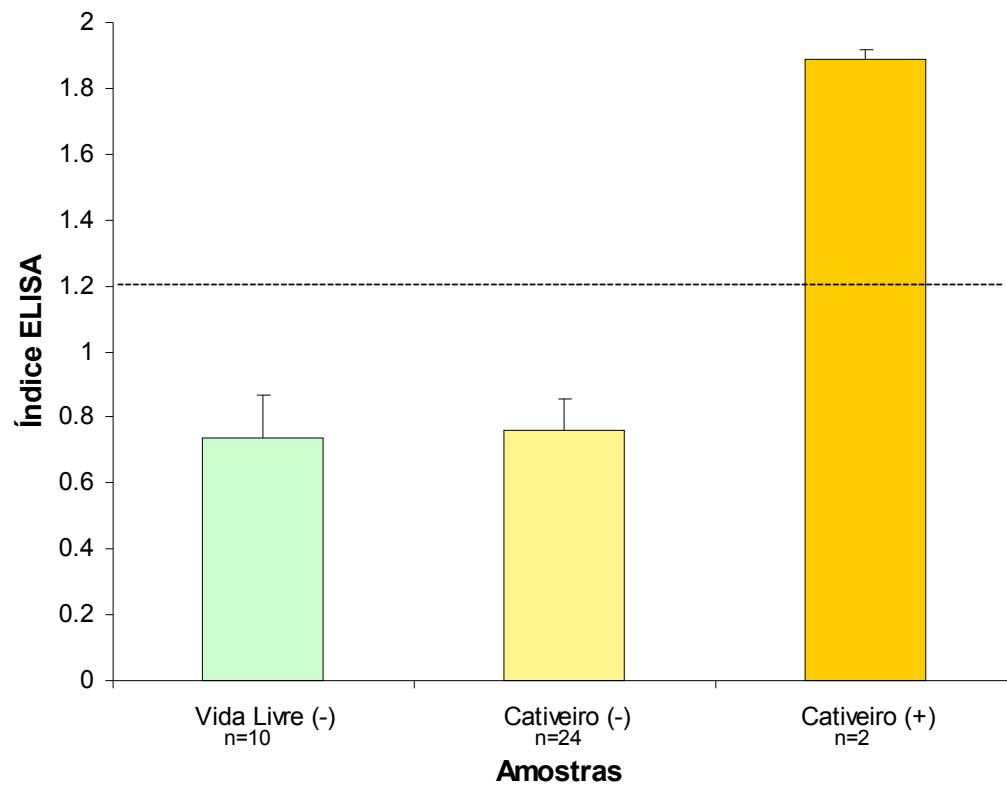


Figura 18. Índice ELISA para anticorpos IgM de bugio, tendo o anticorpo monoclonal AL1B4 e o conjugado anti-Fc de IgG de camundongo marcado com HRP. Os resultados são expressos pela média \pm SEM, adotando-se valores de IE $>$ 1,2 como resultados positivos. Somente 2/26 animais de cativoiro (7,7%) foram IgM positivos para *T. gondii*.

IV.5.5 – Reação de Imunofluorescência Indireta Utilizando o Anticorpo Monoclonal AL1B4

Com o intuito de se avaliar a soropositividade para IgM nas amostras de soros de macacos bugios de cativeiro e de vida livre, realizou-se ensaio de imunofluorescência indireta com anticorpo monoclonal anti-IgM de bugio (*A. guariba clamitans*), o monoclonal utilizado foi o designado de AL1B4. Na figura 19 (A e B) são controles negativos e positivos, respectivamente, e em (C e D) resultados dos animais positivos. Nenhum animal de vida livre apresentou resultado positivo para IgM de bugio anti-*T. gondii*. Em contraste, dois animais de cativeiro apresentaram resultado positivo para IgM de bugio anti-*T. gondii*. Ambos os animais morreram. Na tabela 3 estão apresentados os resultados em percentual do número de animais soropositivos e títulos de RIFI. Do total 5,6% dos animais de cativeiro foram positivos.

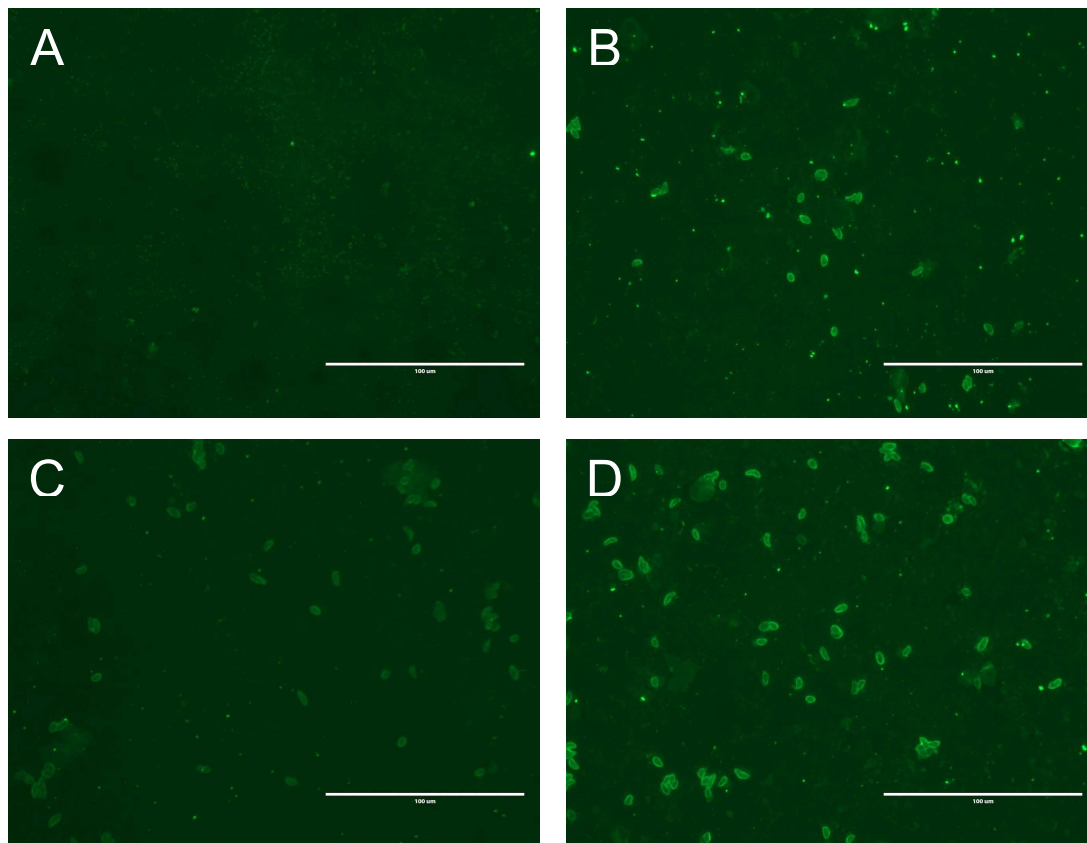


Figura 19. A figura mostra o resultado da RIFI para detecção de IgM anti-*T. gondii* utilizando-se o monoclonal AL1B4. Em (A) controle negativo, em (B) controle positivo e em (C) e (D) os resultados dos animais soropositivos para IgM anti-*T gondii*.

