

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

ANTICORPOS IGY POLICLONAIS: FERRAMENTAS AUXILIARES PARA O
ESTUDO *IN VITRO* DE *TOXOPLASMA GONDII*

Álvaro Ferreira Júnior

Uberlândia
Maio/2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

ANTICORPOS IGY POLICLONAIIS: FERRAMENTAS AUXILIARES PARA O
ESTUDO *IN VITRO* DE *TOXOPLASMA GONDII*

Tese apresentada ao Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas como requisito
parcial a obtenção do título Doutor

Álvaro Ferreira Júnior

Orientador: Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo

Co-orientador: Dr. Jair Pereira Cunha Júnior

Uberlândia

Maio/2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383a Ferreira Júnior, Álvaro, 1970-
2012 Anticorpos IgY policlonais: ferramentas auxiliares para o estudo *in vitro* de *Toxoplasma gondii* / Álvaro Ferreira Júnior. – 2012.
114 f. : il.

Orientador: 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. Imunodiagnóstico - Teses. 3. Imunoglobulinas - Teses. 4. Proteômica - Teses. 5. *Toxoplasma gondii* - Teses. I. Mineo, Tiago Wilson Patriarca. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. 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: coipa@ufu.br - Telefax: www.imunoparasito.ufu.br (034)3218-2333



Álvaro Ferreira Júnior

"Anticorpos IgY policlonais: ferramentas auxiliares para o estudo *in vitro* de *Toxoplasma gondii*"

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, 24 de maio de 2012.


Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares
USP/Pirassununga


Profa. Dra. Joeli F. Figueiredo Bittar
UNIUBE


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


Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva
ICBIM/UFU


Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo – orientador
ICBIM/UFU

A todos aqueles que superam as
dificuldades e alcançaram seus
objetivos.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Jandra Pacheco dos Santos, minhas filhas Gabriela e Daniela, meus pais, minha irmã e toda minha família por me incentivarem desde o início até a conclusão desta importante etapa da minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por incentivar os cursos de pós-graduação no Brasil, assim como pelo apoio financeiro e tecnológico para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas pela oportunidade de realizar este estudo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Lucélia e Luceleide, obrigado por todas as orientações, pelo bom atendimento, pela cordialidade e pelo bom-humor.

Ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, agradeço pela abertura ao diálogo, por permitir a expressão dos alunos e pelo esforço em estimular a pesquisa em nossa região.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia (UFU), por me receber e disponibilizar o pessoal e o material necessários para a conclusão desta pesquisa.

Ao professor Dr. José Roberto Mineo, coordenador do Laboratório de Imunoparasitologia (UFU) por ter confiado e investido neste estudo.

Ao professor Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por ter aceitado a tarefa de orientação dessa pesquisa. Obrigado pelo profissionalismo, competência e dedicação.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Uberlândia, Triângulo Mineiro, por gentilmente ceder as galinhas e as condições necessárias para a manutenção dos animais durante o período de imunizações.

À professora Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela generosidade em ensinar e acompanhar a realização dos experimentos, e pela dedicação no trabalho de correção do projeto e colaboração no artigo para a publicação.

À professora Dra. Fernanda Santiago, pela inestimável ajuda durante a execução dos experimentos. Obrigado pelo tempo investido neste projeto.

Ao professor Dr. Jair Pereira Cunha Júnior, pelas observações pertinentes e sempre esclarecedoras durante a etapa de caracterização dos anticorpos.

Aos professores Dr. Marcelo Emílio Beleti, Dr. Cláudio Vieira da Silva e Dra. Neide Maria da Silva pelo tempo dedicado e pelos excelentes comentários quando da minha qualificação.

Ao professor Dr. Hercílio Higino Filho, pela amizade e pela ajuda na etapa de purificação dos anticorpos.

À biomédica Ana Caroline Martins, à bióloga Flávia Batista Ferreira, aos médicos veterinários Murilo Vieira da Silva e Matheus Souza, por toda a colaboração durante a realização dos experimentos.

Aos técnicos Ana Cláudia Pajuaba, Marley Dantas e Zilda Maria, obrigado por todo o suporte necessário para que os experimentos fossem conduzidos de forma eficiente e em tempo hábil.

Ao Laboratório do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilização de equipamentos indispensáveis na purificação dos anticorpos.

Aos amigos de laboratório, vocês a quem eu fiz rir e que retribuíram da mesma forma, vocês tornaram a convivência harmoniosa e estreitaram os laços afetivos entre nós, por força do destino vamos nos separar inevitavelmente, mas sempre que precisarem contem comigo.

Aos colaboradores não mencionados, me perdoem pois a memória pode falhar, entretanto saibam que na mão a remoção do menor dos dedos, fará com que o funcionamento do todo seja comprometido.

Embora o alicerce para uma construção sólida seja o primeiro a ser realizado,
ele permanece invisível, entretanto a sua remoção faz com que todo o resto
desmorone,
Na minha concepção, assim é Deus, não o vejo, mas Ele está o tempo todo
sustentando minha vida e a daqueles a quem eu tenho consideração.

Obrigado Deus!!!

Lista de símbolos e abreviaturas

°C - graus Celsius
μg - micrograma
μL - microlitro
μM - micromolar
2D - bidimensional
APS - persulfato de amônio
ATCC - *American Type Culture Collection*
BCA - Ácido bicinconínico
CEUA - Comissão de Ética na Utilização de Animais
CFSE - ester de carboxifluoresceína diacetato succinimidil
D.O. - densidade óptica
DAB - 3,3' - diaminobenzidino tetrahydrocloro
DAPI - 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DTT - ditioneitol
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
FIE - focalização isoeletrica
FITC - isotiocianato de fluoresceína
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
HCl - ácido clorídrico
IFET-TM - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Uberlândia
IFN-γ - Interferon gama
IgG - imunoglobulina G
IgY - Imunoglobulina Y
kDa - kilodalton
mg - miligrama
mM - miliMolar
MOI - *multiplicity of infection*
nm - nanômetro
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS - solução tamponada com fosfatos
PBS-T-BSA - PBS - tween - albumina sérica bovina
PBS-T-M - PBS - tween - molico
pH - potencial hidrogeniônico
pI - ponto isoeletrico
PM - peso molecular
RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute
SDS - dodecil sulfato de sódio
STAg - antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii*
T. gondii- *Toxoplasma gondii*
TBS - solução tamponada com Tris
TCD4 - linfócito T auxiliar
TCD8 - linfócito T citotóxico
TEMED - Tetrametiletilenediamino
UFU - Universidade Federal de Uberlândia

Lista de reagentes

Capítulo 1

Animais

Galinhas *Isa Brown* com 25 semanas de idade

Produção de antígenos solúveis totais de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*

Camundongos da linhagem Swiss

Inibidor de proteases (Complete, Sigma)

Kit de dosagem proteica - ácido bicinconínico (kit BCA, Sigma)

Meio RPMI 1640

STAg

Taquizoítos de *T. gondii* cepa RH

Imunização das galinhas

Adjuvante completo de Freund (Sigma)

Adjuvante incompleto de Freund (Sigma)

Solução de STAg

Purificação dos anticorpos IgY

Remoção dos lipídeos da gema e precipitação dos anticorpos IgY

Água ultrafiltrada

Sulfato de sódio 19%

Coluna de gel filtração Sephacryl S-300 (GE Healthcare)

Ácido Clorídrico 0,1N

Tris HCl (0,02M) - NaCl (0,5M)

Tampão PBS pH 7,2

SDS-PAGE

Acrilamida/bisacrilamida

Coomassie Blue 250R

Dodecil-sulfato de sódio (SDS)

EDTA

Gel de poliacrilamida

PBS-T-Molico 5%

Persulfato de amônio

Tetrametiletilenediamino

Slot-dot

Diaminobenzidino tetrahydrocloroeto

IgG de coelho anti IgY marcado com peroxidase

Peróxido de hidrogênio 30% (sigma)

Tampão TBS

Capítulo 2

ELISA convencional e avidéz

Solução de STAg

PBS-Tween-albumina sérica bovina 1% (PBS-T-BSA 1%)

Anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcado com peroxidase (Sigma)

Placas de poliestireno (Corning-Costar, EUA)

Uréia 6M

Peróxido de hidrogênio 0,03% (Sigma)

PBS-Tween 0,05% (PBS-T)

2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS, Sigma)

Tampão carbonato 0,06M, pH 9,2

Western blot unidimensional (1D-WB)

3,3' Diaminobenzidino (DAB) (Sigma)
Corante Ponceau (Sigma)
Géis de poliacrilamida a 12%
IgG de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase (Sigma)
Membranas de nitrocelulose 8cm de largura x 6cm de altura
PBS-T
PBS-T-M-1%
PBS-T-Molico-5% (PBS-T-M-5%)
Peróxido de hidrogênio 30% (Sigma)
Tampão Tris (TBS)
Uréia 6M (1D-WB avides)

Capítulo 3

Imunohistoquímica

4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)
Cortes histológicos desparafinizados de cérebro de camundongo cronicamente infectado com *T. gondii*
Glicerina tamponada com carbonato (pH 9,0)
IgG de coelho anti-IgY marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC)
PBS

Imunocitoquímica

Células HeLa (ATCC N° CCL-2)
DAPI 0,02%
Formaldeído 4%
IgG de coelho conjugada com FITC
Meio RPMI-1640
PBS
Placas de cultivo com 24 poços
Tampão citrato (pH 6,3)
Taquizoítos de *T. gondii* cepa RH
Triton-X 100 0,1%

Western blot bidimensional (WB-2D)

Solução de agarose 0,5%
Água ultrapura
Anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase
Anticorpos IgG de coelho anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma)
Bromofenol 0,02%
Comassie Brilliant Blue G-250 coloidal (Sigma)
Corante Ponceau
DAB (Sigma)
Gel de poliacrilamida 12,5% para WB-2D
Marcador molecular (BenchMark Protein Ladder 6-200 kDa, Invitrogen)
Membranas de nitrocelulose
Óleo mineral (Immobiline DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare)
PBS-T
PBS-T-M-1%
PBS-T-M-5%
Peróxido de hidrogênio 30% (Sigma)
Solução de STAg
Tampão de reidratação (DeStreak e IPG buffer pH 3-10,, GE Healthcare)
Tampão SDS

Tampão Tris (TBS)

Tampão-Tris glicina

Tiras de focalização isoeétrica (ReadyStrip, Bio-Rad) 7 cm, pH imobilizado 3-10

Inibição da replicação de T. gondii

Células HeLa (ATCC N° CCL-2)

Ester de carboxyfluoresceína diacetato succinimidil (CFSE) 5 μ M

Meio RPMI 1640

Placas de cultivo celular com 24 poços

Soro fetal bovino 10%

Taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH

Tripsina 0,5%

Lista de figuras

Figura 1: Purificação de anticorpos IgY totais	49
Figura 2: Cromatograma das frações obtidas através de gel filtração de anticorpos IgY	50
Figura 3: Concentração proteica média das amostras de anticorpos IgY após precipitação com sulfato de sódio	51
Figura 4: Resultado dos processos de purificação dos anticorpos IgY totais	52
Figura 5: Enriquecimento de anticorpos IgY após diferentes etapas da purificação	53
Figura 6: Cinética da produção de anticorpos IgY policlonais anti-STAg	61
Figura 7: Reatividade residual de anticorpos IgY anti-STAg após tratamento com uréia 6M	62
Figura 8: Índice avides de anticorpos IgY anti-STAg	63
Figura 9: Perfil de reconhecimento de proteínas antigênicas de <i>T. gondii</i> por anticorpos IgY anti-STAg em <i>Western blot</i> unidimensional	66
Figura 10: Avides de anticorpos IgY para diferentes antígenos de <i>T. gondii</i> em <i>Western blot</i> unidimensional	67
Figura 11: Perfil de reconhecimento de proteínas antigênicas de <i>T. gondii</i> por anticorpos IgG policlonais de camundongos anti-STAg em <i>Western blot</i> unidimensional	68
Figura 12: Perfil de reconhecimento de alvos antigênicos STAg através de IgY e IgG específicas após imunização pelas vias subcutânea ou intramuscular	69
Figura 13: Detecção de antígenos de STAg através de anticorpos IgY anti- <i>Neospora caninum</i> e anti- <i>Eimeria</i> spp.	70
Figura 14: Imunohistoquímica para detecção de <i>T. gondii</i> em tecidos formolizados utilizando anticorpos IgY policlonais anti-STAg	80
Figura 15: Imunocitoquímica para detecção de <i>T. gondii</i> em monocamadas de células HeLa utilizando IgY policlonal anti-STAg	81
Figura 16: <i>Western blot</i> 2D de antígenos solúveis de <i>T. gondii</i> detectados por anticorpos policlonais de galinhas e camundongos:	83
Figura 17: Avaliação da invasão celular por taquizoítos de <i>T. gondii</i> cultivados em presença de anticorpos IgY policlonal anti-STAg:	85

Sumário

1.	Referencial teórico	16
1.1.	Aspectos gerais do sistema imunológico das galinhas	17
1.1.1.	Estrutura do sistema imunológico	17
1.1.1.1.	Timo	17
1.1.1.2.	Bursa de Fabricius	18
1.1.1.3.	Baço	18
1.1.2.	Classes e estrutura das imunoglobulinas das galinhas	19
1.1.3.	Geração do repertório de anticorpos IgY	20
1.1.4.	Transferência de anticorpos IgY maternos para a gema do ovo	21
1.2.	Produção de anticorpos IgY policlonais específicos	22
1.2.1.	Características e inoculação dos antígenos	23
1.2.2.	Purificação e caracterização dos anticorpos	24
1.2.3.	Aplicações dos anticorpos policlonais	25
1.3.	<i>Toxoplasma gondii</i>	25
1.3.1.	Histórico e diversidade	25
1.3.2.	Biologia de <i>T. gondii</i>	26
1.3.2.1.	Estágios infectantes	27
1.3.2.1.1.	Taquizoítos	27
1.3.2.1.2.	Bradizoítos	28
1.3.2.1.3.	Esporozoítos	30
1.3.2.1.4.	Hospedeiros, ciclo de vida e invasão celular	31
1.3.2.1.5.	Interconversão de estágio	32
1.3.3.	Epidemiologia da toxoplasmose	33
1.3.4.	Estudos <i>in vitro</i> utilizando anticorpos específicos em modelos com <i>T. gondii</i>	34
2.	Objetivos	35
2.1.	Geral	35
2.2.	Específicos	35
3.	Capítulo I: Produção e purificação de anticorpos IgY anti-STAg	36
3.1.	Material e métodos	37
3.1.1.	Animais	37

3.1.2.	Grupos experimentais	38
3.1.2.1.	Galinhas	38
3.1.2.2.	Camundongos	38
3.1.3.	Produção de antígenos solúveis totais de taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i>	38
3.1.4.	Produção de antígenos solúveis de taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> (NLA)	39
3.1.5.	Imunização dos animais	40
3.1.5.1.	Galinhas	40
3.1.5.2.	Camundongos	41
3.1.6.	Coleta de ovos	41
3.1.7.	Armazenamento das gemas puras	41
3.1.8.	Purificação dos anticorpos IgY totais	42
3.1.8.1.	Remoção da fração rica em lipídeos da gema	42
3.1.8.2.	Precipitação dos anticorpos IgY totais	43
3.1.8.3.	Gel filtração por exclusão de peso molecular	43
3.1.9.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	44
3.1.10.	<i>Slot-dot</i>	44
3.1.11.	Análise estatística	45
3.2.	Resultados	46
3.2.1.	Produção dos antígenos solúveis	46
3.2.2.	Imunização das galinhas e coletas dos ovos	46
3.2.3.	Estoque de gemas	46
3.2.4.	Purificação dos anticorpos IgY totais	47
3.2.5.	Qualidade da purificação de anticorpos IgY totais	47
3.2.6.	Enriquecimento das amostras purificadas com anticorpos IgY	48
4.	Capítulo II: Caracterização dos anticorpos IgY anti-STAg	54
4.1.	Material e métodos	55
4.1.1.	Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto	55
4.1.2.	ELISA avides	56
4.1.3.	<i>Western blot</i> unidimensional convencional e avides	57
4.1.4.	Análise estatística	58
4.2.	Resultados	59

4.2.1.	Cinética de detecção e avidéz de anticorpos IgY policlonais anti-STAg	60
4.2.2.	Reconhecimento das proteínas antigênicas de <i>T. gondii</i>	64
5.	Capítulo III: Utilização dos anticorpos IgY anti-STAg em ensaios de imunomarcacão, proteômica e proteçãofrente a infecçãofrente a	71
5.1.	Material e métodos	72
5.1.1.	Imunohistoquímica	72
5.1.2.	Imunocitoquímica	73
5.1.3.	<i>Western blot</i> bidimensional	74
5.1.4.	Inibiçãoda replicaçãode <i>T. gondii</i>	76
5.2.	Resultados	78
5.2.1.	Imunomarcacão	78
5.2.2.	Proteômica	82
5.2.3.	Proteçãofrente a infecçãofrente a	84
6.	Discussão	86
7.	Conclusões	92
8.	Referências	93

RESUMO

Anticorpos policlonais específicos podem ser obtidos em grandes quantidades a partir da gema do ovo de galinhas imunizadas, denominados anticorpos IgY. Embora semelhantes funcionalmente aos anticorpos IgG de mamíferos, os anticorpos IgY apresentam vantagens: (i) extração sem estresse para o animal; (ii) menor número de animais utilizados na produção; (iii) grandes concentrações de anticorpos por gema; (iii) não sofre interferência do fator reumatóide e de proteínas do sistema complemento de mamíferos; (iv) interage apenas com receptores para Fc de galinha. Os anticorpos IgY são utilizados em estudos da relação patógeno versus hospedeiro, proteômica e biologia de agentes infecciosos. *Toxoplasma gondii* é um parasito amplamente distribuído e com grande número de hospedeiros, incluindo o homem, e pode ocasionar lesões em fetos humanos e de animais domésticos. A relação *T. gondii* versus hospedeiros, o papel dos antígenos do parasito nos processos de infecção e manutenção do parasitismo intracelular, podem ser investigados pela incubação do parasito com anticorpos específicos obtidos de mamíferos. Os anticorpos de mamíferos são obtidos em concentrações limitadas e por meio de procedimentos dolorosos. Neste estudo, galinhas foram imunizadas com antígenos solúveis de *T. gondii* da cepa RH. Foram extraídos, em média, 4 mg de IgY/ mL de gema de ovo. Detectaram-se anticorpos IgY anti-STAg de alta avidéz após o segundo *booster*, também reconheceram alvos antigênicos de distintos pesos moleculares. Os anticorpos IgY anti-STAg detectaram o parasito intracelular em cultivos de células HeLa e também em cortes histológicos de tecido fixado. Diferente dos anticorpos IgG de camundongos, nos ensaios *Western blot* 1D e 2D, os anticorpos IgY reconheceram proteínas antigênicas de pesos moleculares e pontos isoelétricos distintos, respectivamente. Em ensaio de proliferação do parasito, observou-se que a incubação dos taquizoítos de *T. gondii* com os anticorpos IgY específicos reduziu parcialmente o parasitismo intracelular. Concluiu-se que anticorpos IgY policlonais são ferramentas eficazes para estudos da biologia de *T. gondii* e podem auxiliar na pesquisa de alvos antigênicos para utilização em diagnóstico e produção de vacinas.

ABSTRACT

Specific polyclonal antibodies obtained from egg yolk of the immunized chicken are named immunoglobulin Y (IgY). Although functionally related to mammal immunoglobulin G (IgG), IgY presents advantages, as follows: (i) elevated purified amounts of antibodies from one egg; (ii) the reduced of immunized animal number (iii) no interference with rheumatoid factor or mammal Complement proteins; (iv) binds only to chicken specific Fc fragment receptor. Polyclonal IgY antibodies could be employed as a primary or secondary reagent to investigate pathogen and host relationship, proteomic studies or infectious microorganisms biology. *Toxoplasma gondii* is a worldwide intracellular parasite which infects warm-blood hosts, including human. Toxoplasmosis causes fetal disorders in human and domestic animals. Tachyzoites and bradyzoites of *T. gondii* are stages related to host cell parasitism and also toxoplasmosis pathogeny. The specific IgG antibodies of mice are used to investigate virulence factors associated to *T. gondii* and evaluate mechanisms correlated to host immune response modulation by parasite antigens. However reduced amounts of specific IgG antibodies are obtained from a bled animal. Chickens and mice could have distinct antigenic proteins recognition profile even though using identical immunization protocols, probably this a consequence of phylogenetic distance between these two species. Specific polyclonal IgY were obtained from *T. gondii* soluble total antigens (STAg) immunized chickens at average of 4 mg/mL of pure yolk by a low cost and easy method. High avidity anti-STAg polyclonal IgY recognized distinct weight molecular antigenic proteins at second booster, and these antibodies were applied in standardized immunoassays with *T. gondii*. First, tissue cysts, parasitophorus vacuoles and also extracellular tachyzoites were detected in sections of chronically infected mice brain by a IgY-immunohistochemistry assay, complementally tachyzoites also were identified in a monolayer of infected HeLa cells by a IgY-immunocytochemistry assay, both methods used a anti-IgY FITC-conjugate secondary antibody. Additionally, STAg proteins two-dimensionally resolved were proved against *T. gondii* purified specific IgY and mice antiserum by a Western blot assay, the results demonstrated that egg yolk chicken antibodies identified acid antigens better than mice antisera. Finally, incubation of *T. gondii* tachyzoites with polyclonal anti-STAg IgY reduced intracellular parasitism in HeLa cells culture. In conclusion, polyclonal anti-STAg IgY antibodies present efficacy for application in immunoassays which investigate antigenic proteins candidates to diagnostic or vaccines and *T. gondii* biology.

1. Referencial teórico

Atualmente, os ovos de galinhas podem ser utilizados mais do que somente como fontes importantes de diversos nutrientes na dieta de animais e humanos, mas também como importantes reservatórios de anticorpos policlonais específicos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Desde 1893, quando Klemperer descreveu a existência de proteínas com atividades neutralizantes na gema de ovos de galinhas previamente imunizadas, vários artigos científicos foram publicados descrevendo as funções biológicas destes anticorpos, denominados imunoglobulinas Y (IgY, Y = *yolk*, gema em inglês) (ERHARD; SCHADE, 2001).

As galinhas são consideradas "pequenas fábricas" de produção de anticorpos IgY (XU et al., 2011). Existem linhagens de galinhas poedeiras com penas de cor vermelha ou branca, as quais produzem ovos da casca de vermelha e branca, respectivamente. Os ovos brancos são maiores e apresentam mais volume de gema que os ovos vermelhos, entretanto a quantidade de IgY total e específica/mL de gema é a mesma entre as linhagens (LI et al., 1998). Em geral, a gema dos ovos transporta quantidades elevadas de anticorpos IgY. Estima-se que a porcentagem de anticorpos específicos pode variar entre 1% e 10% do total encontrado na gema (PAULY et al., 2009). Durante um período de 12 meses de postura, uma galinha produz em média 300 ovos. Desse total de ovos é possível extrair aproximadamente 40g de IgY policlonal total. Para se obter a mesma quantidade de IgG, utilizando coelhos, são necessários quatro animais (HATTA et al., 1993; XU et al., 2011).

Funcionalmente, os anticorpos IgY são equivalentes à IgG de mamíferos. As galinhas também produzem anticorpos das classes IgM e IgA, ambas presentes na clara do ovo. Com o intuito de conferir proteção materna ao descendente, os anticorpos IgY circulantes no sangue da galinha, ao passarem pelo ovário, são transportados ativamente através do epitélio do folículo ovariano para a gema, em quantidades proporcionais às detectadas no soro da galinha, alcançando valores médios entre 20-25 mg/mL de gema pura (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). Diferentemente, os anticorpos IgM e IgA são detectados na clara do ovo, em concentrações médias de 0,15 e 0,7 mg/mL, respectivamente (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008).