Tabela 3. Título de anticorpo IgM de bugio obtidos por RIFI utilizando-se o anticorpo monoclonal AL1B4. Os resultados estão expressos em valores unitários ou em percentual.

Título	Animais de Vida Livre	Animais Cativos	Total
1/128	0/10 (0%)	2/26 (7,7%)	2/36 (5,6 %)
(-)	10	24	34 (94,4 %)
Total	10	26	36 (100%)

IV.5.6 – Imunoturbidimetria para Anticorpos IgM de Bugio Utilizando o Anticorpo Monoclonal AL1B4

Como forma de se determinar a concentração de IgM total expressa em $\mu\text{g/mL}$, procedeu-se à realização do ensaio de turbidimetria, no qual o anticorpo monoclonal AL1B4 foi utilizado como anticorpo ligante de IgM de modo a ocorrer o processo de precipitação. Esses resultados podem ser evidenciados na figura 20, onde os animais de vida livre apresentaram, significativamente ($p=0,0077$), maior concentração de IgM em comparação com animais de cativeiro. Os dois animais que viviam em condições de cativeiro e que morreram apresentaram, significativamente ($p=0,0025$), maiores concentrações de IgM quando comparados com aqueles de vida livre analisados.

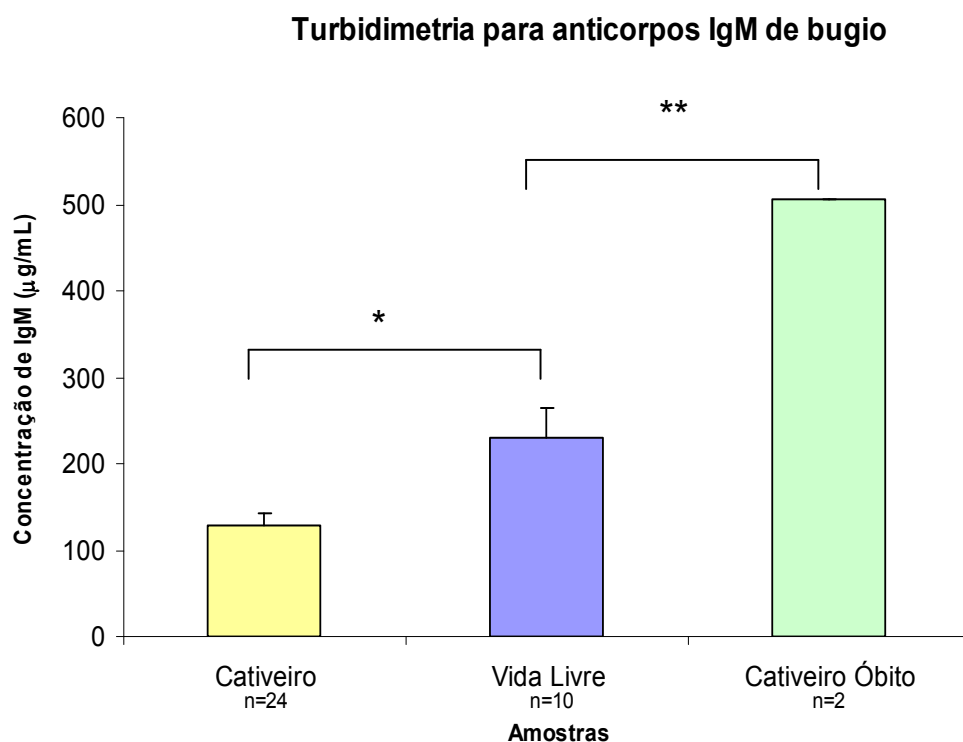


Figura 20. Concentração de IgM total de bugio (*A. guariba clamitans*) obtida por imunoturbidimetria. Os resultados são expressos em $\mu\text{g/mL}$. Os animais de vida livre apresentaram maior concentração de IgM em comparação com os animais em cativeiro (* $p=0,0077$). Dois dos animais que viviam em condições de cativeiro e que morreram durante o estudo, apresentaram maiores concentrações de IgM (** $p=0,0025$).

IV.5.7 – Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada de modo a se determinar a presença de *T. gondii* nos tecidos dos órgãos retirados da necropsia dos dois bugios de cativeiro que vieram a óbito. A reação foi executada buscando-se presença dos parasitas na forma extracelular, em cisto ou em debris. Observou-se a presença do parasita extracelular ou em cisto no baço, fígado e pulmão de ambos os animais. Na mesma análise realizada em amostras do rim não se observou tais estruturas. Esses resultados são mostrados nos cortes histológicos apresentados na figura 21.

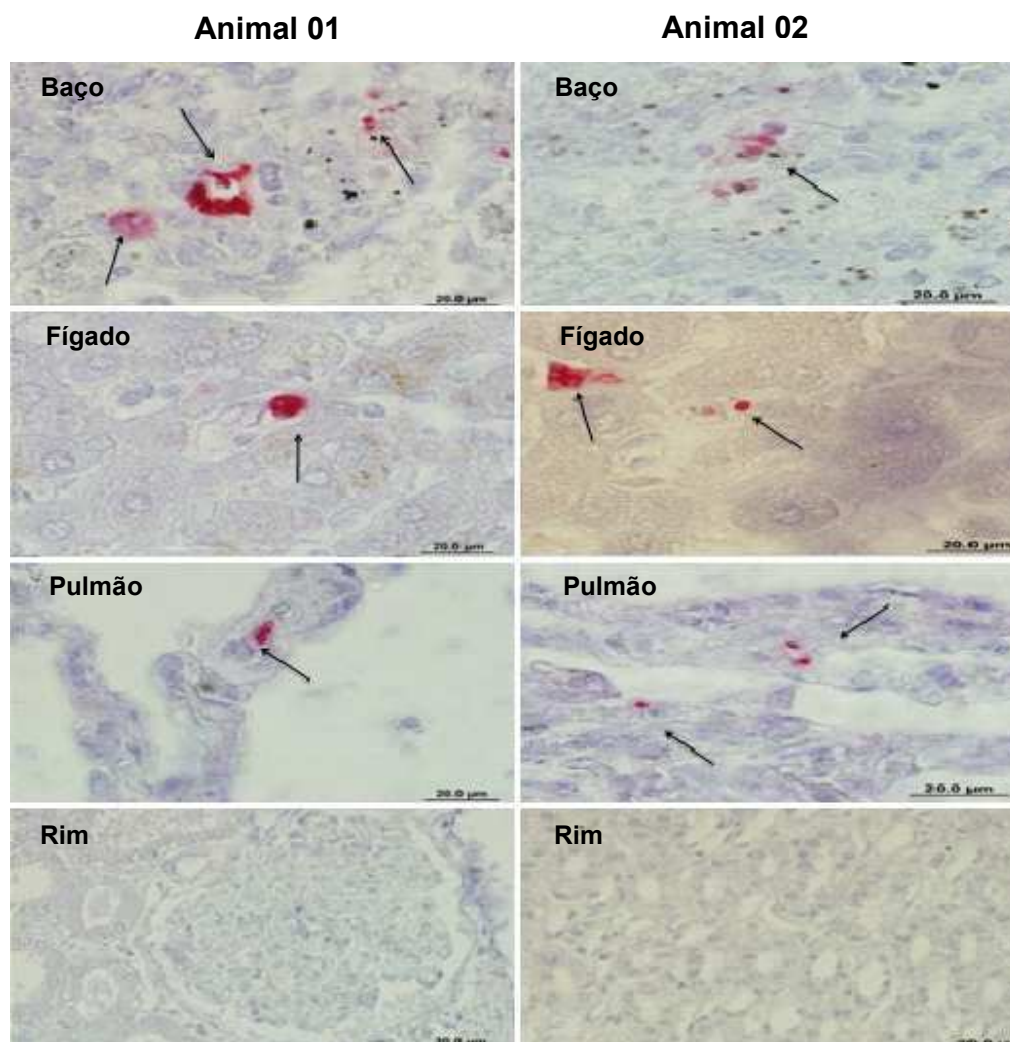


Figura 21. Imunohistoquímica realizada para detectar *T. gondii* em cortes de tecido de dois indivíduos *A. guariba clamitans* cativos que morreram. Estes animais apresentaram reatividade para IgM anti-*T. gondii*, quando se utilizou o teste ELISA com anticorpo monoclonal homólogo. *T. gondii* foi detectado (setas) como parasita extracelular ou no interior de vacúolos parasitóforo no baço, fígado e pulmão, mas não no rim, de ambos os animais.

V - DISCUSSÃO

V – DISCUSSÃO

Os primatas do Novo Mundo são bastante sensíveis à infecção pelo parasita *Toxoplasma gondii*. Há relatos de que sejam mais suscetíveis à toxoplasmose do que aqueles do Velho Mundo (EPIPHANIO; SINHORINI; CATAO-DIAS, 2003).

O Brasil é o país mais rico em termos de espécies de primatas. Estudos mostram uma alta soroprevalência de *T.gondii* tanto para animais de cativeiro como para os de vida livre (SILVA et al., 2001; SPENCER; HIGGINBOTHAM; BLAGBURN, 2003; PENA et al., 2011).

Em 2004 Ekanayake e colaboradores examinaram 170 amostras sorológicas para toxoplasmose em *Macaca sinica*, no Sri Lanka, utilizando o teste de aglutinação modificado ocorrendo 12% de prevalência de positividade nos macacos no grupo e maior prevalência (19%) naqueles que tem maior acesso a humanos.

Em 2007 Souza Junior evidenciou exposição a *Toxoplasma gondii* em 25 amostras de *A. guariba clamitans*, em Indaial (SC), Brasil, pelo teste de aglutinação modificado (MAT) encontrando 86,5% de prevalência.

As razões para a alta suscetibilidade dos primatas a infecção por *Toxoplasma gondii* ainda não estão bem esclarecidas. Entretanto, trabalhos demonstram que os animais não desenvolvem uma efetiva resposta das células T (EPIPHANIO; SINHORINI; CATÃO-DIAS, 2003; DUBEY, 2009)

Existem diferentes estratégias descritas na literatura para diagnosticar doenças infecciosas em primatas não-humanos (ALMEIDA et al., 2012; BOUER et al., 2010; GARCIA et al., 2005; PENA et al., 2011). Entre elas, o uso de imunoensaios,

particularmente dos testes sorológicos projetados para detectar o isotipo IgM. Esses ensaios são relevantes porque IgM é uma imunoglobulina que marca a fase aguda da infecção e nem sempre o agente etiológico pode ser isolado, mesmo durante as infecções recentes. Vários investigadores têm realizado testes sorológicos na tentativa de demonstrar qual o mais eficaz no diagnóstico da toxoplasmose em diferentes espécies de animais, incluindo primatas não humanos (BOUER et al., 2010; ISHIZUKA; MIGUEL; BROGLIATO, 1974; CALAMEL; LAMBERT, 1985; DUBEY; KRAMER; WEISBRODE, 1985; VIDOTTO, 1992). No entanto, em sua maioria, os imunoenaios para primatas utilizam anticorpos heterólogos na sua concepção, em geral, anticorpos para isotipos de macacos do Velho Mundo (BOUER et al., 2010).

Objetivando obter ferramentas imunológicas espécies-específicas procuramos a construção de anticorpos monoclonais anti-IgG e IgM de macaco bugio, através da purificação inicial de anticorpos IgG e IgM de *A. guariba clamitans*.

Nossos resultados revelaram uma reatividade cruzada entre o conjugado anti-Fc de IgG de camundongos e IgG de bugio onde esse conjugado se liga de forma heteróloga a este isotipo do bugio. Não há relatos na literatura sobre a ocorrência dessa reatividade cruzada. Embora o resultado tenha chamado a atenção, foi devido a ele que não conseguimos produzir o monoclonal anti-IgG de bugio que era um dos objetivos do presente trabalho. Com isso nos dedicamos a construção do monoclonal anti-IgM de bugio e o uso de anticorpos heterólogos e de afinidade em ensaios imunológicos.