O estudo inicial, conduzido por HÄSSL, ASPOCK e FLAMM (1987), utilizando IgY policlonal anti-*T. gondii*, priorizam a descrição de uma metodologia para obtenção

de anticorpos em larga escala. Os anticorpos IgY policlonais, quando aplicados em técnicas de imunodiagnóstico, em modelos mamíferos, evitam a ocorrência de resultados falso-positivos (LARSON et al. 1992; BEHN et al., 1996). Também é possível aplicar os anticorpos IgY em estudos de proteômica, pois devido à distância filogenética entre galinhas e mamíferos podem ocorrer diferenças nos perfis de reconhecimento de alvos antigênicos entre as duas espécies, mesmo que os animais sejam submetidos ao mesmo protocolo de imunização (SCHADE et al., 2005). Estudos utilizando anticorpos IgY em procedimentos de imunização passiva, têm demonstrado resultados promissores (NOLAN-KOVACS; MINE, 2012).

1.1. Aspectos gerais do sistema imunológico das galinhas

O sistema imunológico das galinhas apresenta semelhanças com o sistema imunológico dos mamíferos. As galinhas possuem populações de linfócitos T e B, os quais participam na resposta imunológica adaptativa (TIZARD, 2009). Os linfócitos B e seus complementares, os plasmócitos, são as células secretoras especializadas na produção de anticorpos (DIAS da SILVA; TAMBOURGI, 2010), e apresentam-se associadas aos órgãos linfóides dos animais (OLÁH; VERVELDE, 2008).

1.1.1. Estrutura do sistema imunológico

1.1.1.1. Timo

O timo é um órgão linfóide primário, cuja função é a seleção dos linfócitos T. Topograficamente o timo das aves se localiza na região cervical, paralelo ao nervo vago e à veia jugular, composto por sete a oito lóbulos separados, que se estendem desde a terceira vértebra cervical até a entrada da caixa torácica. Histologicamente, os lóbulos tímicos são formados por três regiões, o córtex que é densamente povoado por timócitos; a região cortico-medular que contém células dendríticas, as quais expressam moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II e tem função na seleção negativa dos linfócitos T; e a medula, na qual se encontram os corpúsculos de Hassall cuja função acredita-se estar associada à produção de proteínas

bioativas, as quais ativam as células dendríticas mielóides para a indução de células T regulatórias. O tecido tímico da galinha sofre involução fisiológica a partir do terceiro mês de vida da ave (ÓLAH; VELVERDE, 2008).

1.1.1.2. Bursa de Fabricius

Anatomicamente, a bursa de Fabricius das galinhas tem o formato arredondado e fica posicionada dorsalmente à cloaca. Semelhante ao timo, este também é um órgão linfóide primário que atinge seu tamanho máximo em torno de oito a 10 semanas de idade, e que passa por involução fisiológica a partir do terceiro mês de vida (ÓLAH; VELVERDE, 2008; TIZARD, 2009). Internamente, a superfície da bursa de Fabricius é composta por 15 a 20 dobras longitudinais e pequenos ductos que mantêm a comunicação entre a luz do órgão e reto da ave. Histologicamente, estas dobras luminais são compostas por 8.000 a 12.000 folículos, os quais são formados por córtex, medula e borda cortico-medular e epitélio associado ao epitélio (SCOTT, 2004). Aproximadamente 98% dos linfócitos da bursa são células B, as quais proliferam no córtex e na medula. Após 8-10 semanas de idade o número de linfócitos decresce no interior da medula, demonstrando a ocorrência da involução do tecido linfóide (ÓLAH; VELVERDE, 2008).

1.1.1.3. Baço

O baço das galinhas é um órgão linfóide arredondado ou oval, posicionado à esquerda do pró-ventrículo. O desenvolvimento esplênico ocorre após o nascimento, seguindo a exposição aos antígenos. O baço é um órgão linfóide secundário, que ocupa papel importante no sistema imunológico das galinhas, visto que não há linfonodos nas aves. Histologicamente, a estrutura básica esplênica da galinha apresenta polpa vermelha e polpa branca, constituídas predominantemente por eritrócitos e linfócitos, respectivamente. O baço, outro órgão linfóide dos vertebrados, fornece um microambiente para a interação das células linfóides com as não-linfóides (por exemplo, macrófagos e células dendríticas), também faz a concentração de antígenos que circulam pelo sangue (ÓLAH; VELVERDE, 2008).

A *Bursa de Fabricius*, órgão linfóide exclusivo das aves, desempenha funções essenciais no desenvolvimento dos linfócitos B, os seus homólogos nos mamíferos são a

medula óssea e as placas de Peyer (TIZARD, 2009). A participação esplênica na resposta imune humoral tem maior importância em galinhas do que em mamíferos, pois os galiformes carecem de tecido linfóide organizado em linfonodos e possuem uma pobre rede de vasos linfáticos. Nesse contexto, para compensar a ausência de linfonodos, as galinhas desenvolveram uma extensa rede de tecido linfóide associado às mucosas, por exemplo, Glândula de *Harderian* na mucosa ocular, tonsilas esofágicas e divertículo de *Meckel* no intestino delgado (OLÁH; VELVERDE, 2008).

1.1.2. Classes e estrutura das Imunoglobulinas das galinhas

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas com função de anticorpo, produzidas em resposta à exposição aos antígenos, as quais são detectadas no sangue, linfa e tecidos vascularizados de todos os gnatostomados e são os mediadores da imunidade humoral (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010), além disso são heterodímeros e apresentam em sua estrutura básica duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2007). Nos mamíferos são descritas cinco classes de anticorpos, nomeadas de acordo com sua cadeia pesada (CP), são elas as imunoglobulinas M (IgM)/CP mi (μ); IgG/CP gama (γ); IgA/CP alfa (α); IgE/ CP epsilon (ϵ) e IgD/CP delta (δ), enquanto nas galinhas existem três classes IgM/CP μ ; IgA/CP α e Imunoglobulinas Y (IgY)/CP upsilon (ν) (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). IgM e IgA dos galináceos são estruturalmente e funcionalmente homologas aos seus pares mamíferos (ROSE, 1974). Os anticorpos IgM das galinhas circulam no sangue em uma mistura de heterodímeros pentaméricos ou tetraméricos. Estas glicoproteínas das galinhas, semelhante às encontradas nos mamíferos, predominam na resposta imune de primeiro contato com o antígeno. A IgA das galinhas é encontrada nas secreções corporais, principalmente na bile, na forma de trímeros ou tetrâmeros (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008).

Os anticorpos IgY, apesar de sua semelhança funcional com a IgG, apresentam diferenças na estrutura e características físico-químicas. IgY são monômeros de peso molecular (PM) aproximado de 180 kilodaltons (kDa), um pouco maiores que IgG as quais apresentam PM em torno de 150 kDa. A cadeia pesada upsilon (CP ν) possui um domínio variável e quatro domínios constantes (DC ν 1; DC ν 2; DC ν 3 e DC ν 4), enquanto a cadeia pesada gama (CP γ) é composta por três domínios

constantes ($DC\gamma 1$; $DC\gamma 2$ e $DC\gamma 3$) (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). A estrutura do fragmento ligante de antígeno (Fab) da IgY, semelhante ao IgG, possui uma cadeia leve completa com seu domínio variável e o domínio pesado, associados aos domínios variável e o $DC\upsilon 1$ da cadeia pesada, enquanto o fragmento cristalizável (Fc) da IgY é composto pelos três domínios constantes restantes na cadeia pesada ($DCP\upsilon 2$, $DCP\upsilon 3$ e $DCP\upsilon 4$) (SCHADE, 2005). A análise das sequências gênicas dos domínios constantes de IgG e IgY, demonstrou que $DC\gamma 2$ e $DC\gamma 3$ são intimamente relacionados com $DC\upsilon 3$ e $DC\upsilon 4$, respectivamente, e que provavelmente o $DC\upsilon 2$, durante a evolução das espécies, tenha sido condensado e formado a região flexível da molécula de IgG, denominada de dobradiça (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Outra diferença está no ponto isoelétrico dos anticorpos IgY, o qual se situa na faixa de pH entre 5,7 a 7,6, sendo menor que o apresentado pelos anticorpos IgG que é de 6,1 a 8,5 (HATTA et al, 1993; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Análises comparativas sobre a estabilidade de IgY demonstraram que os anticorpos de galinha são mais sensíveis à exposição a extremos de pH (pH = 3,0), sofrendo perdas na reatividade, por outro lado quando submetidos a condições de pasteurização (3,5 minutos, 60°C) não ocorreram reduções significativas na reatividade dos anticorpos (SHIMIZU et al., 1992; HATTA et al., 1993).

1.1.3. Geração do repertório de anticorpos IgY

A habilidade das imunoglobulinas de um animal para se ligarem especificamente a um grande número de antígenos é denominado diversidade (LITMAN et al, 1993). O conjunto de imunoglobulinas com diferentes especificidades é chamado de repertório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010). Nos mamíferos a diversidade das imunoglobulinas é gerada principalmente por meio de seleção aleatória dos genes que codificam os domínios variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada, em um processo denominado rearranjo gênico e, adicionalmente, também pela inserção de nucleotídeos no segmento variável rearranjado, caracterizando a hipermutação somática (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008; RATCLIFFE, 2008; TIZARD, 2009). As galinhas possuem menos genes do que os mamíferos para codificar os domínios variáveis dos fragmentos Fab dos anticorpos IgY, nesse contexto, estas aves desenvolveram seu repertório de reconhecimento de antígenos através de rearranjo gênico, seguido pela

conversão gênica, na qual acontece a permutação de blocos de nucleotídeos, a partir de pseudogenes (McCORMACK; TJOELKER; THOMPSON, 1991; RATCLIFFE, 2008).

1.1.4. Transferência de anticorpos IgY maternos para a gema do ovo

A transferência de anticorpos maternos ajuda na proteção do descendente até que a resposta imune adaptativa se torne completamente eficaz e nas galinhas esse fenômeno ocorre pela passagem de anticorpos maternos séricos para o ovo (DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). A resposta imunológica primária nas galinhas é caracterizada pelo predomínio de anticorpos IgM, e a secundária por IgY (SHARMA, 1999). Nesse contexto os anticorpos IgY, que aparecem em maior quantidade no sangue, são transferidos para o folículo ovariano em formação, por meio de receptores específicos, em concentrações proporcionais às circulantes, enquanto IgM e IgA são secretadas na clara do ovo (KOWALCZYK et al., 1985; WEST; HERR; BJORKMMAN, 2004; SCHADE, 2005).

O ovário direito das galinhas regride durante a embriogênese, dessa forma a geração de folículos ovarianos acontece apenas no ovário esquerdo, sendo que um ovócito maduro pode atingir ao final de seu desenvolvimento, em um período estimado de sete dias, um diâmetro aproximado de 30 mm, que é o resultado do acúmulo de gema (SCHNEIDER et al., 1998). Em virtude do tempo requerido para a ovogênese os anticorpos IgY específicos são detectados na gema com um atraso médio de cinco a seis dias, em relação à sua detecção sérica (SCHADE, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). A quantidade de IgY/mL de gema independe do tamanho do ovo, em média a concentração total de anticorpos pode variar de 100 a 200mg/ovo, entretanto podem ocorrer variações individuais em função da genética da galinha, além disso a transferência de anticorpos IgY maternos obedece um ritmo biológico de aproximadamente sete dias (SCHADE, 2005).

1.2. Produção de anticorpos IgY policlonais específicos

Os anticorpos IgY apresentam algumas vantagens sobre os anticorpos IgG, entre elas, não interagem com receptores para fragmento Fc e nem com proteínas do sistema Complemento de mamíferos (LARSSON et al., 1992), não sofrem interferência do fator reumatóide, e não se ligam à proteína A de *Staphylococcus aureus* e nem à proteína G de *Streptococcus* spp., dessa forma a utilização de anticorpos IgY pode evitar a ocorrência dos resultados falso-positivos durante a execução de imunoenaios em sistemas utilizando anticorpos de mamíferos (ERHARD; SCHADE, 2001; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A metodologia para purificação de anticorpos IgY policlonais da gema do ovo de galinhas imunizadas, apresenta vantagens interessantes: (i) devido à grande massa de imunoglobulinas obtida, é possível reduzir o número de animais utilizados; (ii) elimina-se a necessidade de sangria da galinha, evitando o desconforto neste procedimento; (iii) os anticorpos IgY podem ser empregados em diversos imunoenaios (DIAS da SILVA; TAMBOURGI, 2010). O rendimento e a pureza dos IgY são influenciados pela remoção adequada dos lipídeos da gema (HATTA; KIM; YAMAMOTO, 1990; STAAK et al., 2001) que pode ser feita por meio da diluição da gema em água deionizada, com pH ajustado para 5,0 a 5,2 (AKITA; NAKAI, 1993), que além de remover os contaminantes e conservar as funções dos anticorpos extraídos, demonstra ser um protocolo de baixo custo e que não exige equipamentos sofisticados para sua condução. Depois de extraída a fração hidrossolúvel da gema, a etapa seguinte consiste na purificação das IgY, o que normalmente é feito através de métodos que são divididos em dois grupos principais: (i) precipitação dos anticorpos, por exemplo, com sulfato de sódio; ou (ii) por cromatografia, por exemplo, através de gel filtração por exclusão de peso molecular, sendo que a pureza dos anticorpos pode ser incrementada pela combinação entre os dois métodos (SCHADE, 2005). A delipidização e purificação a partir da fração solúvel em água são etapas necessárias quando se pretende utilizar os anticorpos IgY em técnicas imunológicas (HASSL; ASPÖCK; FLAMM, 1987; PARMA et al., 2011; CAI et al., 2012).

1.2.1. Características dos antígenos e sua aplicação

A imunização de galinhas utilizando antígenos proteicos, normalmente resulta em boa produção de anticorpos (SCHWARZKOPF et al., 2001; ALESSANDRO et al., 2009; NERI et al., 2011), proteínas recombinantes também são utilizadas em protocolos de indução de IgY específica (MULVEY et al., 2011). Os haptenos (DECKERS et al., 2009), desde que acoplados a moléculas proteicas carreadoras, são empregados na imunização de galinhas, assim como as preparações contendo DNA são utilizadas como imunógenos (NIKBAKHT BRUJENI; JALALI; KOOHI, 2011). Outras possibilidades para a imunização de galinhas são a incorporação dos antígenos em lipossomos (YAGUSHI et al., 2009) e também a vacinação com plasmídeos construídos com um ou mais genes do imunógeno específico (DING et al., 2011).

A hiperimunização de galinhas é a maneira adequada para induzir elevados títulos de anticorpos IgY policlonais séricos, as quais são transportados para o folículo ovariano durante a ovogenese (SCHADE, 2005). Semelhantemente à resposta humoral dos mamíferos, os linfócitos B das galinhas, após o primeiro contato com os antígenos, iniciam com a síntese de anticorpos IgM, após a troca de classes surgem as IgY, que predominam na resposta imune secundária (PEI; COLLISSON, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008).

SCHADE et al. (1996) reportaram os princípios para a imunização experimental de galinhas, discutidos durante o 21º *workshop* da *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM). A imunização de galinhas pode ser feita pela via intramuscular (I.M.) no músculo peitoral (PARMA et al., 2011) ou subcutânea (S.C.) (ZHANG et al., 2011) na região dorsal do pescoço (QU et al., 2011), além de vias mucosas (YAGUCHI et al., 2009). Considerando o volume total do inóculo, o qual influencia a reação tecidual pós-aplicação, é preferível trabalhar com volumes entre 0,5 e 1,0 mL (ZHANG et al., 2011^b), divididos em pelo menos dois locais distintos de aplicação (WEN et al., 2012). A concentração de antígenos, por inoculação, possui uma ampla faixa de valores, variando de 10µg a 1 mg (ZHANG et al., 2011; PARMA et al., 2011; QU et al., 2011). O número de aplicações depende da imunogenicidade e da concentração do antígeno, também do adjuvante utilizado, normalmente é feita a imunização primária seguido de no mínimo um *booster*, caso os títulos de anticorpos específicos apresentem queda significativa um novo reforço de imunização deverá ser executado (SCHADE et al., 1996; WEN et al., 2012). O intervalo das imunizações pode

variar entre duas (PARMA et al., 2011) e seis semanas (QU et al., 2011), e as galinhas imunizadas podem ser utilizadas por longos períodos (SCHADE et al., 1996; PAULY et al., 2009). Após a coleta dos ovos, as gemas separadas da clara, podem ser congeladas para posterior extração de anticorpos (PARMA et al., 2011).

Normalmente, as imunizações com adjuvante de Freund, quando realizadas em galinhas *naive*, induzem forte resposta primária, sendo que a memória imunológica pode ser reestimulada por meio da aplicação de reforços de imunização e também elevado índice de aversez, sendo que na imunização primária emprega-se o adjuvante completo (ACF) que é composto por uma solução oleosa de parafina acrescida de micobactérias inativadas, enquanto na secundária utiliza-se o incompleto (AIF) (SHARMA, 1999; SCHWARZKOPF et al., 2001; QU et al., 2011; PARMA et al., 2011; WEN et al., 2012). O uso de ACF pode produzir efeitos adversos inflamatórios no local da aplicação, entretanto as galinhas são mais resistentes a estes efeitos do que os mamíferos (SCHADE et al., 2005).

1.2.2. Purificação e caracterização dos anticorpos

Todo processo de purificação de anticorpos IgY se inicia com a separação da gema e da clara do ovo (AMARAL et al., 2002), em seguida faz-se a remoção da fração lipídica (delipidização), e se obtém uma fração solúvel em água rica em anticorpos IgY totais (STAAK et al., 2001, AMARAL et al., 2002; PARMA et al., 2011). A escolha do método mais adequado para a extração de anticorpos IgY depende da massa de anticorpos que se pretende purificar; pelo custo do processo e também pela facilidade de execução do processo (SCHADE, et al., 2005). A precipitação dos anticorpos IgY pode ser realizada com sulfato de amônio ou de sódio, ou através de gel filtração de exclusão de peso molecular com (HASSL; ASPÖCK; FLAMM, 1987; AKITA; NAKAI, 1993; MA; ZHANG, 2010; HERNÁNDEZ-CAMPOS et al., 2010; PARMA et al., 2011; SUI; CAO; LIN, 2011; WEN et al., 2012). A pureza dos anticorpos e sua caracterização podem ser feitas através de eletroforese em gel de poliacrilamida e técnicas imunoenzimáticas, respectivamente (MA; ZAHNG, 2010; de PAULA et al., 2011).

1.2.3. Aplicações dos anticorpos policlonais

Os anticorpos IgY policlonais específicos podem ser utilizados como anticorpos primários ou secundários em vários protocolos (BEHN et al., 2001; TINI et al., 2002).; acoplados a esferas imunomagnéticas para detecção de antígenos solúveis (LEI et al., 2012); para detecção de alvos antigênicos em células em ensaios de citometria de fluxo ou reconhecimento de antígenos em tecidos fixados (DIAZ et al., 2009; LEU et al., 2010); reconhecimento de antígenos imobilizados em membranas de nitrocelulose por meio de *Western blot* (BRUJENI; GHARIBI, 2012); em ensaios reconhecimento de antígenos tumorais (PAN et al, 2010); em estudos de proteínas antigênicas em alérgenos (CHASSAIGNE et al., 2009) e agentes microbianos (ZHEN et al., 2008; CHALGHOUNI et al., 2008; SHIN et al., 2009). Estudos mostram o efeito protetor da administração de IgY frente infecções virais do trato gastrintestinal (HORIE et al, 2004).

Anticorpos IgY policlonais específicos já foram aplicados em estudos de antigenicidade envolvendo parasitos do Filo Apicomplexa, entre eles *Eimeria* spp (CONSTANTINOIU et al., 2008); *Plasmodium falciparum* (QU et al., 2011) e *Cryptosporidium parvum* (KOBAYASHI et al., 2004). *T. gondii* é um parasito intracelular, também do Filo Apicomplexa, sendo os taquizoítos as principais formas evolutivas causadoras de patologias nos hospedeiros, e por isso os estudos que ajudem a esclarecer o papel dos antígenos solúveis de taquizoítos (STAg) na patogenia da toxoplasmose são relevantes (MA et al., 2009).

1.3. *Toxoplasma gondii*

1.3.1. Histórico e diversidade

T. gondii é um protozoário parasita intracelular que foi primeiro descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux enquanto trabalhavam no Norte de África e também por Splendore no Brasil, a designação da espécie foi originada a partir do nome do roedor Norte Africano chamado *Ctenodactylus gondi*, a partir do qual o parasito foi isolado e

nome do gênero é derivado da palavra Grega *toxon*, em português arco, fazendo referência à morfologia levemente curva do organismo (BLACK; BOOTHROYD, 2000). *T. gondii* é um parasito ubíquo cuja eficiência no parasitismo se deve à sua grande variedade de hospedeiros, altas taxas de infecção e co-existência geralmente benigna com os animais parasitados (CARRUTHERS, 2002), este microrganismo parasita pertence ao Filo Apicomplexa, do qual também fazem parte *Plasmodium* spp. (THAM; HEALER; COWMAN, 2012), *Eimeria* spp. (McDONALD; HIRLEY, 2009) e *Cryptosporidium* spp (KARANIS; ALDEYARBI, 2011),

Estudos para avaliar a diversidade genética de *T. gondii* concluíram que a maioria das cepas avaliadas na América do Norte e na Europa, compreende três linhagens clonais distintas (tipo I: RH e GT-1; II: ME-49 e III: CEP e VEG), as quais se distinguem entre si por pequenas diferenças em seus genes, de forma adicional novas linhagens tem sido descritas na América do Sul e África (SAEIJ; BOYLE; BOOTHROYD, 2005). Estudos realizados no Brasil apontam para a existência de quatro genótipos mais prevalentes, nomeados tipo BRI, BRII, BRIII e BRIV com 16, 12, nove e sete isolados do parasito, respectivamente. Quando a virulência dos genótipos foi avaliada em camundongos verificou-se que BRI é altamente virulenta, BRIII foi avirulenta e BRII e BRIV apresentaram-se moderadamente patogênicas (PENA et al., 2008). Em pesquisa feita com 151 isolados obtidos de galinhas brasileiras, constatou-se que a linhagem clonal do tipo I é rara e a tipo II é ausente, contrastando com o perfil de alta prevalência de ambas, observado na América do Norte e Europa, complementarmente a detecção dos tipos BRI, BRII, BRIII, BRIV e de cepas do genótipo #21 a partir de isolados de vários estados, demonstraram a ampla dispersão destas linhagens entre as galinhas, também a alta proporção de genótipos com isolado único denota elevada diversidade entre as cepas de *T. gondii* que foram estudadas (DUBEY et al., 2008).

1.3.2. Biologia de *T. gondii*

A infecção com *T. gondii* é uma das mais comuns infecções parasitárias nos animais de sangue quente, incluindo o homem, estima-se que a terça parte da população humana mundial seja infectada com o protozoário (DUBEY, 2004).

1.3.2.1. Estágios infectantes

T. gondii apresenta três estágios infectantes: os taquizoítos, os bradizoítos detectados em cistos teciduais e os esporozoítos nos oocistos (DUBEY; LINDSAY, SPEER, 1998), todos eles são haplóides e se dividem assexuadamente (SIBLEY et al., 2009).

1.3.2.1.1. Taquizoítos

O termo taquizoítos vem do Grego *tachos* que quer dizer rápido, e descreve o estágio que multiplica rapidamente em qualquer célula nucleada do hospedeiro. Agregados de numerosos taquizoítos são chamados de clones, colônias terminais ou grupos (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Normalmente essas formas infectantes de *T. gondii* apresentam-se no formato de células curvadas, de aproximadamente dois µm de largura por seis µm de comprimento, com a extremidade anterior afilada e a posterior dilatada. Ultraestruturalmente, os taquizoítos consistem de várias organelas (Figura 1) incluindo, anéis apicais, anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, microporos, mitocôndrias, membrana externa (película), microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático liso e rugoso, complexo de Golgi, ribossomos, microporos, núcleo, grânulos densos, grânulos de amilopectina e apicoplasto (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998; BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Estas formas infectantes de *T. gondii* replicam no citoplasmas da célula hospedeira, completando uma geração a cada seis ou oito horas (*in vitro*), após alguns ciclos de replicação eles deixam o citoplasma, para em seguida invadirem novas células da vizinhança (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Os taquizoítos se multiplicam assexuadamente por endodiogenia, uma forma especializada de reprodução em que duas progênes são formadas no interior da célula-mãe consumindo-a (MOURA; AMENDOEIRAS; BARBOSA, 2009). Durante a multiplicação de taquizoítos, grupos de parasitos podem formar rosetas devido ao sincronismo da divisão (SIBLEY et al., 2009).

Os taquizoítos de *T. gondii* apresentam na superfície externa de sua membrana citoplasmática, famílias de proteínas ligadas à glicosilfosfatidilinositol (GPI). Esses

componentes são considerados como fatores de virulência, pois participam no processo de adesão e invasão da célula hospedeira, modulação da resposta imune do hospedeiro e sobrevivência do parasito nos tecidos infectados (JUN; LEE; GRIG, 2004). Entre elas existem a *Surface Antigen 1* e 2 (SAG1 e SAG2) com peso aparente de 30 kDa e 22 kDa, respectivamente (BOOTHROYD, 1998). SAG1 é o protótipo das SAG1-related superfamily (SRS) um grupo de proteínas denominadas P30, as quais apresentam pesos moleculares entre 24 kDa e 32 kDa (KASPER, 1989; HE et al., 2002). No grupo P30 ainda se encontram as proteínas SAG3 (P43; 41,8kDa), SRS1 (44,2 kDa) e SRS2 (39,5 kDa) (BOOTHROYD et al., 1998). Também é descrita a família SAG2, cujo componente mais relevante é SAG2A ou também conhecida como p22 (JUNG; LEE; GRIGG, 2004).

Os antígenos p30 e p22 são altamente imunogênicos, sendo consideradas imunodominantes durante a infecção aguda por *T. gondii* e para os quais o sistema imune do hospedeiro é primariamente direcionado, no intuito de neutralizar a virulência do parasito (BÉLA et al., 2008; JUNG; LEE; GRUGG, 2004; HE et al., 2002; MINEO et al., 1993). Os alvos antigênicos de *T. gondii*, p30 e p22, são reconhecidos por anticorpos policlonais séricos anti-*T.gondii*, obtidos de humanos e camundongos, e são normalmente reconhecidas em ensaios de *Western blot*, principalmente as p30 (KASPER; CURRIE; BRADLEY, 1985; KASPER, 1989; BÉLA et al., 2008; SANTANA et al., 2012).

O uso de taquizoítos de *T. gondii*, *in vitro* ou *in vivo*, é essencial para diferentes procedimentos tais como modelos experimentais, estudo genéticos e produção de antígenos solúveis (STAg) (HASSL; ASPÖCK; FLAMM, 1987; da COSTA-SILVA et al, 2012). Os taquizoítos intracelulares, sob estímulos da resposta imunológica do hospedeiro, podem se converter em formas quiescentes denominadas bradizoítos (SULLIVAN; JEFFERS, 2012).

1.3.2.1.2. Bradizoítos

O termo bradizoíto, do Grego *brady*, em Português "lento", descreve os organismos que se multiplicam lentamente, por endodiogenia, no interior de cistos teciduais intracelulares e apresentam dimensões médias de 7 µm de comprimento por 1,5 µm de largura (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Ultraestruturalmente, as formas de

bradizoítos são muito semelhantes aos taquizoítos (Figura 1), porém diferem nos seguintes aspectos: o núcleo do bradizoíto tem localização posterior, suas micronemas são em maior número, os grânulos densos aparecem em menor quantidade, possui grânulos de amilopectina mais numerosos e maiores. Biologicamente a característica mais marcante dos bradizoítos é a cistogênese, a qual marca a fase crônica da toxoplasmose (BLACK; BOOTHROYD, 2000; SULLIVAN; JEFFERS, 2012). Embora os cistos teciduais possam se desenvolver em qualquer órgão do hospedeiro, eles são mais prevalentes nos tecidos neuronal e muscular, incluindo o músculo cardíaco e o esquelético (HILL; DUBEY, 2002). A parede cística é elástica, fina ($<0,5 \mu\text{m}$ de espessura), sendo composta por materiais da célula hospedeira e do parasito (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Os cistos teciduais apresentam variações em suas dimensões, por exemplo, os cistos cerebrais são esféricos, podendo alcançar em torno de $70 \mu\text{m}$ de diâmetro, e os musculares são alongados e podem atingir até $100 \mu\text{m}$ de diâmetro (DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998). Nesse contexto, a descoberta de reagentes que possam reconhecer antígenos císticos específicos ou de bradizoítos possibilitam conhecer os mecanismos envolvidos na sua formação e na conversão de estágios do parasito, respectivamente (ZHANG et al., 2010).

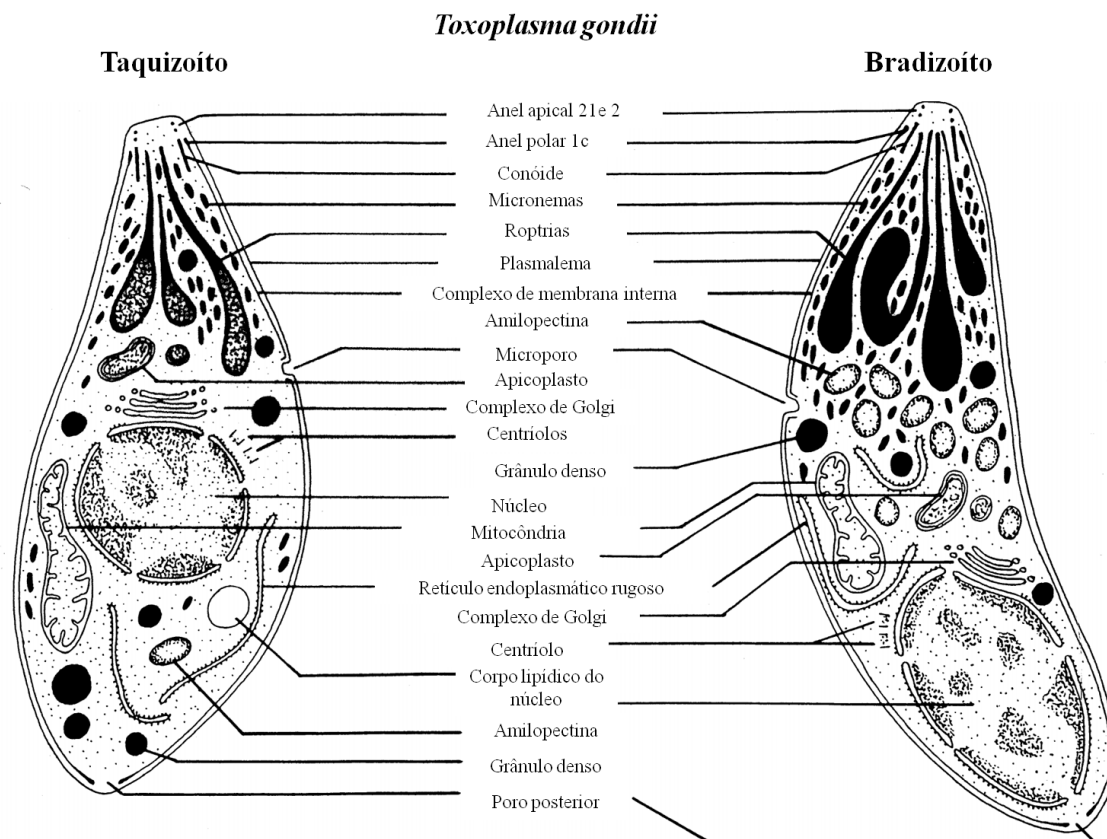


Figura 1: Representação esquemática comparando a ultraestrutura de dois estágios infectantes de *T. gondii*, taquizoíto (esquerda) e bradizoíto (direita). Fonte: DUBEY; LINDSAY; SPEER, 1998.

1.3.2.1.3. Esporozoítos

Os esporozoítos são localizados dentro de oocistos do parasito, os quais quando são eliminados nas fezes frescas do hospedeiro definitivo não estão esporulados, após um a cinco dias no ambiente ocorre a esporulação e os oocistos se tornam infectantes, cada um contém dois esporocistos, sendo que cada esporocisto aloja quatro esporozoítos com dimensões em torno de dois μm de largura por oito μm de comprimento (HILL; CHIRUKANDOTH; DUBEY, 2005).

1.3.2.1.4. Hospedeiros, ciclo de vida e invasão celular

Os felinos são os únicos hospedeiros definitivos de *T. gondii* e os animais de sangue quente, incluindo humanos e aves, são os hospedeiros intermediários (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000; DUBEY; SCHADE; ORTEGA-MORA, 2007; GONDIM et al., 2009). Diferentemente de outros coccídeos nos quais a via de transmissão é exclusivamente fecal-oral, *T. gondii* também pode ser transmitido por carnivorismo ou pela via transplacentária (Figura 2) (HILL; DUBEY, 2002; DUBEY; JONES, 2008). A infecção fetal ou congênita, por meio de taquizoítos, pode acontecer quando a primoinfecção materna ocorre durante a gestação (TREES; WILLIAMS, 2005). Em humanos também pode ocorrer transmissão de taquizoítos do parasito por meio de transfusões de sangue ou transplante de órgãos a partir de pacientes infectados (DUBEY, 2004; DUBEY; JONES, 2008). O ciclo sexuado de *T. gondii* se desenvolve no intestino delgado do gato culminando com grande liberação de oocistos não esporulados nas fezes do animal, os quais contaminam a água e o alimento e sofrem esporulação no ambiente (BUXTON et al., 2007; DUBEY, 2006). Os oocistos esporulados são resistentes à digestão pelo suco gástrico e conseguem alcançar a luz intestinal onde liberam os esporozoítos que penetram o epitélio da mucosa intestinal e fazem interconversão para taquizoítos (DUBEY, 2004), em seguida as formas de multiplicação rápida invadem as células nucleadas do hospedeiro e estabelecem o parasitismo intracelular (CARRUTHERS, 2002). A liberação sequencial dos conteúdos de micronemas, roptrias e grânulos densos, é necessária para que *T. gondii* obtenha êxito na penetração da célula hospedeira (BLADER; SAEIJ, 2009). O processo de invasão celular envolve a adesão de *T. gondii* à célula hospedeira por meio de moléculas de superfície do parasito, ingresso no citoplasma e a formação do vacúolo parasitóforo, o qual através de sua membrana seletiva protege o parasito em seu interior e permite a passagem dos nutrientes necessários à reprodução dos taquizoítos (HUYNH; HARPER; CARRUTHERS, 2006; VIRREIRA WINTER et al., 2011).

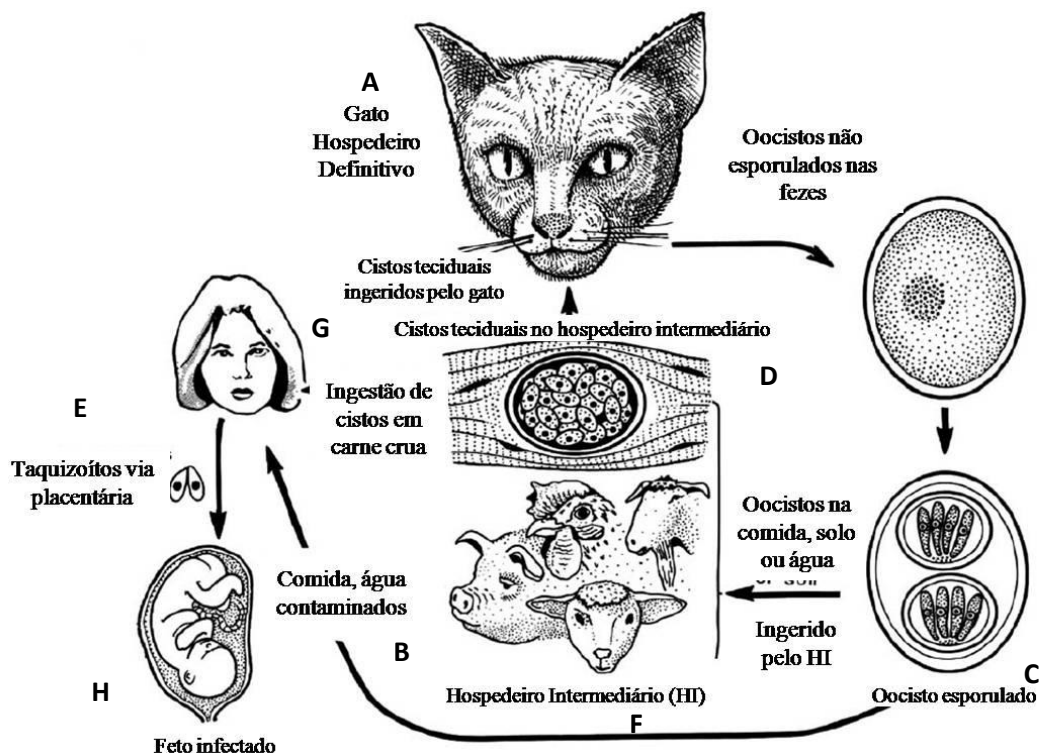


Figura 2: Ciclo de vida de *T. gondii* onde são apresentados os hospedeiros do parasito: A - definitivo e B – intermediários; as formas infectantes: C - oocistos esporulados; D - cistos teciduais; e E – taquizoítos; e as vias de infecção: F - fecal-oral; G – carnivorismo; e H - transplacentária (Fonte: DUBEY, 2004).

1.3.2.1.5. Interconversão de estágio de taquizoíto para bradizoíto

A produção da citocina Interferon Gama (IFN- γ) produz um grande impacto sobre a replicação de *T. gondii* durante a fase aguda da infecção, pois há uma redução da disponibilidade do aminoácido triptofano, o qual é necessário no desenvolvimento do taquizoíto, dessa forma há a redução na replicação, seguida pela interconversão para o estágio de bradizoíto e formação do cisto tecidual. Outro fator responsável por essa interconversão é o aumento na produção de óxido nítrico, que funciona como um agressor contra o parasito (CARRUTHERS, 2002; FERREIRA DA SILVA et al., 2008; SULLIVAN JR; JEFFERS, 2012; HUANG et al., 2012). O surgimento dos cistos teciduais marca o início da fase crônica da toxoplasmose que se caracteriza por reações

inflamatórias discretas ou ausentes e detecção de anticorpos específicos contra *T. gondii* por longos períodos de vida do hospedeiro (CARRUTHERS, 2002).

1.3.3. Epidemiologia da toxoplasmose

Surtos de toxoplasmose humana foram atribuídos ao consumo de água contaminada com fezes dos hospedeiros definitivos, como o ocorrido na região de Campos dos Goitacazes no estado do Rio de Janeiro, Brasil, onde 84% da população de crianças de baixa renda foram soropositivas para *T. gondii* (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003). No contexto da toxoplasmose congênita, há o risco da gestante se infectar com esporozoítos e bradizoítos, sendo que a severidade da doença fetal dependerá do momento gestacional em que ocorreu a infecção. No primeiro trimestre há maior ocorrência de morte fetal e no terço final acontecem nascimentos de indivíduos infectados (RORMAN et al., 2006), que no futuro poderão apresentar déficits neurológicos e/ou visuais (HILL; DUBEY, 2002; DUBEY, 2004; PFAFF et al., 2007). Em situações pontuais, embora a resposta imunológica de memória da gestante seja protetora contra a reinfecção por *T. gondii*, podem ocorrer infecções com cepas do parasito, de elevada virulência e ainda ocasionarem a transmissão congênita (TREES; WILLIAMS, 2005; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

Em animais domésticos, geralmente as infecções com *T. gondii* ocorrem no pela via oral no período pós-natal, através de carnivorismo ou pela ingestão de oocistos esporulados, resultando em infecções oligossintomáticas. Entretanto, em semelhança à toxoplasmose humana, a infecção primária em pequenos ruminantes e suínos gestantes poderá acarretar a transmissão congênita, com a produção de abortos, mumificação fetal ou reabsorção embrionária (BUXTON et al., 2007). Em bovinos as perdas reprodutivas causadas por infecções parasitárias são associadas ao protozoário *Neospora caninum*, também do filo Apicomplexa e relacionado a *T. gondii* (INNES; MATTSSON, 2006; INNES, 2007).

1.3.4. Estudos in vitro utilizando anticorpos específicos em modelos com T. gondii

Anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii*, são produzidos após repetidas etapas de imunização dos animais, normalmente utilizando ACF e AIF. A obtenção de anticorpos policlonais de mamíferos implica em dois momentos associados à dor: (i) a imunização e (ii) a sangria para a obtenção do antisoro, além disso pode ocorrer a morte do animal (SCHADE, 2005; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Os mecanismos de virulência utilizados por *T. gondii* podem ser avaliados pela incubação do parasito com anticorpos específicos (WINTER et al., 2011), os quais também são utilizados em estudos da modulação da resposta imune do hospedeiro pelo parasito (DELLACASA-LINDBERG et al., 2011). Os anticorpos IgG anti-*T. gondii*, empregados em proteômica, possibilitam identificar alvos antigênicos candidatos para utilização em vacinas ou que sejam conservados entre parasitos relacionados (ZHANG et al., 2011; CHE et al., 2010). As investigações sobre a biologia do parasito, aplicando imunoglobulinas, possibilitam compreender o comportamento de *T. gondii* durante os períodos de invasão e de parasitismo celular; determinar a eficácia de mediadas terapêuticas; e desvendar a interação do parasito com o sistema imunológico do hospedeiro (RISCO-CASTILLO; FERNÁNDEZ-GÁRCIA; ORTEGA-MORA, 2004; HEMPHIL; VONLAUFEN; NAGULESWARAN, 2006; AGUADO-MARTINEZ et al., 2009; ANGELONI et al., 2009; UNNO et al., 2009; FRANCO et al., 2010).

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a aplicabilidade de anticorpos IgY policlonais anti-STAg em imunoenaios *in vitro* com *Toxoplasma gondii*.

2.2. Específicos

- Induzir a produção de anticorpos IgY policlonais em galinhas de postura, imunizadas com antígeno solúvel de taquizoítos (STAg).
- Purificar anticorpos IgY policlonais a partir da gema dos ovos de galinhas imunizadas com STAg e avaliar a qualidade dos procedimentos de purificação.
- Caracterizar os anticorpos IgY anti-STAg quanto à especificidade, cinética de produção e maturação de avidéz.
- Aplicar os anticorpos IgY policlonais anti-STAg, purificados da gema dos ovos, na padronização de três sistemas distintos de imunoensaio utilizando o modelo de *T. gondii*, a saber: (i) detectar formas do parasito em cultivos celulares e cortes histológicos; (ii) reconhecer componentes proteicos antigênicos dos antígenos solúveis de taquizoítos bidimensionalmente separados e (iii) avaliar o efeito bloqueador destes anticorpos policlonais frente o desafio de invasão celular.

3. Capítulo I

Produção e purificação de anticorpos IgY policlonais

3.1. Material e métodos

3.1.1. Animais

Para a produção dos anticorpos IgY policlonais, utilizaram-se dez galinhas de postura, da linhagem *Isa Brown*, com 25 semanas de idade, gentilmente doadas pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Uberlândia, Triângulo Mineiro, Campus Uberlândia (IFET-TM). As aves foram alojadas individualmente, em gaiolas de arame suspensas e receberam água e ração *ad libitum*.

Para a produção de anticorpos IgG policlonais, foram utilizados vinte camundongos C57BL/6, machos e com quatro semanas de idade. Os camundongos foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Estes animais foram mantidos em caixas plásticas e receberam água e ração *ad libitum*.

Para a manutenção dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, foram utilizados camundongos Swiss machos de quatro semanas de idade. Estes animais foram mantidos no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Estes animais foram mantidos em caixas plásticas e receberam água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos realizados com galinhas e camundongos foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) sob o número de registro CEUA/UFU 107/11.

3.1.2. Grupos experimentais

3.1.2.1. Galinhas

As dez galinhas *Isa Brown* utilizadas neste estudo foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais, de acordo com a especificidade dos anticorpos policlonais IgY produzidos. O grupo STAg foi formado por 4 aves, que foram imunizadas com antígenos solúveis de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Para estudos comparativos de reatividade cruzada, frente aos antígenos de *T. gondii*, as aves do grupo NLA, composto por 4 indivíduos, receberam antígenos solúveis de taquizoítas de *Neospora caninum*. O grupo controle, foi constituído por 2 galinhas que não receberam nenhum dos antígenos dos dois parasitos.

3.1.2.2. Camundongos

Os dez camundongos C57BL/6 foram imunizados com antígenos solúveis de taquizoítas de *T. gondii*. Os anticorpos produzidos, foram utilizados em estudos comparativos sobre a cinética de produção de anticorpos específicos e também sobre o perfil de reconhecimento do proteínas antigênicas de *T. gondii*.

3.1.3. Produção de antígenos solúveis totais de taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (STAg)

Os antígenos solúveis de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foram obtidos de acordo com o protocolo descrito por SILVA et al. (2007). Os taquizoítas de *T. gondii*, da cepa RH, foram mantidos por meio de inoculações intraperitoneais em camundongos da linhagem Swiss (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1980). Após três dias de infecção, foi realizado o lavado peritoneal com 4 mL de meio RPMI 1640; em seguida a

suspensão de parasitos foi centrifugada a 500 x g por 10 minutos a 4°C. O número de parasitos/ mL de suspensão foi acessado utilizando uma câmara hemocitométrica (Neubauer). Em seguida, a suspensão de taquizoítas foi ajustada para 1×10^8 células/mL, em solução salina estéril tamponada com fosfatos a 0,01M (PBS, pH 7,2). Posteriormente, adicionou-se o inibidor de proteases (Complete, Roche, Alemanha) à suspensão de taquizoítas, que na sequência foram lisados através de dez ciclos de congelamento (-196°C) e de descongelamento (37°C). Os debris celulares, resultantes da lise dos parasitos, foram removidos mediante centrifugação a 14.000 x g 30 minutos a 4°C. A concentração final de proteínas, no sobrenadante, foi mensurada utilizando-se kit de dosagem proteica, baseado no protocolo envolvendo o ácido bicinconínico (BCA; Sigma). A leitura da densidade óptica foi realizada utilizando-se comprimento de onda igual a 590nm. Alíquotas de STAg foram conservadas a -70°C até a utilização.

3.1.4. Produção de antígenos solúveis de taquizoítas de *Neospora caninum* (NLA)

Os antígenos solúveis de *Neospora caninum* foram obtidos conformr SILVA et al. (2007). Os taquizoítas de *N. caninum* da cepa Nc-1, foram mantidos em células HeLa, cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino a 3%, inativado a 56 °C por 30 minutos. Os cultivos celulares e parasitos foram incubados a 37 °C e em atmosfera contendo CO₂ a 5%. Após 3 dias de cultivo, os taquizoítas foram recuperados mediante descolamento da monocamada de células da parede dos frascos de cultivo. Em seguida, a suspensão de células foi rompida, por meio de passagem forçada utilizando seringa de 5 mL através de agulha hipodérmica (25x7), para recuperação dos taquizoítas. A suspensão de células HeLa e taquizoítas, foi centrifugada a 45 x g por um minuto a 4 °C para remoção dos debris celulares. Posteriormente, o sobrenadante contendo os taquizoítas, foi submetido a duas etapas sucessivas de centrifugação a 720 x g por 10 minutos a 4 °C, em PBS pH 7,2. Os procedimentos para a obtenção dos antígenos solúveis dos taquizoítas foram idênticos ao relatado no item 3.1.2.

3.1.5. *Imunização dos animais*

3.1.5.1. *Galinhas*

A imunização das galinhas para a produção de anticorpos IgY policlonais anti-STAg e anti-NLA seguiu o protocolo descrito por SCHWARZKOPF et al (2001). Inicialmente, alíquotas de 250 µL de STAg ou NLA, em PBS pH 7,2, ajustadas para a concentração final de 100 µg de proteínas, foram adicionados a um volume igual de adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich, EUA), para a produção das emulsões utilizadas nos protocolos de imunização das galinhas. Os esquemas de imunização das galinhas do grupo STAg (n=4) e do grupo NLA (n=4) foram executados da seguinte forma: no dia zero, antígenos solúveis adicionados de adjuvante completo de Freund (ACF) (Sigma) contendo micobactérias inativadas; duas semanas após a imunização primária, foram realizados dois booster, com antígenos solúveis e adjuvante incompleto de Freund (AIF) (Sigma), com intervalo de 14 dias entre si. As galinhas do grupo controle (n=2) foram imunizadas da mesma forma, exceto por não serem adicionados os antígenos solúveis dos parasitos aos inóculos utilizados. As inoculações foram realizadas pela via intramuscular, profunda, no músculo peitoral da galinha. O volume total do inóculo (500 µL) foi distribuído em quatro pontos diferentes de aplicação. As galinhas foram monitoradas após as imunizações, para a detecção de processos inflamatórios locais ou para a apresentação de efeitos adversos sobre a quantidade de ovos produzidos.