O CEPESBI, local onde os animais de cativeiro estão mantidos, alvo do nosso estudo, está localizado em perímetro urbano. Essa proximidade com pessoas e animais domésticos pode estar contribuindo com a infecção dos animais por *T. gondii* e da

mesma forma os primatas podem se tornar vetores de zoonoses para a população local e para àqueles que realizam o manejo destes animais cativos.

Dessa maneira, o estudo epidemiológico de doenças transmitidas por animais silvestres e o conhecimento de focos naturais de zoonoses torna-se importante para que sejam tomadas medidas, através dos órgãos de saúde pública, que protejam os primatas e a população local.

O foco primário dos programas de conservação é restabelecer a conectividade entre os fragmentos que podem envolver a regeneração do habitat ou o ativo manejo da população. Para isso a participação da população humana local é muito importante.

Entre as possíveis vias de contágio dos primatas do Novo Mundo encontra-se a contaminação de alimentos com fezes de gato ou através de insetos vetores como, por exemplo, as baratas (CHINCHILLA et al. 1994 *apud* DUBEY, 2008).

Nós verificamos a soropositividade de macacos bugios mantidos em cativeiro científico do CEPESBI e, posteriormente, a soropositividade dos animais de vida livre, localizados no morro Geisler, que se localiza próximo ao Centro de Pesquisa. Iniciamos a pesquisa da soropositividade para anticorpos IgG contra *T. gondii* utilizando conjugados de afinidade e heterólogo. Nesses ensaios observamos soropositividade em 16 dos 26 animais de cativeiro e 5 dos 10 animais de vida livre. Esses resultados são consistentes com achados de Bouer et al. (2010) para anticorpos heterólogos e Silva Filho et al. (2011) para anticorpos de afinidade.

Bouer e colaboradores (2006) demonstraram, utilizando técnica de ELISA para pesquisa de IgG e IgM anti- *T. gondii* em macacos do Novo Mundo, experimentalmente infectados, que os primatas estavam positivos 7 dias após a exposição ao parasita e essa soropositividade era tanto para anticorpos da classe IgG quanto da classe IgM.

A avaliação do uso do monoclonal mostrou-se adequada para imunoensaaios destacando-se como nova ferramenta imunológica quando direcionada para isotipo IgM homólogo de *A. guariba clamitans*.

Este anticorpo homólogo mostrou-se adequado para detectar IgM total, bem como anticorpo específico deste isotipo direcionado para o parasita protozoário, *T. gondii*, em amostras de soro de *Alouatta*. A molécula de IgM de *A. clamitans guariba* foi purificada e inoculada em camundongos BALB/c. As células do baço dos camundongos foram fusionadas com células do mieloma SP₂O não secretoras de imunoglobulinas gerando células híbridas secretoras de anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio. Os sobrenadantes do painel de células híbridas foram testados para IgM de *A. guariba clamitans*. Entre as células híbridas AL1B4 foram secretoras de anticorpos monoclonais anti-IgM de bugio também denominados AL1B4. Esse monoclonal foi utilizado em todos os experimentos para determinar a concentração de IgM total, bem como do título de anticorpo específico deste isotipo direcionado para *T. gondii*.

Para os ensaios com a IgM de bugio procuramos utilizar em um primeiro momento anti-IgM de macaco rhesus em ensaio heterólogo e com o desenvolvimento do monoclonal anti-IgM de *Alouatta* passamos a utilizá-lo como anticorpo de detecção das IgM dos animais de cativeiro e de vida livre. Obtivemos soropositividade tanto com o uso do anticorpo homólogo bem como do anticorpo heterólogo, no entanto, com o anticorpo homólogo dois animais cativos foram IgM positivos em comparação com apenas um positivo com o anticorpo heterólogo.

O anticorpo monoclonal também foi avaliado como parte do ensaio de reação de imunofluorescência indireta como anticorpo homólogo na reação e da mesma forma

que na reação de ELISA dois animais de cativeiro foram considerados soropositivos para IgM anti-*T gondii*.

Ensaio de Bouer e colaboradores em 2010 mostraram que primatas *Cebus apella*, experimental ou naturalmente infectados por *T. gondii*, utilizando-se como técnicas sorológicas a RIFI e o ELISA com conjugados heterólogos, apresentaram-se soropositivos com índices de anticorpos IgG e IgM para o parasita. Pelo ELISA, a IgM foi detectada a partir do 3º dia de infecção e até o final do experimento, 102 dias pós-infecção. Das 209 amostras de soros dos primatas não humanos naturalmente infectados, de diversos zoológicos do Estado de São Paulo, 64,59 e 67,94% mostraram-se positivas para IgG pelo método de RIFI e ELISA, respectivamente. Pelo ELISA-IgM detectou-se soropositividade em 52,63% das amostras de soros, ao passo que pela RIFI detectou-se apenas 0,96% de soropositividade para IgM. Estes resultados são contrastantes com os obtidos no presente estudo que, com o uso do anticorpo monoclonal homólogo para IgM, observou-se as mesmas percentagens de soropositividade para este isotipo pelo ELISA (7,7%) e pela RIFI (7,7%).

Na população de *A. guariba clamitans* da cidade de Indaial analisada no presente estudo, foi constatada a ocorrência de infecção por *T. gondii* em 58,3%, conforme expresso pela detecção de anticorpos IgG. Além disso, em 5,6% desta população foi detectada IgM anti-*T. gondii* quando se utiliza anticorpos monoclonais gerados no presente estudo, expressando a presença de infecção que, levou estes animais à morte. Atualmente, não existem estudos relatando a soroprevalência de anticorpos anti-*T. gondii* na subespécie *A. guariba clamitans*. Garcia e colaboradores (2005) observaram na espécie *Alouatta caraya* uma soroprevalência de 17,6% (03/17) em animais selvagens capturados na região sul do Brasil, mas nenhuma informação

relacionada à susceptibilidade destes animais ao *T. gondii* foi discutida por estes investigadores.

Ensaio imunoturbidimétrico para proteínas (C3, C4, PCR, haptoglobina, IgA, IgG, IgM, RF, e transferrina) estão disponíveis para humanos. Para outros animais são pouco utilizados. Por exemplo, a proteína C-reativa (PCR) é um importante parâmetro imunológico. Em cães a PCR tem sido dosada por ensaios imunoturbidimétricos desenvolvidos para os seres humanos (MALI et al., 2009; KLENNER; BAUER; MORITZ, 2010).