Anticorpos anti-*Eimeria* spp. foram purificados a partir de um produto comercial (Supracox, Investigación Aplicada, Sociedad Anónima de Capital Variable, Puebla, Mexico). Supracox é uma mistura de gemas hiperimunes liofilizadas, contendo anticorpos IgY policlonais, produzidos em galinhas imunizadas com antígenos totais de *Eimeria acervulina*; *E. maxima* e *E. tenella*.

3.1.4.2. Camundongos

Os camundongos C57BL/6 foram imunizados com STAg, pelas vias intramuscular (n=10), na região do quadriceps femoral; ou subcutânea (n=10), na região lombar. A imunização primária foi executada empregando-se 25 µg de STAg em 50 µL de PBS (pH 7,2) e adicionados a igual volume de ACF (Sigma). Foram realizados dois *booster*, com duas semanas de intervalo, utilizando-se 25 µg de STAg em 50 µL de PBS (pH 7,2) e adicionados a igual volume de AIF (Sigma). Amostras de sangue foram coletadas semanalmente, em frascos sem anticoagulante. O local para coleta foi do plexo retro-orbital dos camundongos. Após centrifugação do sangue, 500 x g por 15 minutos a 4 °C, foi obtido o soro. As alíquotas de soro dos camundongos foram armazenadas em tubos *eppendorf* de 1000 µL, a -20 °C, até o momento do seu uso.

3.1.6. Coleta dos ovos

Todos os ovos coletados foram identificados na sua casca, de acordo com o grupo com a galinha e também pelo dia de realização da coleta. Os ovos começaram a ser coletados uma semana antes das imunizações das galinhas. Após a imunização primária, as coletas foram feitas diariamente até o 49º dia dos experimentos de imunização. Os ovos coletados foram organizados em cartelas de papelão próprias, separados por grupo e galinha. Para a melhor conservação e facilitar a manipulação dos ovos, as cartelas de papelão foram armazenadas a 4 °C, ficando dispostas de acordo com a semana de coleta.

3.1.7. Armazenamento das gemas puras

Para permitir a estocagem prolongada, foi feito o congelamento das gemas puras. Inicialmente, as cascas dos ovos foram limpas com álcool 70%. Em seguida, foi feita uma abertura na casca de aproximadamente 2 cm de diâmetro, utilizando a ponta de um

bisturi. Na sequência, a clara (albúmen) foi gentilmente escorrida para separá-la da gema. As gemas intactas foram depositadas sobre folhas de papel toalha e lavadas abundantemente, com jatos fracos de PBS pH 7,2, para a remoção de resíduos de albúmen sem romper a membrana vitelínica. Após a secagem do excesso de PBS, a membrana vitelínica foi incidida e o conteúdo foi vertido em proveta para mensuração do volume recuperado. Finalmente, a gema foi depositada em tubos plásticos, cônicos, com tampa e armazenadas a -20 °C, até a utilização.

As gemas dos ovos, correspondentes à coleta de uma semana, de cada uma das galinhas em seus respectivos grupos, foram reunidas em um mesmo tubo para formar um *pool* semanal de gemas.

3.1.8. Purificação dos anticorpos IgY totais

3.1.8.1. Remoção da fração rica em lipídeos da gema

A remoção da grande quantidade de lipídeos presentes na gema precede as demais etapas de purificação de anticorpos IgY policlonais totais. A deslipidização da gema foi realizada segundo o método descrito por AKITA & NAKAI (1993). Inicialmente, os frascos cônicos contendo a gema congelada a -20 °C, foram descongelados lentamente a 4 °C. Após esta etapa de descongelamento lento a gema apresentou-se na forma sólida. A gema foi homogeneizada com água ultrapura, previamente ajustada para a faixa de pH 5,0-5,2 com ácido clorídrico (HCl) 0,1N, na proporção 1:9. Dessa forma, estabeleceu-se a mistura como sendo 1g do pool de gemas, para 9 mL da água acidificada. Essa mistura foi mantida sob agitação vigorosa, por 30 minutos a temperatura ambiente. Ao final, o pH foi aferido e ajustado para a faixa entre 5,0-5,2 com HCl 0,1N. Em seguida, a mistura foi mantida a -20° C, *overnight*. Na sequência, o homogeneizado foi descongelado lentamente a 4 °C.

Após o descongelamento lento, a mistura foi centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado, enquanto o sobrenadante, preferencialmente translúcido, foi ajustado para a faixa de pH entre 7,0-7,2 por meio da adição de PBS 10 vezes concentrado.

3.1.8.2. Precipitação dos anticorpos IgY totais

O sobrenadante translúcido e com pH ajustado para 7,0-7,2 foi utilizado para a precipitação dos anticorpos IgY totais, de acordo com o protocolo descrito por AKITA & NAKAI (1993). Após mensurar o volume total de sobrenadante foi adicionado, lentamente, sob agitação lenta e constante, sulfato de sódio até a concentração final de 19% (p/v). A mistura foi mantida sob agitação por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida, a solução de proteína foi centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos a 4 °C. Nessa etapa, ao contrário da etapa de deslipidização, o sobrenadante é que foi descartado. O precipitado foi reservado e ressuspenso em PBS (pH 7,2), da seguinte forma: para cada 1g de gema pura utilizada para a purificação, empregou-se 1 mL de solução tampão para a solubilização do precipitado. Na sequência, a solução de proteínas foi submetida à diálise, contra tampão PBS (pH 7,2) durante 48 horas a 4 °C, para remoção dos resíduos de sulfato de sódio presentes na amostra. A concentração proteica da solução de anticorpos foi mensurada utilizando-se o kit BCA (Sigma), a leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda igual a 590nm. Após a adição do inibidor de proteases (Roche), as alíquotas da solução de anticorpos IgY foram armazenadas a -20 °C, até o uso.

3.1.8.3. Gel filtração por exclusão de peso molecular

Complementarmente ao protocolo de precipitação com sulfato de sódio 19%, a solução de anticorpos IgY foi submetida à gel filtração por exclusão de peso molecular, segundo descrito por HASSL et al. (1987). Inicialmente, uma amostra de 4 mL da solução de anticorpos IgY totais, foi ajustada para a concentração proteica igual a 1 mg/mL. Essa amostra foi aplicada em uma coluna Sephacryl S-300 HR (GE-Healthcare, Uppsala, Suécia), com dimensões de 80 cm de altura x 1,6 cm de diâmetro e faixa de fracionamento de 10 a 1500 kDa. A eluição da coluna foi realizada com tampão Tris-HCl 0,02M / NaCl 0,5M (pH 7,5), com taxa de fluxo de 3 mL/minuto. O efluente da

coluna foi coletado em frações de 1 mL e monitorado por densidade óptica (DO), utilizando comprimento de onda igual a 280 nm. Os resultados de DO foram plotados em gráfico para construção de um cromatograma.

3.1.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A avaliação da purificação dos anticorpos IgY totais foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sob condições não redutoras, segundo LAEMMLI (1970). Cada etapa do protocolo de extração de anticorpos IgY policlonais, descritos no item 3.1.7, gerou diferentes produtos que foram resolvidos por SDS-PAGE. Alíquotas contendo 10 µg de proteína, de cada um destes produtos, foram resolvidas em géis de concentração 8% (tampão Tris-HCl 0,375M [pH 8,8]; Dodecil-sulfato de sódio [SDS] 0,1%, EDTA 2 mM; acrilamida/bisacrilamida [29:1];, Tetrametiletilenediamino [TEMED] 0,125%; persulfato de amônio [APS] 0,125%). A eletroforese foi conduzida utilizando-se sistema SE 250 Mini Gel (GE Healthcare) e aplicando corrente de 25 mA/gel. Para identificação do peso aparente das proteínas, utilizou-se um marcador de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder). As bandas proteicas foram visualizadas por meio da coloração dos géis com *Coomassie Brilliant blue* 250R (Sigma).

3.1.10. Slot-dot

O enriquecimento de anticorpos IgY totais, nos diferentes produtos derivados da purificação, foi investigado por meio de Slot-dot. Inicialmente, alíquotas de todos os produtos, contendo 10µg de proteínas, foram diluídas em PBS (pH 7,2) na razão 10, até a diluição 10.000. Em seguida, 20 µL de cada uma das amostras diluídas foram transferidos para membranas de nitrocelulose utilizando-se aparato apropriado acoplado a uma bomba a vácuo (Bio-Dot SF; Bio-Rad, EUA). A albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada nas mesmas condições, como controle negativo do experimento. Após secagem da membrana, em temperatura ambiente, os sítios remanescentes para ligações

inespecíficas foram bloqueados por meio de incubação das membranas de nitrocelulose com PBS - Tween 0,05% - leite desnatado 5% (PBS-T-M 5%), por duas horas, à temperatura ambiente, sob agitação lenta. A remoção de resíduos remanescentes pós-bloqueio, foi realizada em seis ciclos de lavagem com PBS - Tween 0,05% (PBS-T), de cinco minutos cada um e a temperatura ambiente. Na sequência, os anticorpos IgY foram detectados pela adição de anticorpos IgG de coelho anti-IgY, marcados com peroxidase (Sigma), na diluição 20.000, em PBS-T-M 1%, e incubados por duas horas à temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após ciclo idêntico de lavagens com PBS-T, a reação foi revelada pela adição de 10 mg de 3,3' – *diaminobenzidino tetrahydrocloro* (DAB, Sigma) diluído em 15 mL de salina tamponada com Tris (TBS) e 12 µL de peróxido de hidrogênio 30% (Sigma). A revelação foi interrompida por meio de seis lavagens de cinco minutos em água ultrafiltrada.

3.1.11. Análise estatística

A análise estatística dos valores de índice ELISA e índice Aidez foi executada por meio do teste *t-student*, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2 . Resultados

3.2.1. Produção dos antígenos solúveis

A dosagem proteica dos antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*, demonstrou concentrações de 4800 µg/mL e 1600 µg/mL, respectivamente.

3.2.2. Imunização das galinhas e coleta de ovos

Os protocolos de imunização das galinhas *Isa Brown* com antígenos solúveis de *T. gondii* ou *N. caninum*, utilizando ACF ou AIF, não induziu processo inflamatório perceptível nos locais de aplicação.

A postura das galinhas foi acompanhada após as imunizações. A avaliação das galinhas do grupo STAg demonstrou que as aves 1, 2 e 3 não apresentaram modificações no números de ovos produzidos/semana. Por outro lado, a galinha 4 demonstrou queda na postura logo após o primeiro e o segundo *booster*, recuperando-se na segunda semana após a ultima imunização. A queda de postura dessa galinha, representou uma redução de 22 ovos, durante os experimentos de imunização que tiveram duração de 49 dias. De forma semelhante, uma das galinhas imunizadas com os antígenos de *N. caninum*, também apresentou redução na produção de ovos (14 ovos). As galinhas do grupo controle, as quais receberam uma mistura de adjuvantes e PBS, apresentaram uma média de 42 ovos coletados durante o experimento.

3.2.3. Estoque de gemas

A mensuração do conteúdo das gemas revelou um volume médio de 12 mL/ovo. Para cada semana de coleta de ovos, foi gerado, para cada galinha, um tubo de 50 mL com o *pool* semanal das gemas. O volume total de gema, por grupo, foi de 1400 mL para STAg e também para NLA.

3.2.4. Purificação dos anticorpos IgY totais

A deslipidização das gemas produziu, após a centrifugação, um precipitado de cor amarela, rico em lipídeos, chamado P1 (Figura 1A). Também gerou-se um sobrenadante translúcido, livre de lipídeos, denominado S1 (Figura 1B). Na sequência, a adição de sulfato de sódio ao S1 até a concentração de 19%, levou à precipitação dos anticorpos IgY totais, turvando a mistura. Após a centrifugação foi obtido um precipitado de cor branca, enriquecido nos anticorpos IgY totais, chamado P2 (Figura 1B). Nessa etapa, o sobrenadante (S2), contendo outras proteínas do ovo, foi descartado (Figura 1B). A leitura de densidade óptica das frações obtidas na gel filtração de P2, detectou proteínas nas frações 13 até 18, que correspondem ao pico observado no cromatograma (Figura 2).

A concentração proteica média da gema pura, mensurada pelo kit BCA, foi de 25 mg/mL. Enquanto que as concentrações proteicas médias de P2, purificados durante os protocolos de imunização, no grupo STAg; NLA e Controle, foram 4,1 mg/mL; 4,6 mg/mL e 4,5 mg/mL, respectivamente. Houve uma redução abrupta e significativa nas massas proteicas de P2 após o primeiro *booster*, seguida por uma fase de platô, que perdurou até o final do experimento de imunização das galinhas (Figura 3).

3.2.5. Qualidade da purificação de anticorpos IgY totais

A qualidade do processo de purificação dos anticorpos IgY foi avaliada por meio de SDS-PAGE em géis de poliacrilamida 8% (Figura 4). A separação das proteínas da gema pura, demonstrou ser uma mistura complexa, com pesos moleculares aparentes, variando de 220 kiloDaltons (kDa) a 20 kDa. O precipitado P1, obtido após o tratamento das gemas com água acidificada (pH 5,0-5,2), apresentou bandas proteicas com pesos moleculares aparentes de 160 kDa; 100 kDa e 70 kDa. O sobrenadante S1, demonstrou bandas proteicas com massa molecular em torno de 220 kDa e de 60 a 30 kDa. A adição de sulfato de sódio 19% gerou um precipitado constituído por uma banda visível por meio do corante *Coomassie Brilliant blue*, de peso molecular variando de 220 kDa a 160 kDa. As proteínas de massa molecular inferior a 60 kDa, foram

removidas no sobrenadante S2. A fração 14 da gel cromatografia apresentou uma banda de proteínas com peso molecular em torno de 200 kDa, enquanto a fração 16 revelou a presença de resquícios de proteínas de peso molecular menor que 60 kDa.

3.2.6. Enriquecimento das amostras purificadas com anticorpos IgY

Através da revelação do *Slot-dot* foi demonstrada a presença de anticorpos IgY em todos os produtos da purificação, a saber: S1; P1; S2; P2 e fração 14 (F14) (Figura 5). Durante as etapas de deslipidização e precipitação com sulfato de sódio, ocorreram perdas de anticorpos IgY, no precipitado P1 e também no sobrenadante S2. Os anticorpos IgY totais, puderam ser detectados na gema pura até a concentração proteica de 10^{-1} µg/mL, o mesmo resultado foi visualizado com S1 e P1. Em S2, foram detectados anticorpos IgY até a concentração de proteínas igual a 1µg/mL. Diferente da gema pura, nas amostras de P2 e em F14, detectou-se anticorpos até a concentração de 10^{-2} µg/mL.

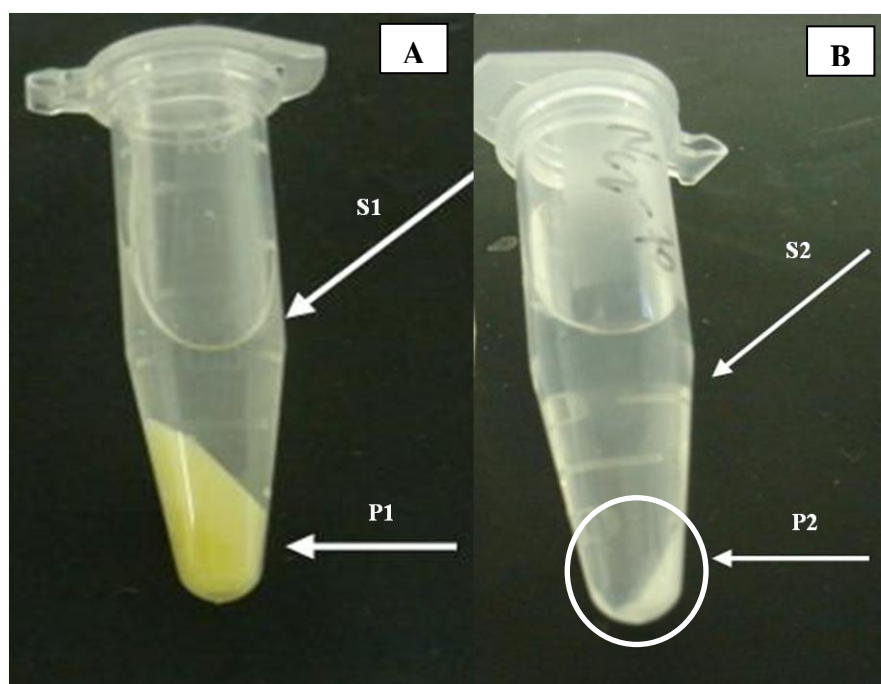


Figura 1: Purificação de anticorpos IgY totais: (A) Deslipidização. Após diluição do *pool* de gemas em água acidificada (pH 5,0-5,2) e centrifugação, produziu-se um precipitado rico em lipídeos da gema (P1) e um sobrenadante translúcido (S1) deslipidizado. **(B) Precipitação com sulfato de sódio 19%.** A adição de sulfato de sódio a 19% ao S1 levou à precipitação dos anticorpos IgY totais. Após centrifugação foi obtido um precipitado rico em anticorpos (P2) e um sobrenadante transparente (S2) contendo resquícios de outras proteínas da gema.

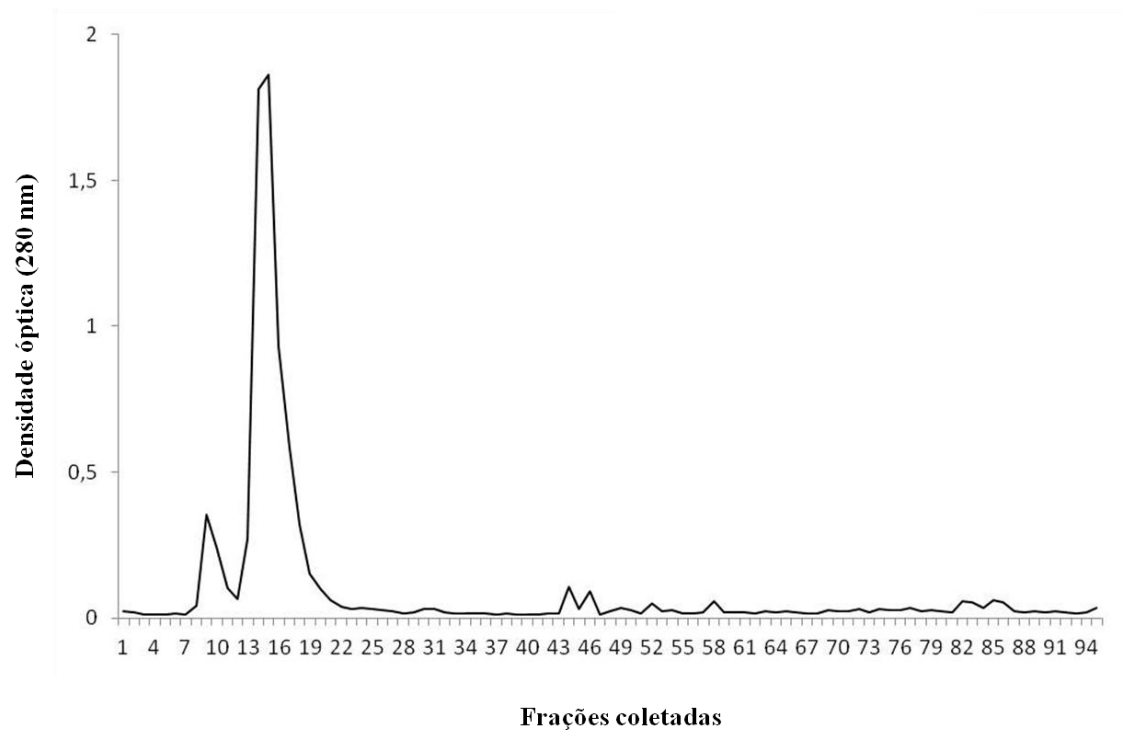


Figura 2: Cromatograma das frações obtidas através gel filtração de anticorpos IgY. A leitura da densidade óptica das frações obtidas na gel filtração de P2, utilizando comprimento de onda igual a 280nm, revelou a presença destas proteínas desde a fração 13 até a fração 18, formando um pico acentuado no cromatograma.

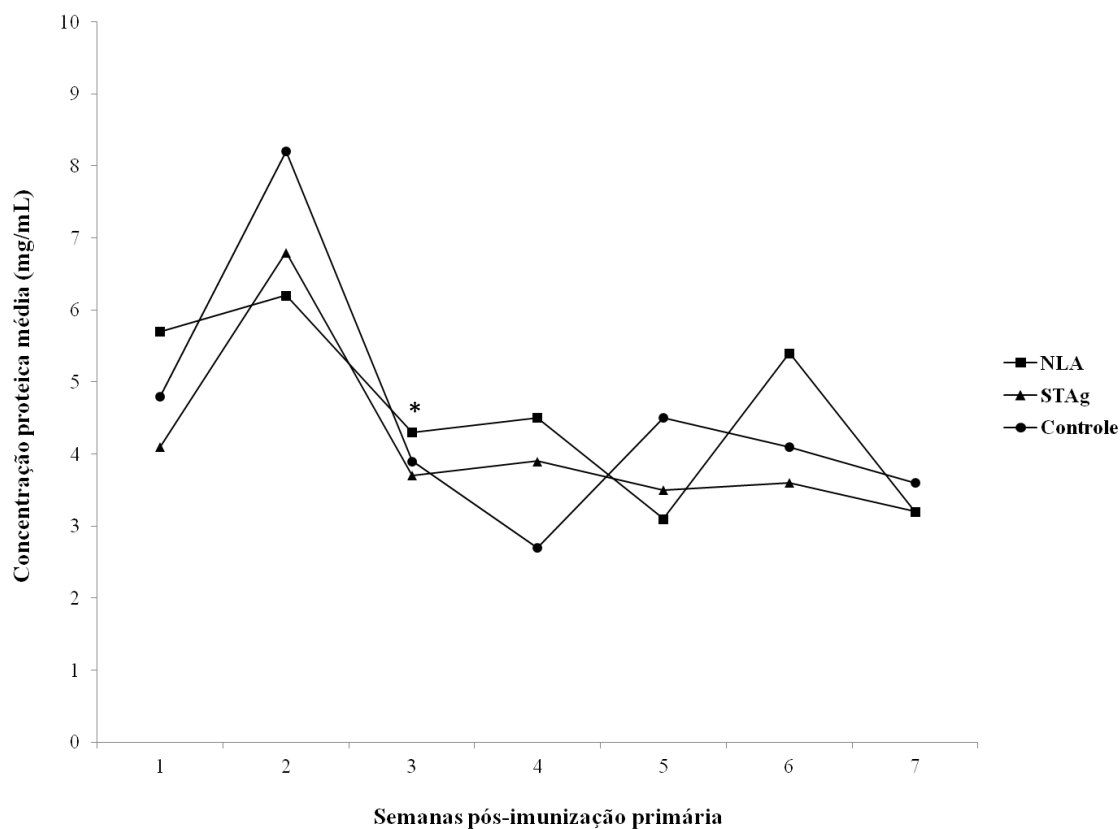


Figura 3: Concentração proteica média das amostras de anticorpos IgY após precipitação com sulfato de sódio: As amostras de IgY totais (P2) purificadas do *pool* semanal, apresentaram redução abrupta e significativa ($P < 0,05$), nas concentrações de proteínas dos três grupos (NLA; STAg e Controle) após administração do primeiro *booster* (semana 2). Em seguida, observou-se um platô nas quantidades proteicas obtidas, que perdurou até o final do experimento de imunização.

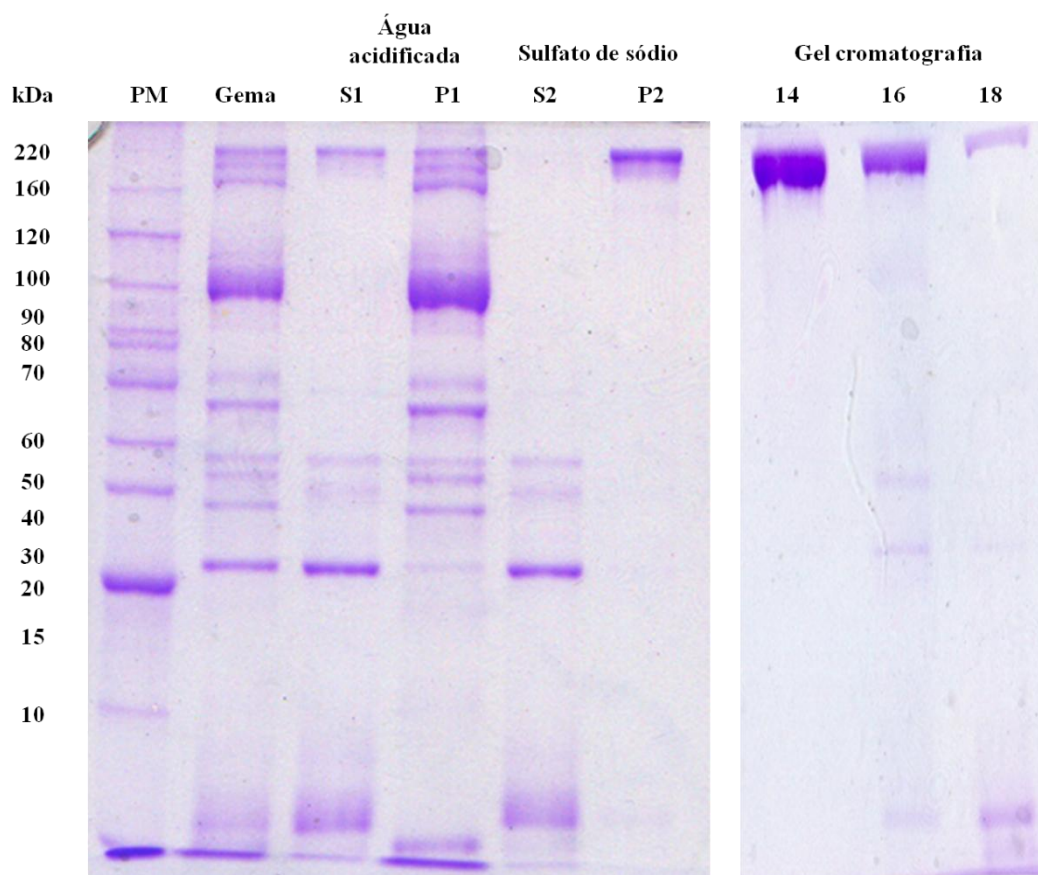


Figura 4: Resultado dos processos de purificação dos anticorpos IgY totais. A gema pura é uma mistura de proteínas com pesos moleculares variando de 220 kDa a 20 kDa. Após a diluição em água acidificada, proteínas de peso molecular entre 160 kDa, 100 kDa e 70 kDa, foram removidas em P1. Resquícios proteicos de peso molecular menor que 60 kDa estavam presentes em S1, e foram removidos em S2 após o tratamento com sulfato de sódio 19%. Em P2, após a coloração com *Coomassie Brilliant blue*, foi visível uma banda proteica com peso molecular variando de 220 kDa a 160 kDa. O mesmo resultado de P2 foi observado na fração 14 da gel cromatografia.

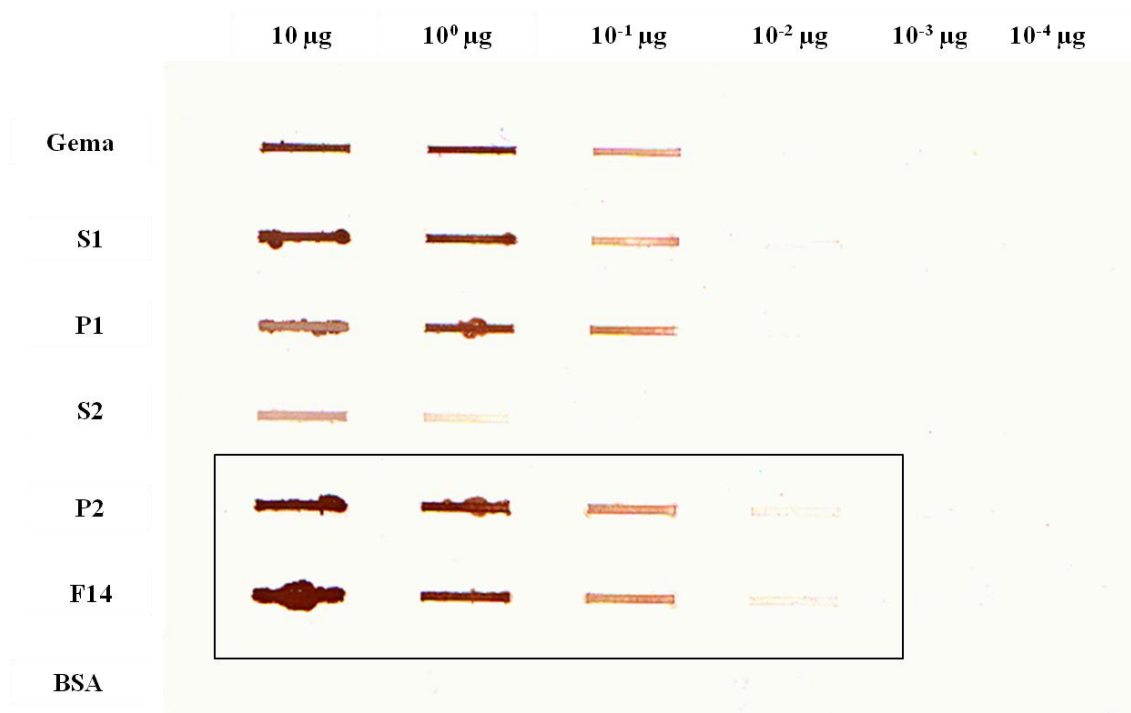


Figura 5: Enriquecimento de anticorpos IgY após diferentes etapas da purificação.

Os anticorpos IgY foram detectados em todos os produtos da purificação: S1; P1; S2; P2 e F14. Ocorreram perdas de anticorpos IgY, no precipitado P1 e também no sobrenadante S2. Os anticorpos IgY forma detectados na gema até a diluição com concentração proteica igual a 0,1 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo resultado foi visualizado com S1 e P1. Em S2, foram detectados anticorpos IgY até a concentração de proteínas igual a 1 $\mu\text{g/mL}$. Diferente da gema pura, nas amostras de P2 e em F14, detectou-se anticorpos até a concentração de 0,01 $\mu\text{g/mL}$ (retângulo).

4. Capítulo II

Caracterização dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg

4.1. Material e métodos

4.1.1. Ensaio Imunoenzimático (ELISA) indireto

A cinética da produção dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg foi determinada por meio de ELISA indireto, conforme o protocolo anteriormente descrito por MARCOLINO et al. (2000), com modificações. As adequações realizadas foram as seguintes: (i) as microplacas de poliestireno foram sensibilizadas com STAg, na concentração final de 10 µg/mL em tampão carbonato 0,06M, pH 9,2; (ii) o bloqueio dos sítios remanescentes para ligações inespecíficas, foi realizado com BSA 1% (Sigma) em PBS-T (PBS-T-BSA-1%); (iii) os anticorpos IgY totais foram diluídos em PBS-T-BSA-1%, e depois incubados nas placas sensibilizadas com STAg.

As concentrações ótimas dos reagentes foram obtidas por meio de titulação em bloco, para obtenção do ensaio com maior razão sinal/ruído. Microplacas de poliestireno de alta afinidade (Corning-Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL de STAg (10 µg/mL)/poço, *overnight* a 4°C. Antes da incubação com a solução de anticorpos IgY totais, as microplacas foram lavadas em três ciclos, com PBS-T. Na sequência, o bloqueio de sítios para ligações inespecíficas foi realizado com PBS-T-BSA-1%, por 60 minutos, à temperatura ambiente. Após segundo ciclo de lavagens (PBS-T), os antígenos de STAg foram incubados com os anticorpos IgY policlonais por 60 minutos a 37°C. Em cada poço da microplaca foram dispensados, em duplicata, 50µL da solução de anticorpos IgY totais, contendo 2µg de proteínas. Os anticorpos IgY foram detectados por meio da incubação com anticorpos IgG de coelho anti-IgY, conjugados com peroxidase (Sigma), na diluição 30.000 em PBS-T-BSA 1%, por 60 minutos a 37°C. A revelação foi realizada pela adição de 50µL de uma solução 10 mM de 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) [ABTS, Sigma] e peróxido de hidrogênio 30% (Sigma). A densidade óptica (DO) foi determinada após 30 minutos, utilizando filtro para comprimento de onda 405nm em espectrofotômetro de placas (M2e, Molecular Devices, EUA).

Para permitir o cálculo de *cut off* e do índice ELISA (IE), em cada placa de ELISA foram incluídas seis amostras de anticorpos IgY policlonais irrelevantes, em duplicata, que funcionaram como controles negativos, segundo SILVA et al. (2002). As condições de diluição e incubação foram as mesmas adotadas para os anticorpos IgY anti-STAg. O valor de *cut off* foi determinado pela média dos valores de densidade óptica (DO) dos controles negativos mais três desvios padrões. O resultado para cada amostra de anticorpos IgY anti-STAg foi expresso como IE da seguinte forma: $IE = DO_{amostra}/DO_{cut\ off}$, onde os valores de EI > 1,2 foram considerados positivos.

4.1.2. ELISA avides

A maturação de avides dos anticorpos IgY anti-STAg foi investigada pelo tratamento dos imunocomplexos com uréia 6M, seguida pela determinação da reatividade residual por meio de ELISA indireto, segundo MARCOLINO et al. (200), com adaptações, descritas no item 4.1.1. Após a etapa de incubação dos anticorpos IgY totais com STAg, metade dos poços foi incubada com 50µL de uma solução de uréia 6M em PBS (pH 7,2) e a outra metade com PBS (pH 7,2), por 5 minutos a temperatura ambiente. Na sequência, as placas foram lavadas em cinco ciclos com PBS-T. A detecção da atividade residual foi realizada pela incubação dos anticorpos IgY com anticorpos IgG anti-STAg, conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 30.000, por 60 minutos a 37°C. As etapas de revelação e tempo de leitura de DO foram idênticos ao descrito no item 4.1.1., O cálculo do índice de avides (IA) para cada amostra de IgY anti-STAg, foi realizado por meio da determinação da razão entre a absorbância (Abs) obtida nos anticorpos tratados com uréia (U^+) e dos não tratados com uréia (U^-), sendo o resultado expresso na forma de porcentagem, conforme a fórmula: $IA = Abs\ U^+/Abs\ U^- \times 100$.

4.1.3. Western blot unidimensional convencional e avides

Para verificar a cinética de detecção de proteínas antigênicas de STAg e a maturação de avides durante o protocolo de imunizações, os anticorpos IgY policlonais anti-STAg e IgG policlonal anti-STAg foram testados em *Western blot* unidimensional (WB-1D) convencional e avides, conforme SILVA et al. (2007). Inicialmente, 200 µg de STAg e o padrão de peso molecular foram submetidos a separação por 1D-SDS-PAGE em géis 12%, sob condições não redutoras, conforme descrito no item 3.1.8. Em seguida, as proteínas separadas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (dimensões: 8 cm de largura x 6 cm de altura), utilizando um sistema de transferência semi-úmido (Multiphor II Electrophoresis Unit; Pharmacia-LKB, Uppsala, Suécia). Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (Sigma) para visualização das bandas proteicas.

Em seguida à verificação da transferência dos antígenos, as membranas de nitrocelulose foram cortadas em tiras de 3 mm de largura. Na sequência, os sítios livres para interações inespecíficas foram bloqueados pela incubação com PBS-T-M 5%, por duas horas a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as tiras passaram por um ciclo de seis lavagens (PBS-T), de cinco minutos cada a temperatura ambiente. A incubação dos antígenos de STAg com os anticorpos IgY anti-STAg foi realizada em duplicata. Foram utilizadas amostras de anticorpos IgY do *pool* semanal que apresentou, no ELISA indireto convencional, IE>1,2. Cada tira de nitrocelulose foi incubada com 4µg de anticorpos IgY policlonais anti-STAg, *overnight* a temperatura ambiente. Finalizada essa etapa, as fitas foram novamente lavadas, conforme descrito acima.

No experimento WB-1D avides, uma das tiras com imunocomplexos STAg/IgY anti-STAg, foi lavada com PBS (pH 7,2) e outra tira com uréia 6M, respectivamente, em três repetições de cinco minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os anticorpos IgY policlonais anti-STAg no WB-1D convencional ou avides, foram detectados pela incubação com IgG de coelho anti-IgY conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 20.000 em PBS-T-M 1%, por duas horas à temperatura ambiente. A etapa de revelação foi realizada pela adição de 10 mg de 3,3' – Diaminobenzidino (DAB, Sigma), diluídos em 15 mL de solução tamponada com Tris (TBS), mais 12 µL de H₂O₂ 30%. O desenvolvimento da reação foi interrompido por lavagens sucessivas em H₂O ultrapura.

Em paralelo, o perfil de reconhecimento de alvos antigênicos de STAg também foi avaliado através da incubação dos antígenos com anticorpos IgG policlonais de camundongos anti-STAg, os quais foram obtidos a partir de coletas semanais de soro de animais imunizados. Os anticorpos IgG foram diluídos 1:100 em PBS-T-M 1%, em seguida incubados com STAg *overnight* a temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos foram detectados através da incubação com anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo, conjugados com peroxidase, diluídos 1:2000 em PBS-T-M 1%. As demais condições foram idênticas às já descritas para WB-1D convencional.

Para verificar a influência das vias de administração de STAg sobre o perfil de reconhecimento de antígenos do parasito, fitas de nitrocelulose contendo as proteínas de STAg foram incubadas com anticorpos IgY ou IgG policlonais anti-STAg, induzidos através de imunização intramuscular (i.m.) ou subcutânea (s.c.). As concentrações de ambos anticorpos, os tempos de incubação e as diluições dos conjugados foram iguais às descritas acima.

Para determinar a ocorrência de reatividade cruzada contra STAg, as fitas contendo antígenos foram incubadas com anticorpos IgY policlonais anti-*Neospora caninum* ou anticorpos IgY policlonais anti-*Eimeria* spp. (Supracox, Investigación Aplicada, Sociedad Anónima de Capital Variable, Puebla, Mexico), ajustados para a concentração de 4µg/mL em PBS-T-M 1%. Os tempos de incubação e as diluições dos conjugados foram iguais aos utilizados para a execução do WB-1D convencional.

A análise da imagem das bandas proteicas foi realizada utilizando o software *Kodak Digital Science 1D*, por meio de comparação com o perfil exibido pelo padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder) a fim de estimar a mobilidade relativa das proteínas e suas respectivas massas moleculares aparentes. Foram consideradas positivas as amostras de IgY que demonstraram reatividade a pelo menos proteínas antigênicas de STAg com peso molecular aproximado de 30 kDa (SILVA et al., 2002).

4.1.4 Análise estatística

A análise estatística dos valores de índice ELISA e índice Aidez foi executada por meio do teste *t-student*, utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.2. Resultados

4.2.1. Cinética da produção de anticorpos IgY policlonais anti-STAg

A avaliação da cinética de produção de anticorpos IgY anti-STAg, por meio de ELISA indireto convencional, demonstrou que a transferência de anticorpos IgY, do sangue para a gema do ovo, ocorreu de forma heterogênea entre as quatro galinhas do grupo STAg (Figura 6). A partir da segunda semana após a imunização primária, foram detectados valores de IE > 1,2 para os anticorpos IgY anti-STAg, nas amostras de P2 da galinha 4; depois na terceira semana das galinhas 2 e 3; e na quarta semana da galinha 1. A partir do 21º dia pós-imunização primária, o IE médio apresentou valores maiores que 1,2. Os valores de IE não apresentaram diferenças significativas entre as quatro galinhas do grupo. A galinha 4 demonstrou queda significativa do IE, para valor menor que 1,2 no dia 28 após a imunização primária (Figura 6).

As quantidades de anticorpos IgY anti-STAg, transferidos para a gema do ovo, apresentaram crescimento progressivo à medida que foram sendo realizadas as imunizações das galinhas. A partir do segundo *booster*, realizado no 28º dia pós-imunização primária, todas as quatro galinhas transferiram, para as gemas, quantidades significativas de anticorpos específicos, atingindo o pico de transferência no 42º dia (Figura 6). A partir do dia 42, três galinhas (1; 3 e 4) demonstraram queda nas quantidades de anticorpos IgY anti-STAg, exceto a galinha 2, que ainda manteve o crescimento na passagem de anticorpos do sangue para a gema.

A maturação de avidéz dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg, foi acessada por meio da avaliação da porcentagem reatividade residual dos anticorpos, após o tratamento dos imunocomplexos com uréia 6M, por meio do cálculo do índice Avidéz (IA). Adicionalmente aos dados de IA, uma comparação entre os resultados de IE das amostras de P2, tratadas e não tratadas com uréia, revelou uma redução, mas que não atingiu valores menores que 1,2. Também houve uma diminuição significativa na reatividade dos anticorpos IgY anti-STAg no dia 28, após o tratamento com uréia 6M (Figura 7). O IA médio revelou que os anticorpos IgY anti-STAg do 21º dia pós-imunização primária retiveram 70% da reatividade, na sequência, houve uma redução para 50% no dia 28. Após o segundo *booster* (28º dia pós-imunização primária) o IA

retornou ao valor de 70% no 35º dia, manteve-se assim até o 42º dia e seguiu-se uma elevação para 90% de retenção de reatividade no dia 42 (Figura 8).

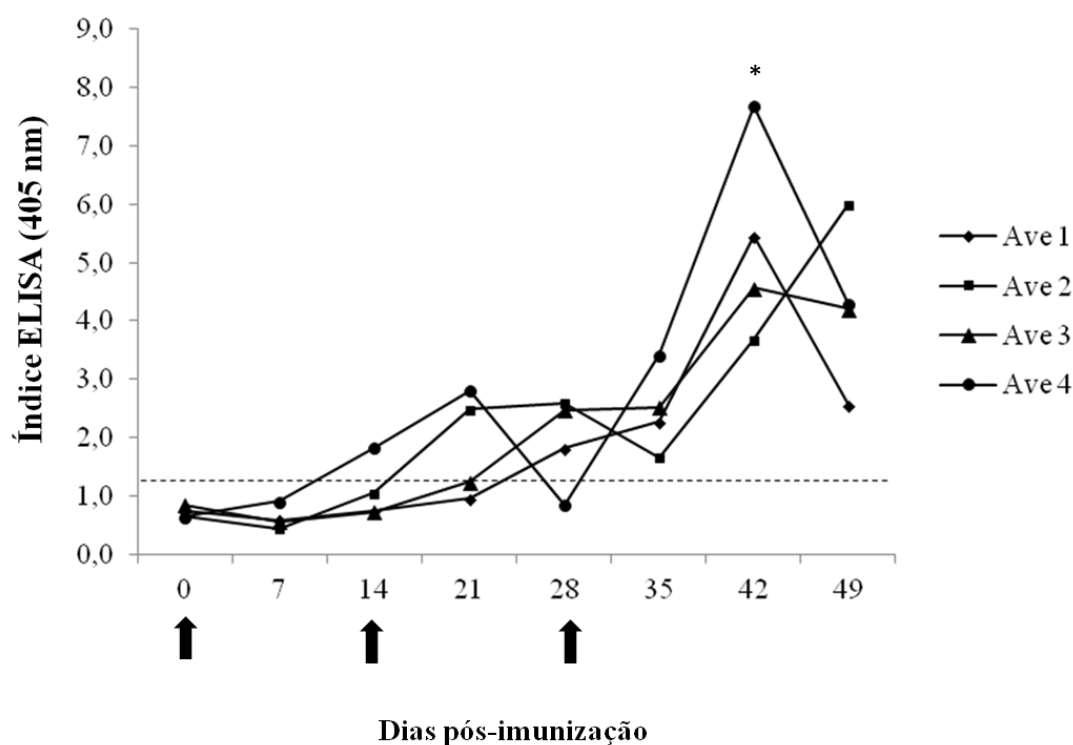


Figura 6: Cinética da produção de anticorpos IgY policlonais anti-STAg: A transferência dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg do sangue para a gema do ovo, foi feita de maneira heterogênea entre as quatro galinhas. Um valor médio $> 1,2$ para IE, foi detectado no 21º dia após a imunização primária. Individualmente, a primeira galinha com P2 positivo foi a número 4 (dia 14); depois as galinhas 2 e 3 (dia 21), por ultimo a galinha 1 (dia 28). Os valores de IE não apresentaram diferença significativa entre as quatro galinhas. A galinha 4 demonstrou queda de IE, no dia 28, para valores inferiores a 1,2. Após o segundo *booster*, ocorreu uma elevação significativa nos valores de IE, alcançando o pico de transferência de anticorpos IgY anti-STAg no 42º dia pós-imunização primária. As galinhas 1, 3 e 4 apresentaram queda significativa no IE no 49º dia, exceto a galinha 2, que ainda continuou uma transferência crescente dos anticorpos IgY anti-STAg. (* $P < 0,05$)

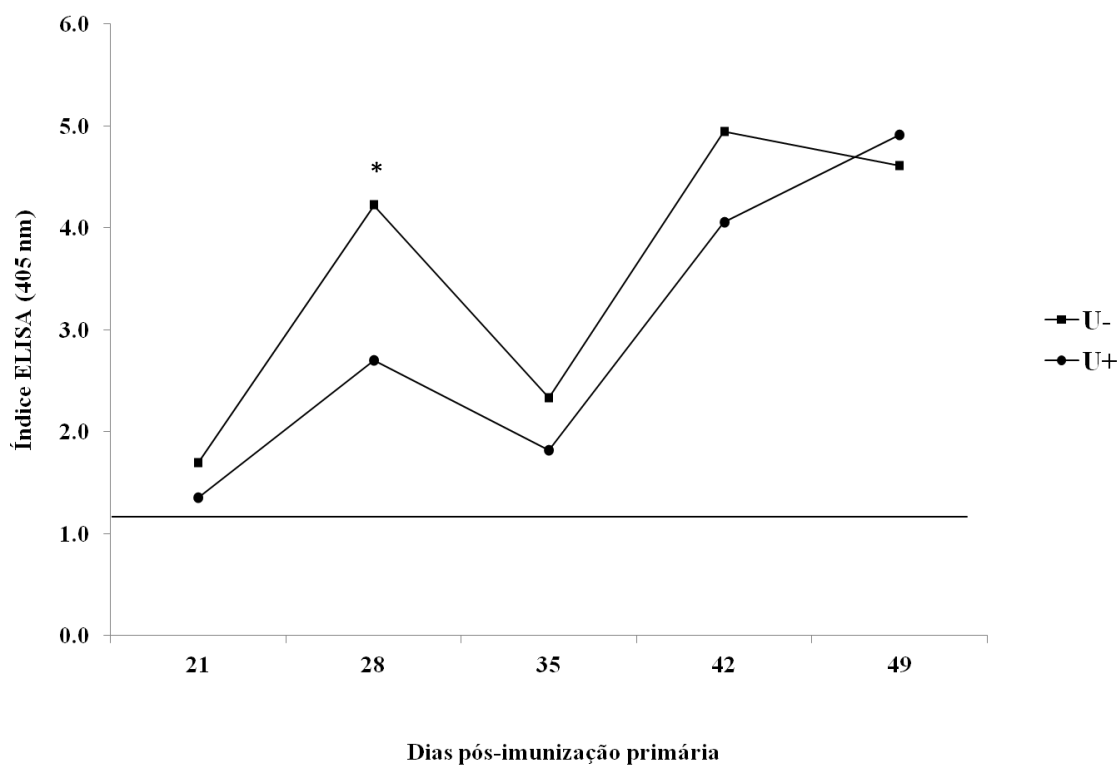


Figura 7: Reatividade residual de anticorpos IgY anti-STAg após tratamento com uréia 6M. As amostras de P2, a partir do 21º dia após imunização primária, tratadas com uréia 6M (U+) ou não tratadas (U-) não apresentaram diferenças significativas entre os valores de IE, na maioria das semanas avaliadas, exceto as amostras de P2 do dia 28. Os valores de IE dos anticorpos IgY anti-STAg, tratados com uréia 6M, não foram inferiores a 1,2 nas semanas avaliadas. (* $P < 0,05$)