No nosso trabalho dosamos IgM total de bugio por método imunoturbidimétrico comparando esses achados entre os animais de cativeiro e os animais de vida livre. Obtivemos como resultado uma maior concentração de IgM de bugio nos animais de vida livre. Observamos também que nos dois animais cativos soropositivos para IgM no ELISA para *T. gondii* havia uma maior concentração de IgM se comparados com os animais de vida livre e os outros animais de cativeiro. Esses resultados da imunoturbidimetria corroboraram com os obtidos no ELISA para IgM específico à *T. gondii* e com os resultados da imunohistoquímica.

A toxoplasmose tem sido demonstrada como um problema em várias espécies animais, incluindo primatas não-humanos, por causa de sua significativa susceptibilidade (BOUER et al, 1999; BOUER et al., 2010; CARME et al., 2009; CUNNINGHAM BUXTON; THOMSON, 1992; DIETZ et al, 1997; DUBEY et al, 1986; EPIPHANIO; SINHORINI; CATAO-DIAS, 2003; VALENTINI et al., 2004; SALANT et al., 2009). Pesquisas evidenciam que as espécies de jardins zoológicos apresentam maior susceptibilidade em adquirir a doença devido ao estresse ocasionado pela condição de cativeiro, em associação com a proximidade com felinos domésticos e silvestres que

podem eliminar oocistos nas fezes e o recebimento de carne crua ou mal cozida com a presença de cistos teciduais de *T. gondii* (BOUER et al., 2010; DUBEY; BEATTIE, 1988). Estas observações estão de acordo com os resultados do presente estudo, considerando que ambos os indivíduos *A. guariba clamitans*, que foram diagnosticados como afetados pela infecção por *T. gondii* e que morreram, encontravam-se em condições de cativeiro.

Nossos resultados para a imunohistoquímica revelaram a presença de *T. gondii* no fígado, baço e pulmão de ambos os animais, confirmando que a detecção do isotipo IgM para este parasita constitui um marcador adequado para diagnosticar a infecção recente.

Alouatta tem sido considerado o gênero de primata do Novo Mundo de mais ampla distribuição (ALMEIDA et al., 2012; NEVILLE et al., 1988). Por ser altamente susceptível a certas doenças infecciosas, como a febre amarela (FA), e por estarem presentes na maior área endêmica dessa doença no Brasil, tem sido proposto que esses animais sejam o alvo de destino mais adequado para o monitoramento da doença, um conceito que foi introduzido desde a década de 1930 (ALMEIDA et al., 2012; SOPER, 1936). O presente estudo revelou que *A. guariba clamitans* é susceptível à infecção por *T. gondii* e nesse sentido, esta espécie também poderia ser considerada um alvo apropriado para monitorar a toxoplasmose na região sul do Brasil. Além disso, esta proposta poderia ser fundamental para compreender a variabilidade genética de *T. gondii* na região e sua relação com a patogênese de macacos do Novo Mundo.

Não há dados conclusivos publicados atualmente na literatura sobre os genótipos de *T. gondii* em animais silvestres que circulam no Brasil, apesar de o país

abrigar a maior biodiversidade do planeta, tendo em conta o maior número de vertebrados terrestres e invertebrados do mundo (LAMBERTINI, 2000; PENA et al., 2011). Recentemente, foram identificados 16 genótipos de *T. gondii* isolados de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) no Brasil, apoiando a descoberta anterior de que essa população parasita é altamente diversificada no país (YAI et al., 2009). Além disso, foram descritas diferentes características genéticas e biológicas de *T. gondii* isolados de uma espécie de macaco do Novo Mundo, *Alouatta belzebul*, a partir de duas regiões brasileiras (PENA et al., 2011).

Portanto, mesmo considerando que já existam 88 genótipos até agora identificados de *T. gondii* (PENA et al., 2011; RAGOZO et al., 2010; SU; ZHANG; DUBEY, 2006; YAI et al., 2009), a partir de uma variedade de hospedeiros animais no Brasil, muito pouco se sabe sobre essa diversidade genética na patogênese de *A. guariba clamitans*.

Foi demonstrado no presente estudo a ocorrência de toxoplasmose aguda e crônica em *A. guariba clamitans*. Além disso, o anticorpo monoclonal gerado contra esses animais mostra ter sensibilidade adequada para ser utilizado em imunoenaios padronizados com a finalidade de detectar isotipo IgM, não só contra *T. gondii*, mas também para diagnosticar outras doenças infecciosas, como o vírus da febre amarela, vírus da imunodeficiência símia e parasitas da malária, que poderiam ser prejudiciais para os primatas não-humanos. Este é o primeiro relato descrevendo a geração de células monoclonais secretoras de anticorpos dirigidos à molécula de IgM de *A. guariba clamitans*.

VI – CONCLUSÕES

VI – CONCLUSÕES

1 – O anticorpo monoclonal gerado contra o isotipo IgM de macaco bugio (*A. guariba clamitans*) demonstrou ser adequado para ser utilizado em imunoensaios para a detecção de infecção recente por *T. gondii*.

2 – A utilização do anticorpo monoclonal homólogo em imunoensaios na detecção de IgM anti- *T. gondii* em bugio-ruivo (*Alouatta guariba clamitans*) mostrou-se mais efetivo quando comparado com o uso do anticorpo heterólogo anti-IgM de macaco Rhesus.

3 – Verificou-se soropositividade para anticorpos dos isótipos IgG (58,3%) e IgM (5,6%) para *T. gondii* em *Alouatta guariba clamitans* cativos e de vida livre.

4 – A imunoturbidimetria para IgM, utilizando-se o anticorpo monoclonal AL1B4, pode ser empregada como parâmetro de monitoramento imunológico para *A. guariba clamitans* mantidos em cativeiro.

5 – Observou-se reatividade cruzada do conjugado anti-Fc de IgG de camundongo/HRP contra IgG de *Alouatta guariba clamitans*.

6 – O uso de ferramentas imunológicas pode auxiliar no manejo e na conservação de *A. guariba clamitans* mantidos em cativeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L.M.; LUDWIG, G.; SVOBODA, W.K.; TEIXEIRA, G.M.; HILST, C.L.; SHIOZAWA, M.M.; MALANSKI, L.S.; MELLO, A.M.; NAVARRO, I.T.; PASSOS, F.C. Use of traps to capture black and gold howlers (*Alouatta caraya*) on the Islands of the upper Parana river, Southern Brazil. **American Journal of Primatology**, v. 69, n.2, p.241-247, 2007.