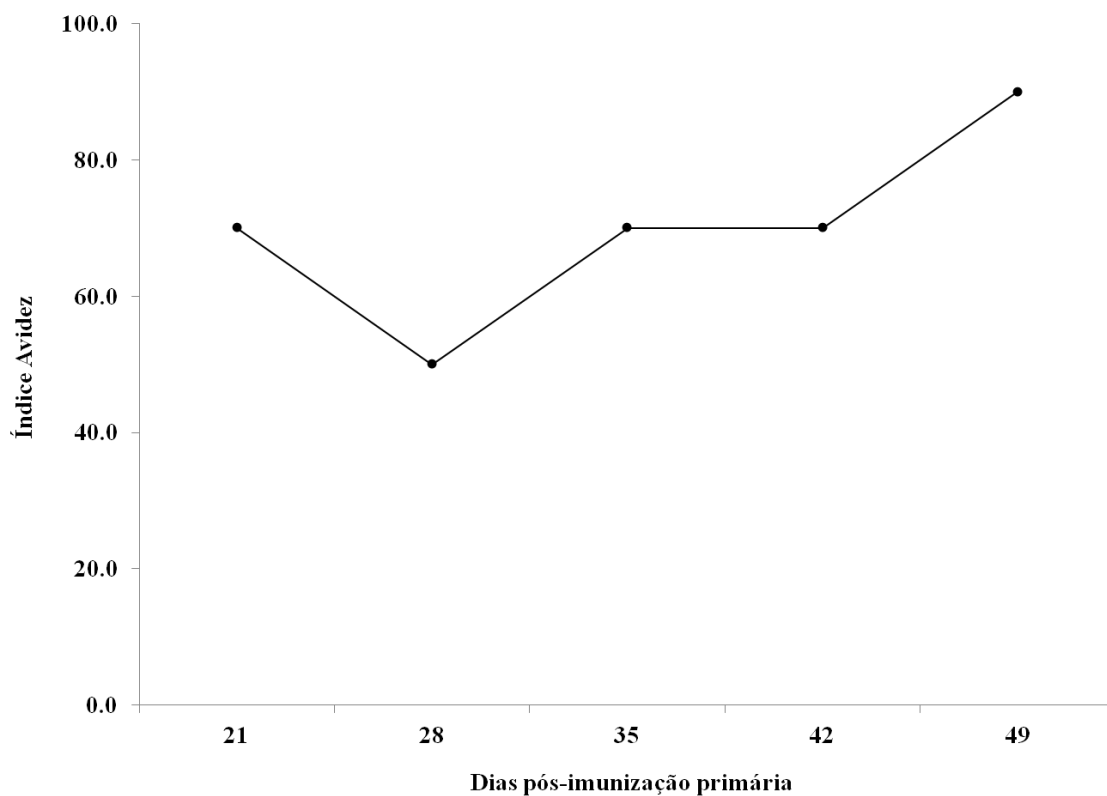


Figura 8: Índice avidéz de anticorpos IgY anti-STAg. A porcentagem de reatividade residual dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg foi estimada através do cálculo de índice Avidéz (IA). O IA médio do 21º dia pós-imunização primária foi de 70%, sofreu redução para 50% no 28º dia, retornou ao valor inicial, após o segundo *booster* (dia 28) e atingiu o maior valor de IA (90%) no 49º dia após a imunização primária.

4.2.2. Reconhecimento das proteínas antigênicas de *T. gondii*

Os anticorpos IgY policlonais anti-STAg detectaram várias proteínas antigênicas em *T. gondii* no ensaio de *Western blot*-1D (WB-1D) (Figura 9). Os anticorpos Y das quatro galinhas do grupo STAg, obtidos no 21º dia após a imunização primária, reconheceram proteínas de peso molecular aproximado de 30 kDa (p30). A galinha número 3, no 14º dia após o primeiro *booster*, reconheceu alvos antigênicos de aproximadamente 90 kDa. No 42º dia pós-imunização primária (PI), os anticorpos IgY obtidos das galinhas 1, 2 e 3, reconheceram antígenos de STAg com peso molecular maior que 90 kDa e também menor que 30 kDa. Proteínas antigênicas de aproximadamente 45 kDa e 70 kDa, também foram detectadas pelas quatro galinhas. A galinha 4, só apresentou um perfil de reconhecimento de antígenos de STAg semelhante às demais, nas amostras do 49º dia PI.

Após o tratamento dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg com uréia 6M, no 21º dia PI, a galinha 1 não apresentou reatividade para p30, enquanto as galinhas 2 e 3 retiveram parcialmente a detecção desse alvo antigênico. Os anticorpos IgY do 42º e 49º dias PI, das galinhas 1 e 3, apresentaram reatividade residual para proteínas com peso molecular de 30 kDa e 45 kDa. A galinha 1, no 42º e 49º dias PI, ainda apresentou reatividade para antígenos de 60 kDa e 90 kDa. A galinha 4, não apresentou reatividade para proteínas de STAg, exceto no dia 49 PI detectando apenas p30 (Figura 10).

Os anticorpos IgG policlonais anti-STAg, foram detectados no soro de camundongos imunizados, no 7º dia PI e detectaram antígenos com 30 kDa (Figura 11). No 21º dia PI foram detectados outros alvos antigênicos, com aproximadamente 20 kDa e 60 kDa. Do segundo booster (dia 28) em diante, foram reconhecidas antígenos de peso molecular em torno de 35 kDa; 50 kDa e 70 kDa (Figura 11).

A administração de STAg pelas vias intramuscular (i.m.) ou subcutânea (s.c.) induziu, nos camundongos, anticorpos IgG policlonais anti-STAg com perfis de reconhecimento de antígenos que foram semelhantes entre si (Figura 12). Os anticorpos IgG *i.m.* e *s.c.* reconheceram proteínas antigênicas de peso molecular aproximado de 30 kDa (Figura 12, retângulo vermelho). Também foram reconhecidos antígenos com massa molecular aparente igual a 50 kDa, os quais não foram detectados pelos anticorpos IgY anti-STAg *i.m.* (Figura 12, retângulo verde). Os anticorpos IgY policlonais anti-STAg também reconheceram p30 (retângulo preto); além disso, uma

banda de aproximadamente 45 kDa (retângulo preto) foi detectada apenas pelos anticorpos IgY anti-STAg *i.m.* (Figura 12). A incubação de membranas de nitrocelulose, contendo STAg, com anticorpos IgY policlonais produzidos contra outros parasitos Apicomplexa, anti-*Neospora caninum* e anti-*Eimeria* spp., não detectou qualquer proteína antigênica nos antígenos solúveis dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii* (Figura 13).

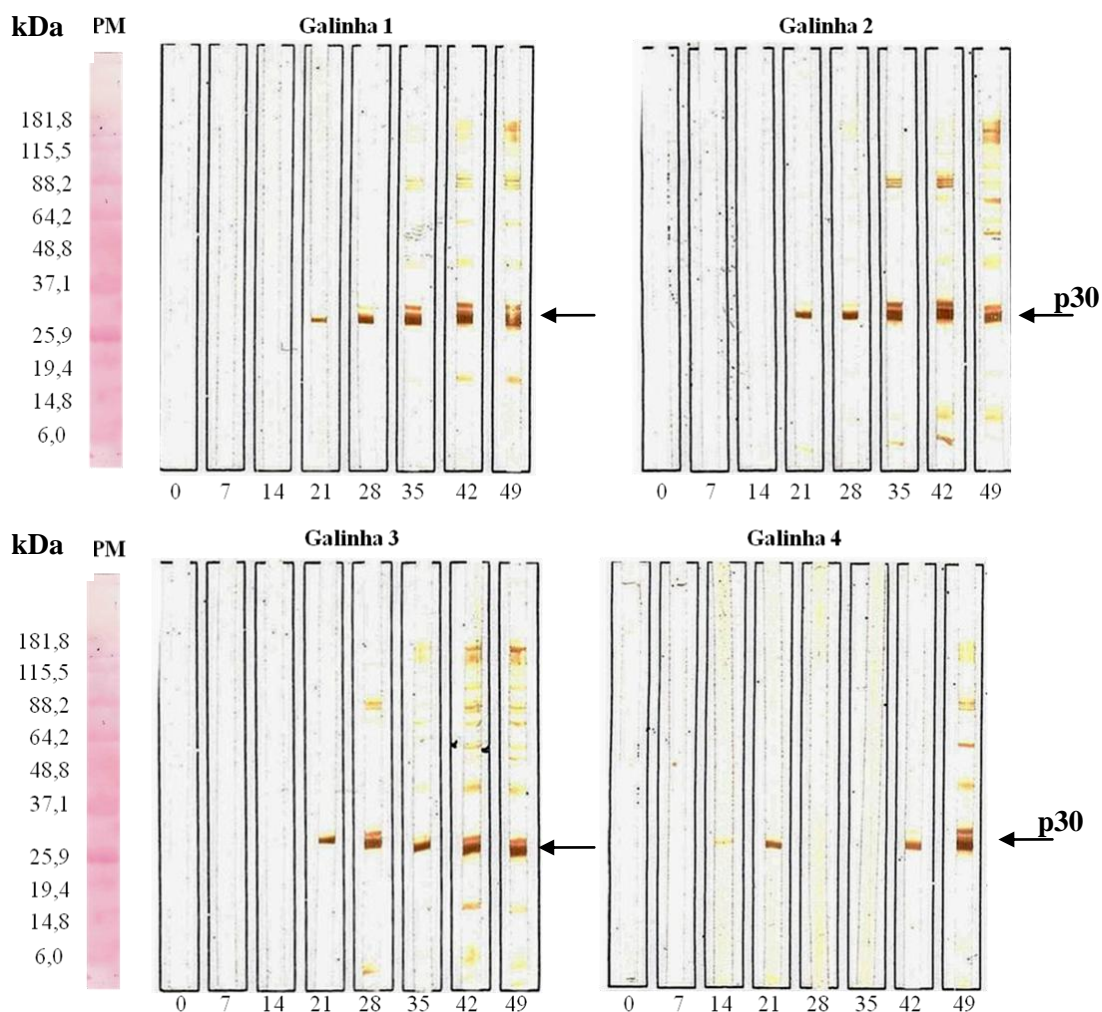


Figura 9: Perfil de reconhecimento de proteínas antigênicas de *T. gondii* por anticorpos IgY anti-STAg em Western blot unidimensional: Os anticorpos Y anti-STAg do dia 21, detectaram proteínas de peso molecular aproximado de 30 kDa (p30). A galinha número 3, 14 dias após o primeiro *booster* (dia 28), reconheceu alvos antigênicos de aproximadamente 90 kDa. No 42º dia pós-imunização primária, os anticorpos IgY obtidos das galinhas 1, 2 e 3, reconheceram antígenos de STAg com peso molecular maior que 90 kDa e também menor que 30 kDa. Proteínas antigênicas de aproximadamente 45 kDa e 70 kDa também foram reconhecidas. A galinha 4, apresentam um perfil semelhante de reconhecimento de antígenos, apenas no 49º dia pós-imunização primária.

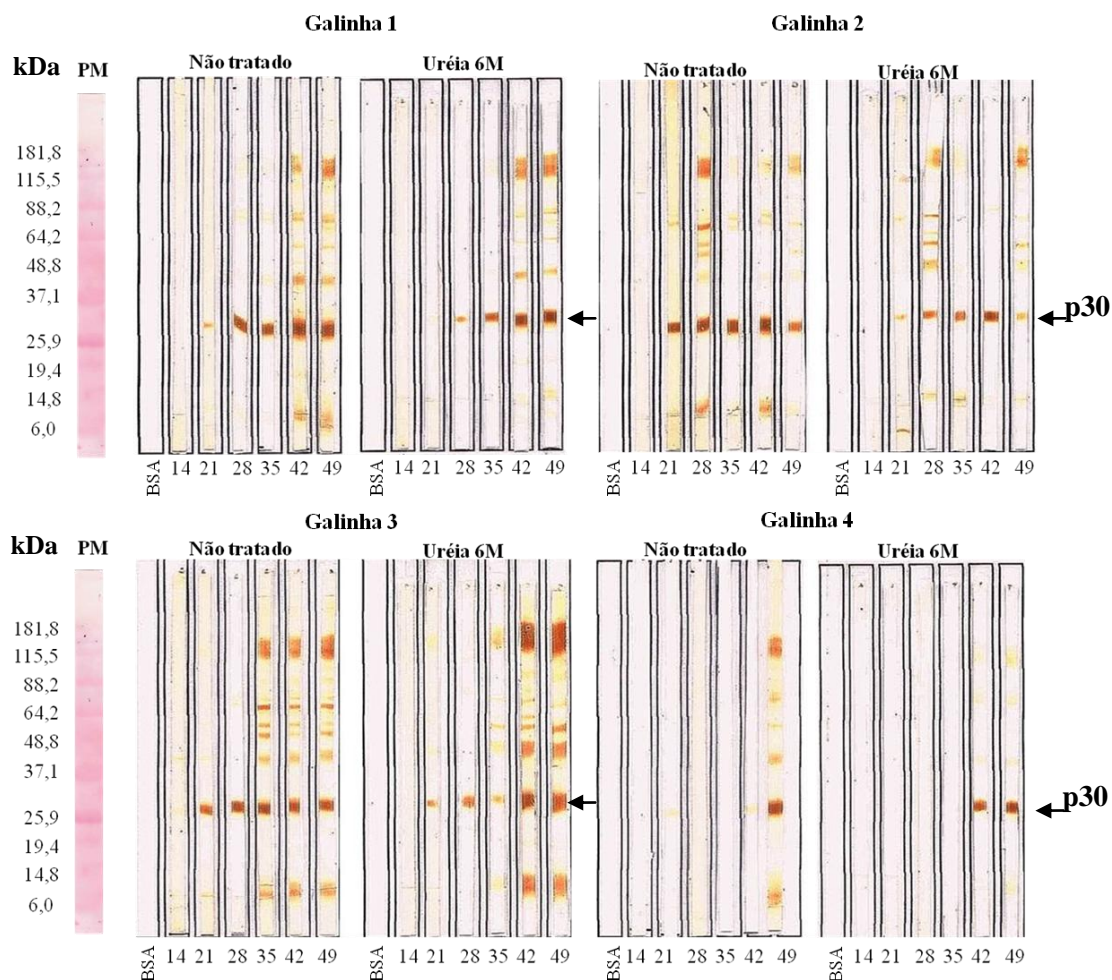


Figura 10: Avidéz de anticorpos IgY para diferentes antígenos de *T. gondii* em *Western blot* unidimensional: Após o tratamento com uréia 6M, os anticorpos do 21^o dia pós-imunização, na galinha 1 demonstraram ser de baixa avidéz, pois a banda correspondente à p30 não foi mais detectada. Por outro lado, a avidéz dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg, das galinhas 2 e 3, do mesmo dia, foi moderada para as proteínas p30. Para as galinhas 1 e 3, no 42^o e no 49^o dias, as proteínas com peso molecular igual, maior ou menor que 30 kDa, foram reconhecidas por anticorpos IgY de alta avidéz. A galinha 4, no dia 49, revelou anticorpos de alta avidéz apenas para p30.

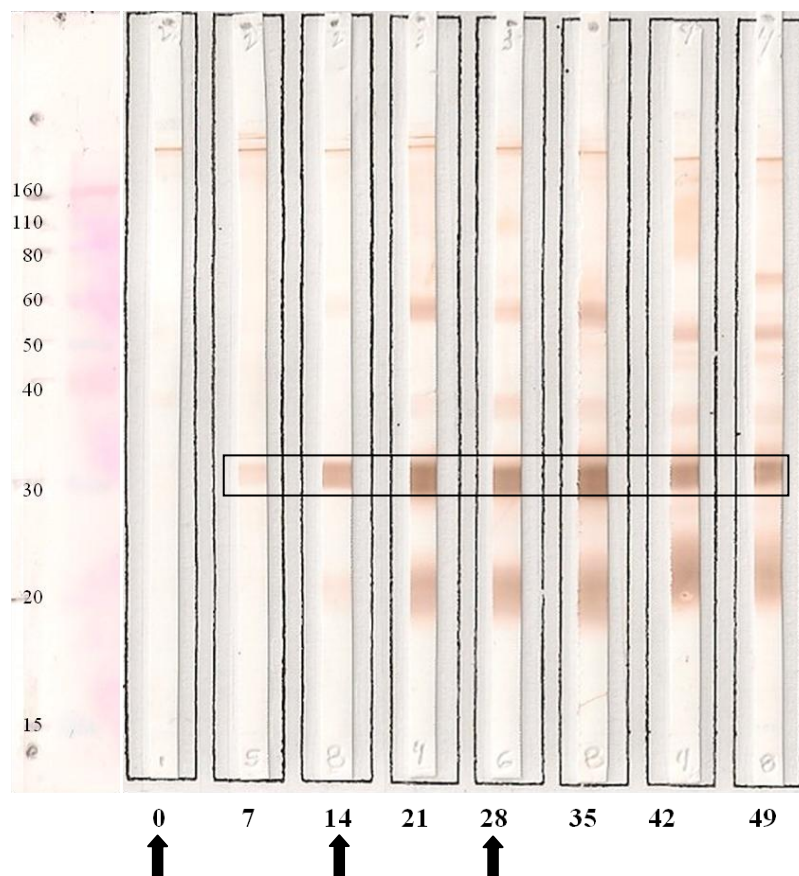


Figura 11: Perfil de reconhecimento de proteínas antigênicas de *T. gondii* por anticorpos IgG policlonais de camundongos anti-STAg em Western blot unidimensional: Os anticorpos IgG anti-STAg no soro hiperimune de camundongos reconheceram proteínas antigênicas de 30 kDa no 7º dia pós-imunização primária (retângulo). Após o primeiro booster (dia 14) foram detectadas novos alvos, com aproximadamente 20 kDa e 60 kDa. Do segundo booster (dia 28) em diante, foram reconhecidas antígenos de peso molecular em torno de 50 kDa e 40 kDa. As setas pretas apontam os dias das imunizações com STAg.

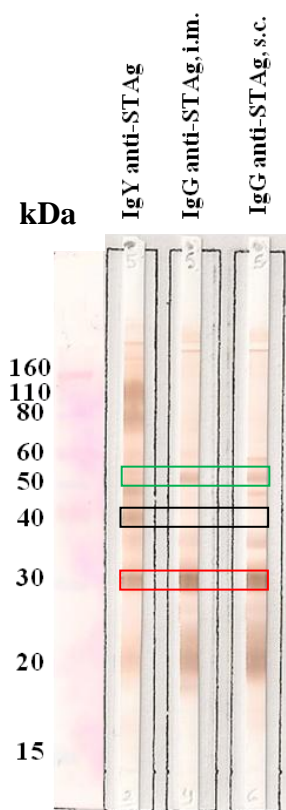


Figura 12: Perfil de reconhecimento de alvos antigênicos STAg através de IgY e IgG específicas após imunização pelas vias subcutânea ou intramuscular: Os anticorpos IgG, obtidos após administração intramuscular (i.m.) ou subcutânea (s.c.) de STAg, em camundongos, revelou um perfil de reconhecimento de antígenos semelhantes. Os anticorpos IgG reconheceram proteínas antigênicas de peso molecular aproximado de 30 kDa. Também detectaram antígenos de 50 kDa, que não foram detectados pelos anticorpos IgY (retângulo verde). Os anticorpos IgY anti-STAg também reconheceram alvos antigênicos de massa molecular igual a 30 kDa (retângulo preto); antígenos de peso molecular superior a 80kDa e uma banda de aproximadamente 45 kDa (retângulo preto), os quais não foram detectados pelos anticorpos IgG.

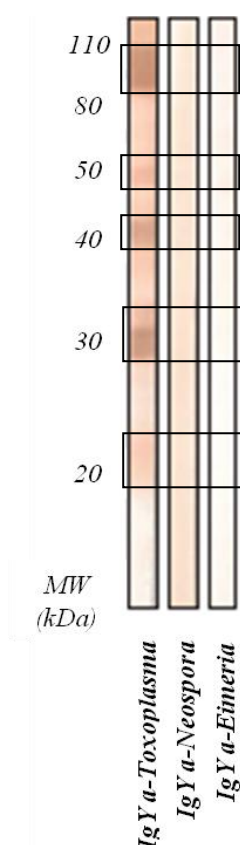


Figura 13: Detecção de antígenos de STAg através de anticorpos IgY anti-*Neospora caninum* anti- *Eimeria* spp. Fitas de nitrocelulose contendo proteínas de STAg foram incubadas com anticorpos IgY policlonais anti-STAg (*Toxoplasma gondii*); anti-*Neospora caninum* e anti-*Eimeria* spp. Os anticorpos IgY contra outros parasitos Apicomplexa não detectaram proteínas antigênicas em STAg. Os antígenos solúveis dos taquizoítos de *T. gondii* foram detectados apenas pelos anticorpos IgY policlonais STAg-específicos (retângulos).

5. Capítulo III

Utilização dos anticorpos IgY anti-STAg em ensaios de imunomarcação, proteômica e proteção frente a infecção

5.1. Material e métodos

5.1.1. Imunohistoquímica

Para investigar a capacidade dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg em detectar estágios evolutivos de *T. gondii*, em cortes histológicos de tecido cerebral de camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa ME-49, foi padronizado um ensaio de imunohistoquímica. Foram utilizados anticorpos IgY policlonais anti-STAg, obtidos do 42º dia PI. As concentrações ótimas para a execução da técnica, foram obtidas através da titulação em bloco dos reagentes utilizados. Inicialmente, fragmentos do cérebro de camundongos BALB/c, após 30 dias de infecção com *T. gondii* da cepa ME-49, foram fixados em formaldeído 4% e embebidos em parafina. Em seguida, os fragmentos parafinados foram seccionados em cortes histológicos com espessura de 5 µm, desparafinizados e incubados com anticorpos IgY policlonais anti-STAg, na concentração proteica final de 30 µg/mL em PBS (pH 7,2), por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida. Após três lavadas sucessivas de cinco minutos, através da imersão cuidadosa em PBS (pH 7,2), os cortes foram incubados com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma) diluído 1:300 em PBS e com adição de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) 0,02%, por 60 minutos a 37°C, protegido da luz. Após novo ciclo de lavagens, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada com carbonato (pH 9,0). A leitura foi realizada em sistema de microscopia de fluorescência invertida (FSX-100, Olympus, Tóquio, Japão). As diferentes formas parasitárias foram identificadas pela coloração verde, decorrente da ligação do anticorpo secundário conjugado a FITC com os anticorpos primários, bem como por meio de características morfológicas típicas de cistos teciduais e/ou taquizoítos.

5.1.2. Imunocitoquímica

Para demonstrar a eficácia dos anticorpos IgY anti-STAg na detecção de parasitos intracelulares em células previamente permeabilizadas, foi padronizado um ensaio de imunocitoquímica. As concentrações ótimas dos diferentes reagentes, foram obtidas por meio de padronizações prévias, realizando-se a titulação em bloco dos reagentes. Inicialmente, células HeLa (ATCC No. CCL-2) foram cultivadas em placas de 24 poços, na proporção de 1×10^5 células/poço. Em seguida, os cultivos celulares foram infectados com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH, utilizando-se a proporção de 1 parasito/célula (inglês: *multiplicity of infection*, MOI) em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino 2%, e incubados por 24 horas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Depois da infecção com os parasitos, as células HeLa foram fixadas com formaldeído 4%, por quatro horas à temperatura ambiente (TA) e permeabilizadas com Triton-X 100 0,1% diluído em tampão citrato (pH 6,3), por cinco minutos TA. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos IgY policlonais anti-STAg, obtidos no 42º dia PI, na concentração proteica de 30 µg/mL em PBS (pH 7,2), por duas horas a 37°C. O passo seguinte consistiu na incubação com anticorpos de coelho anti-IgY conjugado com FITC (Sigma), diluído 1:600 em PBS mais DAPI 0,02% (Sigma), por 1 hora a 37°C, ao abrigo da luz. Os parasitos marcados com anticorpos IgY anti-STAg foram observados em sistema de microscopia de fluorescência invertida (EVOS, AMG Microscopy Group, EUA). A avaliação da marcação foi realizada pela incorporação das imagens adquiridas por meio de contraste de fase e filtros de fluorescência, para diferentes espectros de emissão de luz. Os taquizoítos foram identificados pela coloração verde brilhante, após a ligação dos anticorpos IgG anti-IgY/FITC com os anticorpos IgY anti-STAg, bem como pelas características morfológicas típicas destas células do parasito.

5.1.3. Western blot bidimensional

O ensaio de eletroforese bidimensional, seguido de *Western blot*, foi realizado para investigar o perfil de reconhecimento de anticorpos IgY específicos para antígenos solúveis de *T. gondii* (STAg) com diferentes pesos moleculares e pH. As condições ótimas de execução da técnica para se aumentar a razão sinal/ruído, foram obtidas por meio de titulação em bloco dos reagentes.

As amostras de STAg, na concentração proteica final 3mg/mL, foram dialisadas contra água ultrapura, para a remoção de resíduos interferentes na qualidade dos resultados da focalização isoeletrica (FIE). Para a realização dos procedimentos de FIE, alíquotas de 20µL de STAg (60µg de proteínas) foram homogeneizadas com tampão de reidratação (DeStreak e IPG *buffer* pH 3-10, GE Healthcare) em quantidade suficiente para 125µL; e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação lenta, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 30 minutos a 23°C. Em seguida a mistura STAg/tampão de reidratação (125µL), foi aplicada sobre tiras próprias para FIE (ReadyStrip™, Bio-Rad, 7 cm de comprimento e gradiente imobilizado de pH variando de 3 a 10), previamente hidratadas em tampão (DeStreak e IPG *buffer* pH 3-10, GE Healthcare) de forma passiva (sem a aplicação de corrente elétrica às tiras), e incubadas *overnight* a temperatura ambiente. Após a incubação as tiras da FIE foram posicionadas em aparato de focalização isoeletrica (Ettan IPGphor 3, GE Healthcare), e cobertas com óleo mineral (Immobiline™ DryStrip Cover Fluid, GE Healthcare) para manutenção da integridade das tiras. A FIE foi conduzida aplicando-se a corrente máxima de 50 µA/tira, de acordo com o seguinte programa de corrida, realizado em quatro etapas (S1 a S4): S1 – 600 Volt hora (Vhr); S2 – 650 Vhr; S3 – 4.500 Vhr e S4 – 2.500 Vhr. Ao final da FIE, as tiras com os antígenos separados de acordo com seus pontos isoeletricos, foram armazenadas a -70°C até o momento do uso.

Na sequência, realizou-se a separação das proteínas de STAg, de acordo com o seu peso molecular, foi executada por meio de eletroforese bidimensional (SDS-PAGE). As tiras de FIE, com os antígenos de STAg, foram descongeladas e equilibradas em tampão SDS (uréia 6M, Tris-HCL 50 mM pH 8,8, glicerol 30% [v/v], SDS 2%, azul de bromofenol 0,001%) acrescido de ditiotretol (DTT) 0,01%, por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida as tiras foram submetidas a três lavadas em solução

tampão Tris-glicina (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%). O protocolo de SDS-PAGE bidimensional foi realizado utilizando o sistema de eletroforese vertical (miniVE System, GE Healthcare). As tiras de FIE foram cuidadosamente acondicionadas na parte superior do cassete para mini-gel (10cm x 10,5cm), em contato direto com a superfície do gel de poliacrilamida a 12,5%. Paralelamente, no mesmo gel, foram aplicados 5 µL do padrão de peso molecular (BenchMark™ Protein Ladder 6-200 kDa). Na sequência, o cassete para mini-gel foi selado com solução aquecida (aproximadamente 60°C) de agarose 0,5% acrescida de azul de bromofenol 0,002%.

A eletroforese bidimensional foi executada em duas etapas: (1ª etapa). 10 miliampères (mA)/ gel durante 15 minutos; (2ª etapa) 20 mA/gel por 90 minutos. Os *spots* das proteínas de STAg bidimensionalmente resolvidas foram visualizados através de coloração com *Comassie Brilliant Blue* G-250 coloidal (Sigma). Em seguida as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e em seguida coradas com *Ponceau* (Sigma), nas mesmas condições descritas no item 4.1.3.

O *Western blot* (WB) bidimensional (2D) foi realizado sob as mesmas condições de execução descritas no item 4.1.3. Após o bloqueio dos sítios remanescentes para ligação de proteínas, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos IgY policlonais anti-STAg, do 42º dia PI, na concentração proteica de 4 mg/mL em PBS-T-M 1%, por duas horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Na sequência, as membranas foram lavadas em seis etapas sucessivas de cinco minutos com PBS-T-0,05%. Em seguida, os anticorpos IgY foram detectados através da incubação das membranas de nitrocelulose com IgG de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase (Sigma) diluída 20.000 vezes em PBS-T-0,05%, por duas horas a temperatura ambiente, sob agitação lenta. Após outro ciclo de lavadas, a revelação feita por meio da adição de 10mg de 3,3' – Diaminobenzidino (DAB, Sigma), diluídos em 15 mL de TBS acrescidos de 12 µL de H₂O₂ 30% (Sigma). A revelação foi interrompida por lavadas sucessivas das membranas de nitrocelulose em água ultra pura. Na análise, a massa molecular e o ponto isoelétrico aparente das proteínas detectadas foram calculados utilizando o programa ImageMaster 2D Platinum v7.0 (GE Healthcare).

Alternativamente, membranas de nitrocelulose, contendo STAg que foi bidimensionalmente resolvido, foram incubadas com amostras de soro de camundongos imunizados com anti-STAg (s.c.), diluído 100 vezes em PBS-T-M 1%, por duas horas a temperatura ambiente. Os anticorpos IgG foram detectados por meio de incubação com anticorpos IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (Sigma)

diluídos 1000 vezes em PBS-T, por duas horas a temperatura ambiente. A etapa de revelação foi realizada conforme descrito para WB-2D para IgY.

5.1.4. Inibição da replicação de *T. gondii*

Os anticorpos IgY policlonais anti-STAg foram avaliados quanto a sua eficácia para inibir a proliferação de taquizoítos de *T. gondii* em cultivos celulares. Inicialmente, taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foram marcados através da incubação com ester de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFSE) 5 μ M a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂, por 10 minutos ao abrigo da luz. A reação de marcação foi interrompida por centrifugações sucessivas a 500 x g por 10 minutos a 4°C, com meio RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. Na sequência, o pellet contendo taquizoítos/CFSE foi ressuspensionado em PBS acrescido de Azul de Trypan 0,04%, em seguida realizou-se a contagem das células viáveis em câmara hemocitométrica (Neubauer), sendo considerados viáveis os taquizoítos que não incorporaram o corante em seu citoplasma. Em seguida a suspensão foi ajustada para 1x10⁷ taquizoítas/mL.

Alíquotas de 200 μ L de suspensões de células HeLa (ATCC No. CCL-2), contendo 1 x 10⁶ células/ml em RPMI 1640/ SBF 10%, foram cultivadas em placas de 24 poços, por 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Em seguida, a monocamada de células HeLa foi infectada com taquizoítos/CFSE marcados, com MOI 1, por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após a primeira hora de incubação foram adicionados aos cultivos celulares infectados, três diferentes concentrações de anticorpos IgY anti-STAg, 1 μ g/mL, 10 μ g/mL e 100 μ g/mL, purificados da gema dos ovos do 42º dia PI. Após 24 horas de incubação, as células HeLa foram descoladas das placas através do tratamento com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10mM diluído em PBS, por 5 minutos a 37°C. Em seguida a suspensão de células foram lavadas em PBS duas vezes através de centrifugação a 1.200 x g por 10 minutos a 4°C e depois fixadas em formaldeído 4% por cinco minutos a 4°C. Na sequência, a suspensão contendo as células fixadas foi ajustada para a concentração de 1 x 10⁵ células/mL. A proliferação de *T. gondii*, foi avaliada através da detecção da fluorescência verde emitida pelas células HeLa parasitadas com taquizoítos/CFSE marcados, em comparação com as células HeLa não parasitadas, utilizando filtros de comprimento de

onda igual a 488nm, em equipamento próprio para citometria de fluxo (FACSCantoII, BD Biosciences, EUA).

5.2. Resultados

5.2.1. Imunomarcacão

Na imunohistoquímica utilizaram-se os cortes histológicos do cérebro de camundongos BALB/c cronicamente infectados. Os anticorpos IgY policlonais anti-STAg detectaram antígenos na superfície de estruturas de contorno circular, que foram marcadas em verde brilhante após a interação de anticorpos secundários conjugados com FITC e os anticorpos IgY (Figura 10A e 10B). Também, na área interna da estrutura, foram reconhecidos alvos antigênicos em pequenos vacúolos. Adicionalmente, dentro deste vacúolos detectaram-se estruturas com fluorescência azul, devido à marcação com DAPI (Figura 10A e 10B). As características morfológicas descritas são sugestivas de vacúolos parasitóforos contendo taquizoítas. Os anticorpos anti-STAg reconheceram produtos antigênicos em uma forma evolutiva extracelular (Figura 10C), a morfologia piriforme sugere um taquizoíta. Em outras áreas do corte histológico, os anticorpos IgY anti-STAg reconheceram antígenos de superfície em cistos teciduais, marcando-os de maneira uniforme e definida (Figura 10C e 10D). No interior dos cistos teciduais foram corado pelo DAPI os núcleos dos bradizoítas (Figura 10C e 10D).

No ensaio de imunocitoquímica foram detectados taquizoítas de *T. gondii* infectando monocamadas de células HeLa permeabilizadas, através dos anticorpos IgY policlonais anti-STAg e evidenciados pelos anticorpos secundários conjugados com FITC. A utilização de canais distintos para a captura da fluorescência emitida, permitiu evidenciar os taquizoítas do parasito como estruturas emitindo fluorescência verde, com morfologia elíptica e agrupadas, semelhantes a rosetas (seta branca, Figura 11A) ou isoladas (seta vermelha, Figur 11D), geralmente próximas ao núcleo das células HeLa. O reconhecimento dos antígenos de superfície dos taquizoítas de *Toxoplasma gondii* ocorreu de maneira uniforme e intensa, conforme a fluorescência verde observada no contorno destas células (Figura 11B e 11D). O núcleo das células HeLa foi marcado em azul pelo DAPI (Figura 11A, 11B, 11C e 11D). A sobreposição das imagens de fluorescência com as imagens obtidas por contraste de fase, evidenciou os taquizoítas nas proximidades do núcleo rodeados pelo citoplasma das células HeLa (Figura 11C).

Também observou-se a marcação de estruturas internas do parasito, como regiões mais densamente coradas, na extremidade mais afilada do parasito, provavelmente sendo reconhecidos antígenos das organelas do complexo apical dos taquizoítas (Figura 11B e 11C).

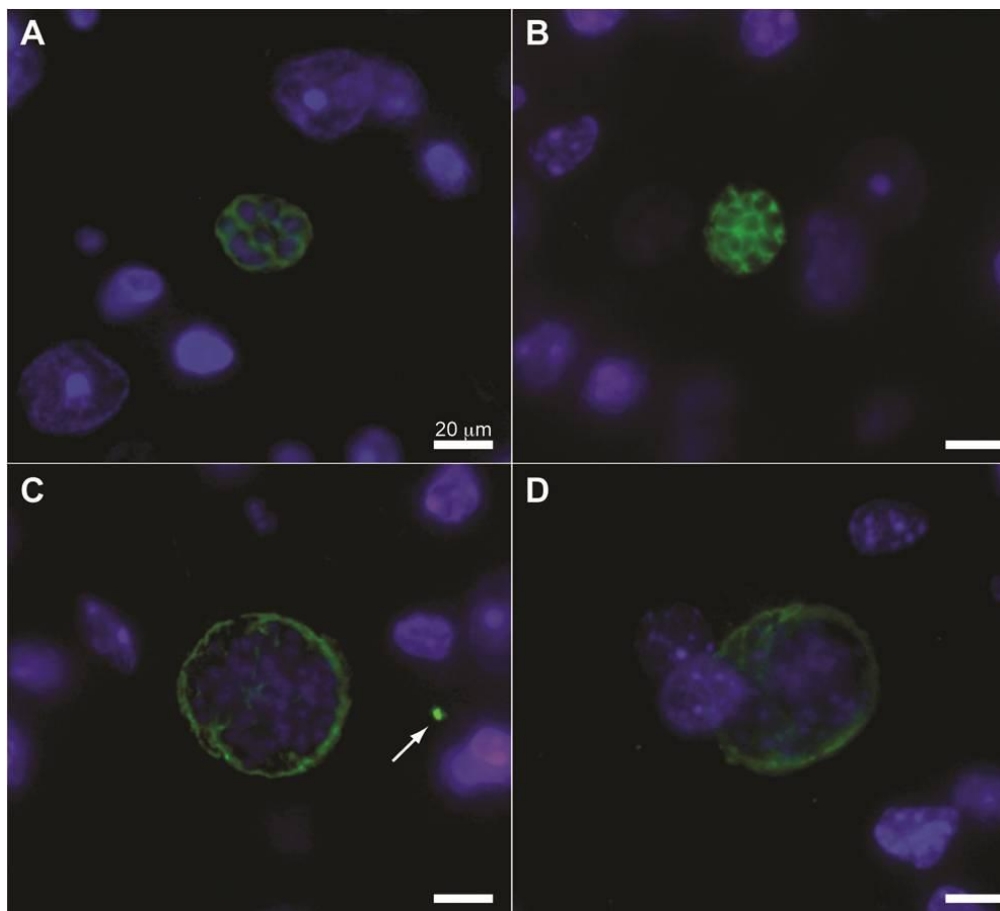


Figura 14: Imunohistoquímica para detecção de *T. gondii* em tecidos formolizados utilizando anticorpos IgY policlonais anti-STAg: Cortes desparafinados de cérebro de camundongos BALB/c cronicamente infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* foram incubados com anticorpos IgY policlonais anti-STAg e com anticorpos secundários anti-IgY conjugados com FITC. Foram detectados vacúolos parasitóforos, externamente marcados com FITC (verde brilhante); internamente verificou-se a presença de taquizoítos, com seu núcleo corado em azul pelo DAPI (A e B). Os anticorpos IgY anti-STAg foram capazes de reconhecer os antígenos da superfície externa da parede cística (C e D). Também foram marcados taquizoítas livres (C, seta).

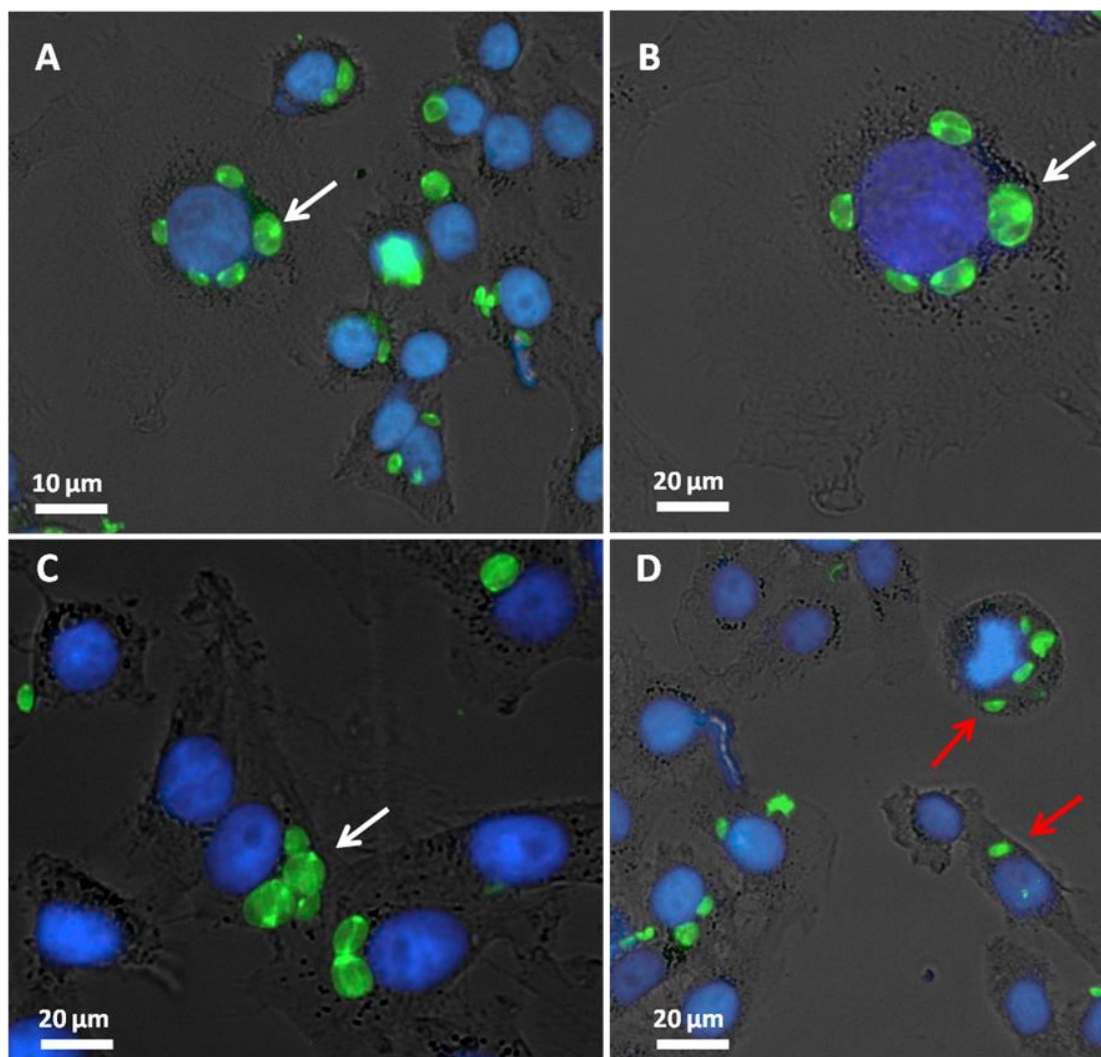


Figura 15: Imunocitoquímica para detecção de *T. gondii* em monocamadas de células HeLa utilizando IgY policlonal anti-STAg: Monocamadas de células HeLa foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH (MOI=1); na sequência, foram incubadas com anticorpos IgY policlonais anti-STAg, os quais foram detectados através de anticorpos secundários anti-IgY/FITC. Na composição das imagens a sobreposição das estruturas visualizadas por meio de contraste de fase e pelos canais de fluorescência verde e azul, permitiu observar no citoplasma das células HeLa, grupos de taquizoítas em processo de multiplicação, de cor verde brilhante (FITC), próximos ao núcleo corado de azul (DAPI) (A-C, setas), também parasitos isolados (D, setas). Adicionalmente, os anticorpos IgY marcaram de forma mais densa a extremidade dos taquizoítas, na região do complexo apical (B, seta).

5.2.2. Proteômica

Antígenos de STAg de *Toxoplasma gondii* com diferentes pesos moleculares e pontos isoelétricos (pI) foram reconhecidos pelos anticorpos IgY policlonais anti-STAg purificados no 42º dia PI. Os anticorpos IgY policlonais detectaram proteínas antigênicas de *T. gondii* com pI ácidos e básicos (Figura 12A). Proteínas com peso molecular aparente de 45kDa e pI variando de 5 a 9 foram reconhecidas, provavelmente isoformas do mesmo antígeno de STAg (Figura 12A, retângulo tracejado). Fenômeno semelhante foi verificado com alvos antigênicos de 30kDa e entre 60kDa e 70kDa (Figura 12A, retângulo tracejado). Aparentemente, os anticorpos IgY foram mais reativos para proteínas de 30kDa e 45kDa.

Os anticorpos IgG policlonais de camundongo reconheceram alvos antigênicos em *Toxoplasma gondii* com pI predominantemente ácidos (Figura 12B). Houve um reconhecimento das proteínas p30 do parasito. Além disso, proteínas antigênicas com massas moleculares de 50kDa a 90kDa, e pI próximo de 3, foram detectadas de maneira intensa. Comparativamente, os anticorpos IgG anti-STAg dos camundongos não reconheceram os antígenos de 45kDa (Figura 12B).

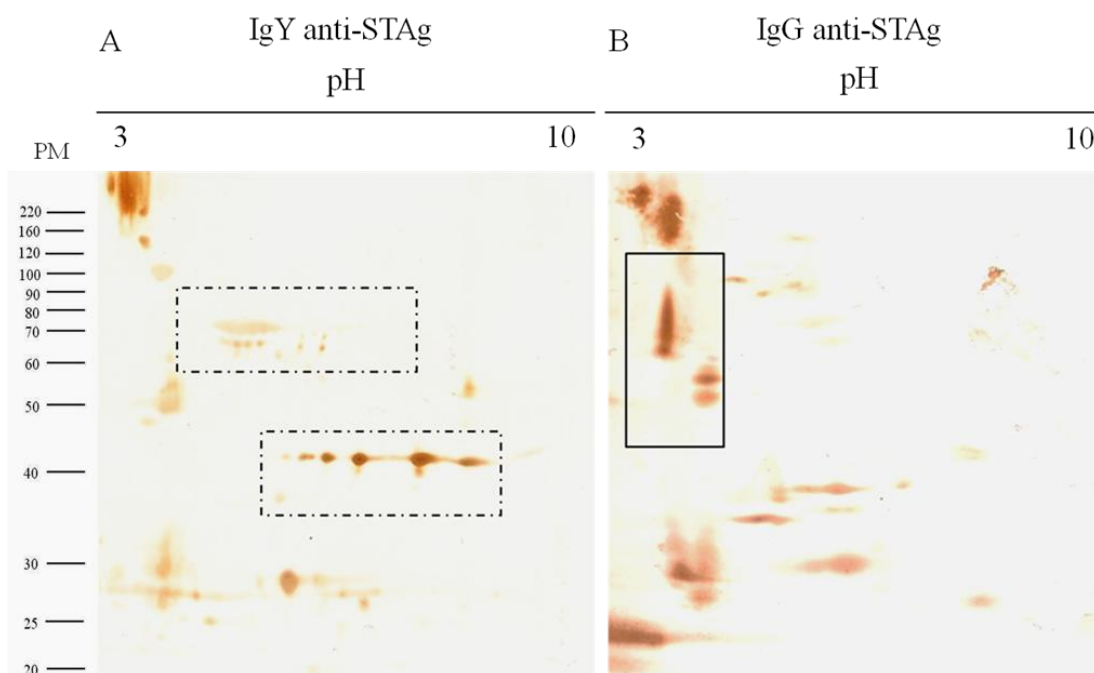


Figura 16: Western blot 2D de antígenos solúveis de *T. gondii* detectados por anticorpos policlonais de galinhas e camundongos: Antígenos solúveis de taquizoítos (STAg) de *T. gondii* foram separados de acordo com os pontos isoelétricos (pI, pH 3,0-10,0) e peso molecular (PM, BenchMark™ Protein Ladder 6-200 kDa) e incubados com anticorpos IgY e IgG policlonais anti-STAg. Ambos anticorpos primários reconheceram as proteínas antigênicas de 30kDa. Os anticorpos IgY detectaram antígenos de aproximadamente 45kDa e pI variando de 5 a 9 (retângulo tracejado, inferior), e também entre 60kDa e 80kDa e pI variando de ácido ao neutro (retângulo tracejado, superior). Os anticorpos IgG detectaram alvos antigênicos predominantemente ácidos e não reconheceram as proteínas de 45kDa. Por outro lado, os anticorpos IgG anti-STAg marcaram antígenos ácidos de peso molecular entre 50kDa e 90kDa.