ALMEIDA, M.A.; SANTOS, E.; CRUZ, CARDOSO J.; FONSECA, D.F.; NOLL, C.A.; SILVEIRA, V.R.; MAEDA, A.Y.; SOUZA, R.P.; KANAMURA, C; Brasil RA. Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008-2009. **American Journal of Primatology**, v. 74, n.1, p. 68-76, 2012.

ARCE, C.; MORENO, A.; MILLÁN, Y.; MARTÍN DE LAS MULAS, J.; LLANES, D. Production and characterization of monoclonal antibodies against dog immunoglobulin isotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n.1-2, p.31-41, 2002.

ARROYO-RODRIGUEZ, V.; MANDUJANO, S. Forest fragmentation modifies habitat quality for *Alouatta palliata*. **International Journal of Primatology**, v. 27, n. 4, p. 1079-1096, 2006.

ARROYO-RODRIGUEZ, V.; DIAS, P.A. Effects of habitat fragmentation and disturbance on howler monkeys: A review. **American Journal of Primatology**. v.72, n.1, p. 1-16, 2010.

AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil**. São Paulo: Terra Brasilis, 1995, 168p.

BAK, H.; KYHSE-ANDERSEN, J.; THOMAS, O.R. High-through immunoturbidimetric assays for in-process determination of polyclonal antibody concentration and functionality in crude samples. **Journal of Chromatography. B**,

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, v.848, n.1, p.142-150, 2007.

BAKER, L.R.; SORAE, P.S. Re-introduction news: special primates issue. **Newsletter of reintroduction specialist group of IUCN/SSC**, Abu Dhabi, p. 60, 2002.

BARBOSA, B.F; SILVA, D. A. O.; COSTA, I.N.; PENA, J.D.O.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Susceptibilidade to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, n.7, p. 624-630, 2007.

BICCA-MARQUES, J.C. **Ecologia e comportamento de um grupo de bugios-pretos *Alouatta caraya* (Primates, Cebidae) em Alegrete, RS, Brasil**. 200f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ecologia, Universidade de Brasília, Brasília, 1991.

BICCA-MARQUES, J.C. How do howler monkeys cope with habitat fragmentation? In: Marsh LK, editor. **Primates infragroups: ecology and conservation**. New York: KluwerAcademics/Plenum Publishers, 2003, p 283–303.

BOUER, A.; WERTHER K.; CATÃO-DIAS J.L.; NUNES A.L. Outbreak of toxoplasmosis in *Lagothrix lagotricha*. **Folia Primatologica**, v.70, n.5, p. 282-285, 1999.

BOUER, A.; MACHADO, R. Z.; CAETANO, D. F. Evaluation of antibody response and antigenic characterization of *Toxoplasma gondii* in experimentally infected primates. **ARS VETERINARIA**, v. 22, n.2, p.153-158, 2006.

BOUER, A.; WERTHER, K.; MACHADO, R.Z; NAKAGHI, A.C.; EPIPHANIO, S.; CATÃO-DIAS, J.L. Detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in experimentally

and naturally infected non-human primates by Indirect Fluorescence Assay (IFA) and indirect ELISA. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p. 26-31, 2010.

BUTCHKO, G.M; INMAN, F.P. Mercaptan-induced fragmentation of a subunit-like proteolytic fragment of immunoglobulin M. **Biochemical Journal**, v. 127, n.5, p. 801-807, 1972.

CABRERA, A. Los nombres científicos de algunos monos americanos. **Ciencia-Revista Hispano-americana de Ciencias Puras y Aplicadas**, v.1, n.9, p. 402-405, 1940.

CABRERA, A. Catalogo de los Mamíferos de América del Sur. **Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia e Instituto Nacional de Investigación de las Ciencias Naturales**, v. 4, n.1, p. 1–627, 1957.

CABRERA, A. Catalogo de los mamíferos de la America del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturale**, v.16, n.1, p. 3-29, 1958.

CALAMEL, M.; LAMBERT, M. ELISA: elaboration d'un modèle mathématique informatisé pour l'expression du sérodiagnostic de la toxoplasmose uen U.I. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.136, n.6, p.295-302, 1985.

CARME, B.; AJZENBERG, D.; DEMAR, M.; SIMON, S.; DARDÉ, M.L.; MAUBERT, B.; DE THOISY, B. Outbreaks of toxoplasmosis in a captive breeding colony of squirrel monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1-2, p.132-135, 2009.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE PRIMATAS BRASILEIROS. CPB. Disponível em: <http://www4.icmbio.gov.br/cpb/>. Acesso em 07 de jan. de 2012.

CHAPIN III, F.S.; SALA, O.E.; BURKE, I.C.; GRIME, J.P.; HOOPER, D.U.; LAUENROTH, W.K.; LOMBARD, A.; MOONEY, H.A.; MOSIER, A.R.; NAEEM, S.; PACALA, S.W.; ROY, J.; STEFFEN, W.L.; TILMAN, D. Ecosystem consequences of changing biodiversity: experimental evidence and a research agenda for the future. **BioScience**, v.48, n.1, p.45-52, 1998.

CHEONG, C.; IDOYAGA J.; DO, Y.; PACK, M.; PARK, S.H.; LEE, H.; KANG, Y.S.; CHOI, J.H.; KIM, J.Y.; BONITO, A.; INABA, K.; YAMAZAKI, S.; STEINMAN, R.M.; PARK, C.G. Production de monoclonal antibodies thar recognize the extracellular domin of mouse Langerin/CD207. **Journal of Immunological Methods**, v.324, n.1-2, p. 48-62, 2007.

COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARGULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBE, W., eds. **Current Protocols in Immunology**, v.1, p. 2.7.6, 2.91, v.5, p. A.31.1-A.31.2, 2007.

CRESPO, J.A.. Presence of the reddish howling monkey (*Alouatta guariba clamitans* Cambrera) in Argentina. **Journal of Mammalogy**, v. 35 n.1, p.117-118, 1954.

CUNHA-JÚNIOR, J.P.; SILVA, D.A.; SILVA, N.M.; SOUZA, M.A.; SOUZA, G.R.; PRUDENCIO, C.R.; PIROVANI, C.P.; CEZAR, M.; CASCARDO, J.; BARBOSA, B.F.; GOULART, L.R.; MINEO, J.R. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. **Immunobiology**, v. 215, n.1, p. 26-37, 2010.

CUNNINGHAM, A.A.; BUXTON, D.; THOMSON, K.M. An epidemic of toxoplasmosis in a captive colony of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of Comparative Pathology**, v.107, n.2, p. 207-219, 1992.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A.A.; HYATT, A.D. Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452: 443-449, 2000.

DIETZ, H.H.; HENRIKSEN, P.; BILLE-HANSEN, V.; HENRIKSEN, S.A.; Toxoplasmosis in a colony of new world monkeys. **Veterinary Parasitology**, v. 68, n.4, p. 299-304, 1997.

DUBEY, J.P.; KRAMER, I.W.; WEISBRODE, S.E. Acute death associated with *Toxoplasma gondii* in ring-tailed lemurs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 187,n.11, p.1272-1273. 1985.

DUBEY, J. P.; BRAKE, R. J.; MURRELL, K. D.; FAYER, R. Effects of irradiation on the viability of *Toxoplasma gondii* cysts in tissues of mice and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.3, p.518–522, 1986.

DUBEY, J.P.; BEATTIE, C.P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Florida: CRC Press. 1988, 220 p.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 205, n.11, p.1593-1598, 1994.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.2, p. 267-299, 1998.

DUBEY, J.P. Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.69–75, 2006.

DUBEY, J.P. The history of *Toxoplasma gondii* – 100 first years. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 55, n.6, p. 467-475, 2008.

DUBEY, J.P. History of the discovery of the cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.39, n.8, p. 877-882, 2009.

EKANAYAKE, D. K; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; DUBEY, J. P.; DITTUS, W. P. J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild toque macaques (*Macaca sinica*) at Polonnaruwa, Sri Lanka. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n.4, p. 870–871, 2004.

EPIPHANIO S.; SINHORINI I.L; CATÃO-DIAS, J.L. Pathology of toxoplasmosis in captive new world primates. **Journal of Comparative Pathology**, v.129, n.2-3, p. 196-204, 2003.

FERGUSON, D.J.P. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p. 133-148, 2009.

FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; GOMES, A.O.; SILVA, A.L.; PENA, J.D.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A.V. Evaluation of vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* model after reinfection with heterologous and virulent strain. **Placenta**, v. 32, n.2, p. 116-120, 2011.

FERRO E.A.V.; SILVA, D.A.O; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Effect of *Toxoplasma gondii* infection kinetics on trophoblast cell population in *Calomys callosus*, a model of congenital toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v.70, n.12, p.7089-7094, 2002.

GARCIA, J.L.; SVOBODA, W.K.; CHRYSSAFIDIS, A.L.; DE SOUZA, SHIOZAWA, M.M.; DE MORAES, A.L.; TEIXEIRA, G.M.; LUDWIG, G.; DA SILVA, L.R.; HILST,

C.; NAVARRO, I.T. Seroepidemiological survey for toxoplasmosis in wild new world monkeys (*Cebus* spp.; *Alouatta caraya*) at the Paraná river basin, Paraná State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n.4, p. 307-311, 2005.

GREGORIN, R. Taxonomia e variação geográfica das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède (Primates, Atelidae) no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n.1, p. 64-144, 2006.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, NY: Cold Spring Harbor, 1988. 726 p.

HILL, W.C.O. **Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy**. Edinburgh: Edinburgh University Press, 1960, p. 300.

HIRANO, Z.M.B. **Secreção epidérmica de *Alouatta guariba clamitans* (Primates: Atelidae)**. 144 f. Tese (Doutorado em Biologia Comparada) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, 2004.

HIRSCH, A.; LANDAU, E. C.; TEDESCHI, A. C. M.; MENEGHETI, J. O. Estudo comparativo das espécies do gênero *Alouatta* Lacépède, 1799 (Platyrrhini, Atelidae) e a sua distribuição geográfica na América do Sul. **A Primatologia no Brasil – 3**, A. B. Rylands e A. T. Bernardes (eds.), 1991, p.239–263. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

HUTCHISON, W. M. Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. **Nature**, v. 206, n. 1, p. 961–962, 1965.

HUTCHISON, W. M.; DUNACHIE, J. F.; WORK, K.; SIIM, J. C. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, n.3, p. 380–388, 1971.

ISHIZUKA, M.M.; MIGUEL, O.; BROGLIATO, D.F. Prevalência de anticorpos anti-Toxoplasma em soros de cães no município de São Paulo. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 11, n.1, p. 115-125, 1974.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. Red List of Threatened Species. 2011. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em **05 de jan. de 2012**.

KLENNER, S.; BAUER, N.; MORITZ, A. Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.22, n. 4, p.544-52, 2010.

LAMBERTINI, M. **A naturalists's guide to the tropics**. Chicago: The University of Chicago Press., p.338, 2000.

LAURANCE, W.F.; FERREIRA, L.V.; RANKIN-DEMERONA, J.M.; LAURANCE, S.G.; HUTCHINGS, R.; LOVEJOY, T.E. Effects of forest fragmentation on recruitment patterns in Amazonian tree communities. **Conservation Biology**, v.12, n.2, p. 460–464, 1998.

MALI, B.; ARMBRUSTER, D.; SEREDIK, E.; OTTENBREIT, T. Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins. **Clinical Biochemistry**. v.42, n.15, p.1568-71, 2009.

MARQUES, A.A.B. Primatas. In: Fontana CS, Benck GA, Reis RE, editors. **Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: EDIPUCRS. p 499-506, 2003.

MINEO, J.R.; CAMARGO, M.E.; FERREIRA, A.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 27, p. 283-287, 1980.

MINEO, T.W.P.; SILVA, D.A.O.; COSTA, G.H.N.; VON ANCKEN, A.C.B.; KASPER, L.H.; SOUZA, M.A.; CABRAL, D.D.; COSTA, A.J.; MINEO, J.R. Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.98. n.4, p. 239-245, 2001.

MIRANDA, J.M.D.; PASSOS, F. C. Hábito alimentar de *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates: Atelidae) em Floresta de Araucária, Paraná. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n.4, p. 821-826, 2004.

MIRANDA, J.M.D.; BERNARDI, I.P.; MORO-RIOS, R.F.; PASSOS, F.C. Three years on demography of a group of *Alouatta guariba clamitans* Cabrera (Primates, Atelidae): growth and fragmentation. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.23, n.3, p. 703-706, 2006.

MOREIRA, M.A.A.; BONVICINO, C.R.; SOARES, M.A.; SEUANEZ, H.N. Genetic diversity of Neotropical Primates: phylogeny, population genetic, and animal models for infection diseases. **Cytogenetic and Genome Research**, v.128, n.1-3, p.88-98, 2010.

MORO-RIOS, R.F.; SERUR-SANTOS, C.S.; MIRANDA, J.M.D.; PASSOS F.C. Obtenção de água por um grupo de *Alouatta clamitans* (Primates: Atelidae), em Floresta de Araucária: variações sazonais, sexo-etárias e circadianas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 25, n.3, p. 558-562, 2008.

MUNOZ, M.; LIESENFELD, O.; HEIMESAAT, M.M. Immunology of *Toxoplasma gondii*. **Immunological Reviews**, v. 240, n.1, p. 269-285, 2011.

NEVILLE, M.K.; GLANDER, K.E.; BRAZA, F.; RYLANDS, A.B. The howling monkeys, genus *Alouatta*. In: Rylands AB, Coimbra-Filho AF, Fonseca GAB, editors. **Ecology and behavior of neotropical primates**. Washington, DC, World

Wildlife Foundation. p 349–453. 1988.

PENA, H.F.J.; MARVULO, M.F.V.; HORTA, M.C.; SILVA, M.A. ; SILVA, J.C.R.; SIQUEIRA, D.B., LIMA, P.-A.C.P., VITALIANO, S.N.; GENNARI, S.M. Isolation and genetic characterisation of *Toxoplasma gondii* from a red-handed howler monkey (*Alouatta belzebul*), a jaguarundi (*Puma yagouaroundi*), and a black-eared opossum (*Didelphis aurita*) from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.175, n.3-4, p. 377–381, 2011.

RAGOZO, A.M.A.; PENA, H.F.J.; YAI, L.E.O.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among *Toxoplasma gondii* isolates of small ruminants from Brazil: novel genotypes revealed. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 307-312, 2010.

REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, 856p.

SALANT, H.; WEINGRAM, T.; SPIRA, D.T.; EIZENBERG, T. An outbreak of toxoplasmosis amongst squirrel in on Israeli monkey colony. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n.1, p. 24-29, 2009.

SILVA, D.A.O.; VITALIANO, S.N.; MINEO, T.W.P.; FERREIRA, R.A.; BEVILACQUA, E.; MINEO, J.R. Evaluation of homologous, heterologous, and affinity conjugates for the serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1212-1216, 2005.

SILVA FILHO, H.H.; PAJUABA, A.C.M.A.; SILVA, D.A.O.; SOUZA JUNIOR, J.C.; HIRANO, Z.M.B.; MINEO, J.R. Avaliação de conjugado heterólogo e de afinidade para sorodiagnóstico de infecção por *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) em bugios (*Alouatta guariba clamitans* Cabrera, 1940) mantidos em cativeiro. **A Primatologia no Brasil**, v. 12, p. 250-256, 2011.

SCHRAGO, C.G. On the time scale of new world primate diversification. **American Journal of Physical Anthropology**, v.132, n.3, p. 344-54, 2007.

SILVA, J.C.; OGASSAWARA, S.; ADANIA, C.H.; FERREIRA, F.; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; FERREIRA-NETO, J.S. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in captive neotropical felids from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 102, p. 217-224, n.3, 2001.

SMITH, K.F.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; PEDERSEN, A.B. The role of infectious diseases in biological conservation. **Animal Conservation**, v.1, n.12, p.1-12, 2009.

SOPER, F.L. Jungle yellow fever. A new epidemiological entity in South America. **Revista de Hygiene e Saúde Pública**, v. 10, n.4, p.109–144, 1936.

SOUZA JUNIOR, J. C. **Perfil sanitário de bugios ruivos, *Alouatta guariba clamitans* (Cabrera, 1940) (Primates: Atelidae): um estudo com animais recepcionados e mantidos em perímetro urbano no município de Indaial. Santa Catarina – Brasil. 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2007.**

SOUZA, W.; MARTINS-DUARTE, E.S.; LEMGRUBER, L.; MÁRCIA ATTÍAS, M.; VOMMARO, R.C. Organização estrutural do taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, n.1, p. 131-143, 2010.

SPENCER, J.A.; HIGGINBOTHAM, M.J.; BLAGBURN, B.L. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.34, n.3, p. 246-249, 2003.

SU, C.; ZHANG, X.; DUBEY, J.P. Genotyping of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP markers: a high resolution and simple method for identification of

parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n.7, p. 841–848, 2006.

VALENÇA-MONTENEGRO, M.M.; LAROQUE, P.O.; ELOY, E.C.C.; OLIVEIRA, M.M. Monitoramento de ocorrência de doenças em populações cativas e silvestres de primatas brasileiros. In: **XI Congresso Brasileiro de Primatologia**. Porto Alegre. Resumo. p. 171, 2005.

VALENTINI, E.J.G., CAPRARA, A.; SOUZA, S.L.P.; MATTARAIA, V.G.M.; GENNARI S.M.; RODRIGUES, U.P.; FRANCISCO, F.M.; SOARES, R.M. Investigação sorológica de infecção por *Toxoplasma gondii* em colônia de macacos da espécie *Macaca mulatta*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, n.4, p.507-510, 2004.

VIDOTTO, O. Toxoplasmose: epidemiologia e importância da doença na saúde animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 13, n.1, p. 69-75, 1992.

YAI, L.E.O.; RAGOZO, A.M.A.; SOARES, R.M.; PENA, H.F.J.; SU, C.; GENNARI, S.M. Genetic diversity among capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) isolates of *Toxoplasma gondii* from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.162, n. 3-4, p. 332–337, 2009.

YAN, B.; VALLIERE-DOUGLASS, J.; BRADY, L., STEEN, S., HAN, M., PACE, D., ELLIOTT, S.; YATES, Z.; HAN, Y.; BALLAND, A.; WANG, W.; PETTIT, D. Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1164, n.1-2, p. 153-161, 2007.

YOKOYAMA, W.M.; CHRISTENSEN, M.; SANTOS, G.; MILLER, D. Production of Monoclonal Antibodies. **Current Protocols in Immunology**, n.5, 2006.