5.2.3. Proteção frente a infecção

As células HeLa não infectadas não apresentaram emissão de fluorescência na citometria (Figura 13A). Por outro lado, o controle positivo demonstrou 25,9% de células positivas para fluorescência por CFSE (Figura 13B). O tratamento de cultivos celulares infectados com taquizoítos de *Toxoplasma gondii* com anticorpos IgY irrelevantes não apresentou diferenças no número de células HeLa emitindo fluorescência, quando comparadas ao controle positivo (Figura 13C).

A incubação das células HeLa infectadas, com concentrações crescentes de anticorpos IgY policlonais anti-STAg apresentou redução na porcentagem das células infectadas, quando comparado ao controle positivo, de maneira dose-dependente e na seguinte forma: (i) 1µg/mL: 20,7/25,9 (21%); (ii) 10µg/mL: 18,6/25,9 (28%); (iii) 100µg/mL: 16,7/25,9 (35%) (Figura 13D)..

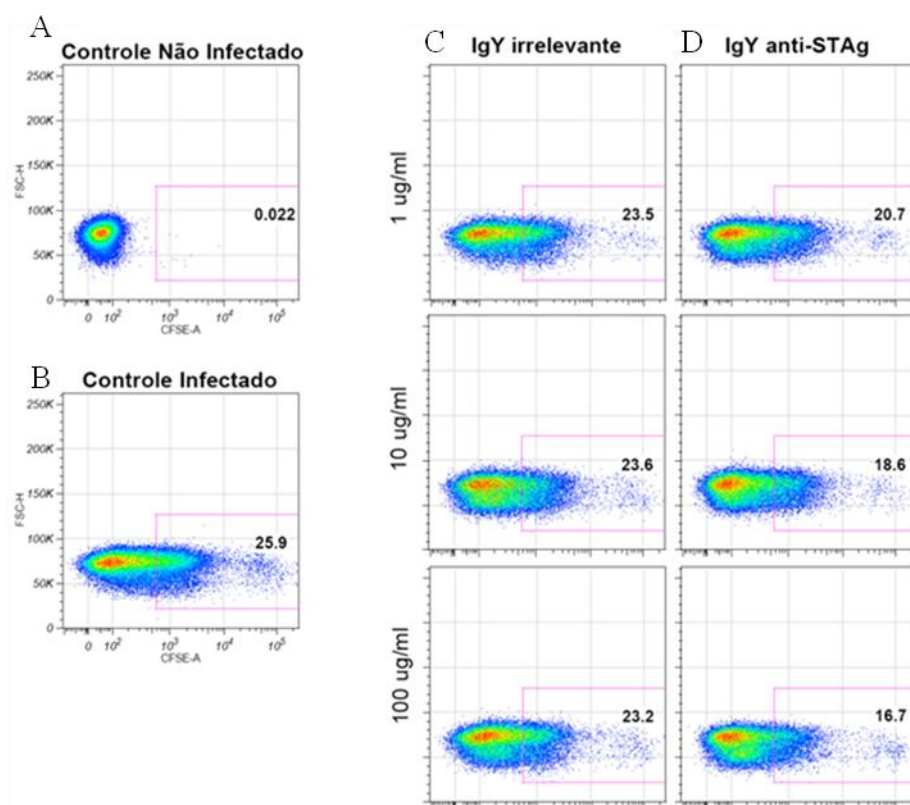


Figura 17: Avaliação da invasão celular por taquizoítos de *T. gondii* cultivados em presença de anticorpos IgY policlonal anti-STAg: Monocamadas de células HeLa (ATCC N° CCL-2) foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* da cepa RH marcados com *ester de carboxifluoresceína diacetato succinimidil* (CFSE) 5 μ M, utilizando *multiplicity of infection* (MOI) 1, depois foram tratadas com anticorpos IgY anti-STAg. As células não infectadas (A) não apresentaram emissão de fluorescência pelo CFSE, ao contrário do controle infectado (B) que demonstraram 25,9% das células fluorescentes. Os anticorpos IgY irrelevantes (C) não alteram a emissão de fluorescência em relação ao controle infectado. As células HeLa infectadas quando tratadas com IgY anti-STAg (D) apresentaram redução na fluorescência, em comparação com o controle de maneira dose-dependente: (i) 1 μ g/mL: 20,7/25,9 (21%); (ii) 10 μ g/mL: 18,6/25,9 (28%); (iii) 100 μ g/mL: 16,7/25,9 (35%).

6. Discussão

Neste estudo foram utilizadas galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* para a produção de anticorpos IgY policlonais anti-STAg. Anteriormente, LI et al. (1998) realizaram um estudo comparativo entre galinhas brancas da linhagem *Single Comb White Leghorn* e galinhas vermelhas da linhagem *Rhode Island Red* para a produção de anticorpos IgY específicos anti-albumina sérica bovina (BSA). Os autores demonstraram que a concentração de proteínas e a quantidade de anticorpos anti-BSA, para cada mL de gema pura, foi similar nas duas linhagens. CHALGHOUMI et al. (2008) utilizaram galinhas *Isa Brown* para a produção de anticorpos IgY policlonais contra antígenos de *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium* homogeneizados com adjuvante incompleto de Freund, obtendo simultaneamente e na mesma gema, anticorpos contra os dois antígenos. No mesmo estudo, constatou-se que a utilização de adjuvante de Freund não resultou em lesões no local das inoculações. As galinhas *Isa Brown* imunizadas com STAg mais adjuvante completo de Freund, não desenvolveram sinais inflamatórios perceptíveis no local das inoculações.

Galinhas poedeiras da linhagem *Darco Brown*, foram utilizadas por HASSL; ASPÖCK; FLAMM (1987), em um estudo com *Toxoplasma gondii*, que objetivou a comparação de anticorpos IgY e IgG de coelho, ambos policlonais e específicos contra *T. gondii*. Outros estudos, também envolvendo protozoários Apicomplexa, entre eles os modelos com *Plasmodium falciparum* e *Eimeria acervulina*; *E. maxima* e *E. tenella* empregaram galinhas de linhagens de cor branca para a produção de IgY específica, sem prejuízo na quantidade e na qualidade dos anticorpos IgY purificados (QU et al., 2011; LEE et al., 2009^a; LEE et al., 2009^b).

No presente estudo, a concentração proteica média de anticorpos IgY totais, das galinhas imunizadas com STAg mais adjuvante completo de Freund (ACF), foi de 4 mg/mL de gema pura. Na purificação dos anticorpos IgY, utilizou-se água acidificada para retirar a fração rica em lipídeos, e em seguida o sulfato de sódio para a precipitação dos anticorpos IgY. Em estudo anterior, MA e ZHANG (2010) imunizaram galinhas com lipopolissacarídeo (LPS) emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (AIF), e realizaram a extração dos anticorpos IgY através de água acidificada e sulfato de sódio e obtiveram 8,5 mg/mL de gema. LEE et al. (2002) inocularam galinhas com suspensões de bactérias Gram negativas, *Salmonella enteritidis* e *S. typhimurium*, diluídas em AIF, recuperando aproximadamente 7 mg de anticorpos total/mL de gema

pura. LU et al. (2012) imunizaram galinhas com antígenos totais de *Schistosoma japonicum* emulsionados com adjuvante completo de Freund (ACF) e extraíram 7,44 mg de IgY/mL de gema. QU et al. (2011) trabalharam com proteína recombinante de *Plasmodium falciparum* misturado com ACF e purificaram aproximadamente 100mg de anticorpos IgY/ovo, com 5% de anticorpos específicos. Possivelmente, o resultado de concentração proteica mais baixo, obtido neste estudo com os anticorpos IgY anti-STAg, pode estar ligado à condução dos procedimentos da etapa de remoção da fração lipídica, pois antes da centrifugação foi realizada uma etapa de filtragem em algodão hidrófilo. No que diz respeito à porcentagem de anticorpos específicos, é provável que os valores obtidos com STAg sejam semelhantes aos de outros trabalhos, pois utilizaram-se proteínas emulsionadas com adjuvantes de Freund (NAKANO et al., 1998; LEE et al., 2002; WANG et al., 2011; PAULY et al., 2009).

Normalmente, a imunização de galinhas pela via intramuscular, com antígenos proteicos e adjuvantes de Freund, é utilizada para a indução de anticorpos IgY policlonais (SCHADE et al., 1996; ARAÚJO et al., 2010; PARMA et al., 2011; QU et al., 2011; WEN et al., 2012). Entretanto, as reações inflamatórias locais são uma preocupação, embora nem sempre sejam observadas em galinhas. Entretanto, um efeito colateral frequente em galinhas é a queda transitória na produção de ovos durante o período de imunizações (HATTA et al., 1993; SCHWARZKOPF; THIELE, 1996; CHALGHOUMI et al., 2008). A distribuição do inóculo em locais diferentes reduz a inflamação local e pode evitar a redução na produção de ovos (SCHWARZKOPF; THIELE, 1996). Neste estudo foi verificada que a inoculação de adjuvantes mais PBS (grupo Controle) não resultou em processos inflamatórios locais que fossem perceptíveis, da mesma forma não houve queda na produção dos ovos além das expectativas. Aparentemente a imunização com antígenos solúveis de taquizoítos de *T. gondii* ou *N. caninum* pode afetar, transitoriamente, a postura de parte das galinhas. Pode ser aconselhável a utilização de mais de uma galinha nos experimentos para produção de anticorpos IgY anti-STAg e anti-NLA.

A determinação do momento em que há, na gema, as maiores concentrações de anticorpos IgY específicos, permite racionalizar as coletas e os procedimentos de purificação (BOLLEN et al., 1996; CHEN et al., 2002; SCHADE, 2005; CHALGHOUMI et al., 2008). Os resultados iniciais da concentração proteica média, das amostras de IgY obtidas após precipitação com sulfato de sódio, dos três grupos

(STAg; NLA e controle) foram semelhantes entre si, entretanto sofreram uma redução significativa após o primeiro *booster*, depois mantiveram-se estáveis até o final do experimento, mesmo tendo ocorrido a queda na postura durante o protocolo de imunizações. Verificou-se também, que o enriquecimento das amostras purificadas é maior na ausência da fração lipídica, pois provavelmente a elevada concentração destes compostos na gema, dificulta a solubilidade dos anticorpos IgY em água.

A detecção de anticorpos IgY na gema, ocorre com um atraso de aproximadamente sete dias, depois da detecção sérica dos anticorpos. Este fenômeno ocorre devido ao tempo requerido para o desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (PEI; COLLISSON, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008). Por outro lado, os anticorpos IgY podem desenvolver, precocemente, a maturação da avides, logo após a resposta imune primária (WOOLLEY; LANDON, 1995). Normalmente, para a avaliação da cinética de produção, especificidade e avides de anticorpos IgY são utilizados ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) e *Western blot* (GASSMANN et al., 1990; SHARMA, 1999; BRUJENI; GHARIBI, 2012; ZHANG et al., 2011^a; QU et al., 2011). No presente estudo, as quantidades de anticorpos IgY anti-STAg, estimadas através de Índice ELISA (IE), foram detectadas a partir do 21º dia pós-imunização primária (PI) e foram crescentes, ao longo do protocolo de imunização, independentemente da concentração proteica das amostras analisadas. O 42º dia PI, revelou a maior concentração de anticorpos específicos anti-STAg. No 49º dia PI houve queda na quantidade de anticorpos, este fenômeno foi observado em outros experimentos, nos quais, a reaplicação dos antígenos retornou as concentrações de anticorpos IgY para os níveis mais elevados (CHEN et al., 2002; PAULY et al., 2009).

A detecção dos antígenos proteicos de 30 kDa de *T. gondii*, através de anticorpos específicos de mamíferos, é um critério para a determinar a exposição do hospedeiro a este patógeno (MINEO et al., 2001; SAGER ET AL., 2003). No presente estudo, demonstrou-se que os anticorpos de galinhas imunizadas com STAg também reconhecem alvos antigênicos de 30kDa de *T. gondii*, e que essas proteínas do protozoário são as primeiras a serem detectadas pelos anticorpos IgY anti-STAg. Também verificou-se que os anticorpos IgY anti-STAg, mesmo após o tratamento com uréia 6M, conservaram reatividade residual para p30, logo após o primeiro *booster*.

De maneira complementar, no ensaio de *Western blot* 1-D, outros antígenos de STAg foram reconhecidos por anticorpos IgY específicos gerados na resposta imune

secundária e dotados de alta avides. Dentre os alvos antigênicos reconhecidos, pode-se especular que existam proteínas relacionadas com organelas secretórias do taquizoíto, denominadas roptrias, micronemas e grânulos densos, as quais participam na invasão da célula hospedeira viabilizando a formação da *moving junction* (MJ), além de auxiliarem no estabelecimento e composição do vacúolo parasitóforo (PV) (SOLDATI; DUBREMETZ; LEBRUN, 2001; HAKANSSON; CHARRON, SIBLEY, 2001; EL HAJJ et al., 2006; BRADLEY; SIBLEY, 2007; CARRUTHERS; TOMLEY, 2008). A hipótese de que anticorpos IgY policlonais, obtidos de galinhas imunizadas com STAg, podem reconhecer proteínas antigênicas secretadas a partir das organelas de complexo apical, possibilita o uso destes anticorpos em estudos de biologia e de virulência de *T. gondii* (YAMAMOTO et al., 2011; FENTRESS; SIBLEY, 2011) auxiliando no aperfeiçoamento do diagnóstico da toxoplasmose (WANG et al., 2011) ou o conhecimento dos mecanismos da interação parasito-hospedeiro (GREGG et al., 2011), como já acontece com outros patógenos (NERI et al., 2011; CAI et al., 2012; PALANIYAPPAN et al., 2012; BARTLEY et al., 2012). Além disso, a identificação de antígenos conservados entre os microrganismos Apicomplexa, que usualmente é feita por meio de anticorpos IgG obtidos de mamíferos, contribuem para o entendimento da evolução dos parasitas (HEHL et al., 2000; GAFFAR et al., 2004; SOHN et al., 2011; YANG et al., 2012) e também podem colaborar no desenvolvimento de imunógenos mais eficazes (QU et al., 2011; ROCCHI et al., 2011; CUI et al., 2012).

Anticorpos IgY policlonais tem se mostrado eficientes em estudos associados a fatores de virulência bacterianos (PARMA et al., 2011) e de protozoários (GARATE et al., 2005). Como as imunoglobulina Y apresentam resistência ao pH ácido ou à inativação proteolítica, desde que preparadas para esse fim (SCHADE, 2005; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012), essa possibilidade tem sido usada como uma estratégia em pesquisas com patógenos que possuem as vias mucosas como principal porta de entrada nos hospedeiros (LIOU et al., 2010; VEGA et al., 2011; WEN et al., 2012; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Recentemente, foi demonstrado que a administração continua de IgY específica a frangos de corte, por via oral, conferiu proteção parcial contra três espécies de *Eimeria* spp. (LEE et al., 2009^a; LEE et al., 2009^b). Na toxoplasmose, a ingestão de oocistos infectantes ou cistos teciduais são as formas mais frequentes de contágio para os diferentes hospedeiros (TENTER; HECKEROTH; WEISS, 2000). Os diferentes estágios evolutivos de *T. gondii* compartilham diversos antígenos conservados (FRITZ et al., 2012). Neste sentido, é

possível que anticorpos IgY contra antígenos específicos possam ser ferramentas interessantes para prevenção de infecção primária por via oral em hospedeiros definitivos e intermediários, já que a presença de anticorpos específicos, previamente à infecção, parece demonstrar um certo efeito protetor contra a toxoplasmose aguda (BEGHETTO et al., 2005; AZZOUZ et al., 2012).

A identificação de cistos teciduais de *T. gondii* denota a existência de infecção crônica pelo parasito, e uma das localizações preferenciais dos cistos é o tecido cerebral, estudos com cultivos celulares, nesse contexto anticorpos primários específicos são utilizados para detectar os estágios do parasito em cultivos celulares (SAHM et al., 1997; LÜDER, et al., 1999). Em estudo recente GUIMARÃES e colaboradores (2009) demonstraram a utilização de culturas primárias de células de músculo esquelético de camundongos na investigação da cistogênese de *T. gondii*, para tanto proteínas selecionadas de parede cística e de bradizoítos foram detectadas por meio de anticorpos anti-*T. gondii*. O uso de anticorpos IgY policlonais anti-STAg para detecção de formas de *T. gondii* em protocolos de imunohistoquímica e imunocitoquímica, demonstrou ser eficaz na marcação de diversas formas evolutivas do parasito, sendo possível evidenciar taquizoítos em cultivos celulares, também cistos teciduais e vacúolos parasitóforos em cortes histológicos de cérebro.

As galinhas se infectam com *T. gondii*, entretanto elas se mostram refratárias à ocorrência dos sinais clínicos da toxoplasmose (DUBEY, 2010). Na última década, a função de antígenos de *T. gondii* envolvidos na invasão e estabelecimento de parasitismo intracelular em mamíferos tem sido objeto de vários estudos (BUGULISKIS et al., 2010; FENTRESS et al., 2010; FENTRESS; SIBLEY, 2011; ONG; BOYLE; BOOTHROYD, 2011). Nesse contexto, a análise comparativa do perfil de reconhecimento de antígenos de *T. gondii*, entre galinhas e mamíferos, pode ser uma alternativa interessante para determinar mecanismos conservados ou não, que são utilizados pelo parasita para modular a resposta imune dos hospedeiros (ONG; BOYLE; BOOTHROYD, 2011; MORGADO et al., 2011). Os estudos nessa área são focalizados nos antígenos de superfície do parasito ou proteínas de excreção e secreção do protozoário (DZIADEK et al., 2009). Os protocolos mais comuns, usados para tal propósito, são a incubação do parasita com antissoro específico ou a geração de cepas geneticamente modificadas, prevenindo interações moleculares entre as proteínas do parasito e do hospedeiro (TYLER; BOOTHROYD, 2011; PSZENNY et al., 2012; AZZOUZ et al., 2012; SUBAUSTE, 2012). O desenvolvimento de anticorpos

específicos que se liguem a determinados antígenos de relevância para a virulência de *T. gondii* podem contribuir para a prevenção da invasão da célula hospedeira (BAUM; COWMAN, 2011). Os dados de inibição de invasão *in vitro* utilizando os IgY policlonais anti-STAg demonstraram que a adição de anticorpos após a incubação de taquizoítos com a monocamada de células HeLa, produz queda no percentual de células infectadas, e embora sejam eventos que ocorreram de maneira dose-dependente, os resultados podem ser amplificados se as galinhas fossem imunizadas com uma menor variedade de antígenos e os anticorpos IgY poderiam ser mais eficazes no bloqueio da invasão de células hospedeiras. Adicionalmente, o ensaio de *immunoblot-2D* apresentou diferenças entre o perfil de reconhecimento de proteínas antigênicas por anticorpos de galinhas e de camundongos, talvez anticorpos IgY produzidos contra antígenos, reconhecidos exclusivamente por galinhas, tenham alguma participação na resistência deste hospedeiro e no controle da virulência do protozoário.

7. Conclusões

- Anticorpos IgY policlonais anti-STAg são purificados da gema do ovo em grande quantidade, com elevada pureza por meio de técnicas de baixo custo, fácil execução e que preservam a estrutura do anticorpo;
- Galinhas imunizadas com adjuvante de Freund produzem anticorpos de avidéz moderada precocemente, e apresentam as maiores concentrações de anticorpos na gema após o segundo *booster*;
- Os anticorpos IgY anti-STAg detectam precocemente os principais antígenos do parasito;
- Os anticorpos IgY anti-STAg reconhecem de forma eficaz formas evolutivas distintas de *T. gondii* em cultivos celulares e em cortes histológicos;
- Os anticorpos IgY anti-STAg reconhecem antígenos distintos daqueles reconhecidos por anticorpos de mamíferos, sendo que tal reatividade diferencial possa ser melhor explorada no contexto de análise de virulência entre espécies resistentes e susceptíveis;
- Os anticorpos IgY anti-STAg bloqueiam parcialmente a proliferação de taquizoítos *in vitro*, demonstrando potencial para ser utilizado em protocolos de imunização passiva contra a infecção por *T. gondii*. .

8. Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th Edition. Saunders Elsevier Philadelphia, 566p.

AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of immunological methods**, n.160, v.2, p.207-214, 1993.

ALESSANDRO, R.; GALLO, A.; BARRANCA, M.; PRINCIPE, S.; TAVERNA, S.; DURO, G.; CASSATA, G.; BECCHI, M.; FONTANA, S.; DE LEO, G. Production of an egg yolk antibody against *Parietaria judaica* 2 allergen. **Poultry Science**, v.88, n.8, 1773-1778p., 2009.

AMARAL, J.A.; TINO DE FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.; CARBONARE, S.B. Anti-enteropathogenic *Escherichia coli* immunoglobulin Y isolated from eggs laid by immunised Leghorn chickens. **Research in Veterinary Science**, v.72, n.3, 229-234p., 2002.

ANGELONI, M.B.; SILVA, N.M.; CASTRO, A.S.; GOMES, A.O.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A. Apoptosis and S phase of the cell cycle in BeWo trophoblastic and HeLa cells are differentially modulated by *Toxoplasma gondii* strain types. **Placenta**, v.30, n.9, p.785-791, 2009.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; OSUNA, A.; LAWTON, P.; PÉTAVY, A.F. *Toxoplasma gondii*: identification and immune response against a group of proteins involved in cellular invasion. **Experimental Parasitology**, v.130, n.1., p.63-68, 2012.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M; JONES, J.L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C.C.; ORÉFICE, F.; ADDISS, D.G. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in North Rio de Janeiro State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.1, 55-63p., 2003.

BARTLEY, K.; HUNTLEY, J.F.; WRIGHT, H.W.; NATH, M.; NISBET, A.J. Assessment of cathepsin D and L-like proteinases of poultry red mite, *Dermanyssus gallinae* (De Geer), as potential vaccine antigens. **Parasitology**, v.6, 1-11 p., 2012.

BAUM, J.; COWMAN, A.F. Revealing a parasite's invasive trick. **Science Biochemistry**, v.333, n.6041, 410-411p., 2011.

BEGHETTO, E.; NIELSEN, H.V.; DEL PORTO, P.; BUFFOLANO, W.; GUGLIETTA, S.; FELICI, F.; PETERSEN, E.; GARGANO, N. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cyst. **The Journal of Infectious Diseases**, v.191, N.4, 637-645p., 2005.

BEHN, I.; HOMMEL, U.; OERTEL, M.; HAUSCHILDT, S. Kinetics of IgY formation after immunization of hens with different protein antigens. **ALTEX**, v.13, n.5, Suplemento 96, 18-21p., 1996.

BEHN, I.; HOMMEL, U.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; SCHADE, R.; SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C. Use of polyclonal avian antibodies. In: SHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk antibodies, production and application: IgY technology**. Springer-Verlag, Berlim, Alemanha, 255.p, 2001

BÉLA, S.R.; SILVA, D.A.; CUNHA-JÚNIOR, J.P.; PIROVANI, C.P.; CHAVES-BORGES, F.A.; REIS de CARVALHO, F.; CARRIJO de OLIVEIRA, T.; MINEO, J.R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.62, n.3, 245-254p., 2008.

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, n.3, 607-623p., 2000.

BLADER, I.J.; SAEIJ, J.P. Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. **APMIS**, v.117, n.5-6, 458-476p., 2009.

BOLLEN, S.L.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG: a comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of Immunological Methods**, v.191, n.2, 113-120p., 1996.

BOOTHROYD, J.C.; HEHL, A.; KNOLL, L.J.; MANGER, I.D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. **International Journal for Parasitology**, v.28, n.1, 3-9p., 1998.

BRADLEY, P.J.; SIBLEY, L.D. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. **Current Opinion in Microbiology**, v.10, n.6, 582-587p., 2007.

BRUJENI, N.G.; GHARIBI, D. Development of DNA-designed avian IgY antibodies for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* heat shock protein 70 (Hsp70) and anti-Hsp70 antibodies in the serum of normal cattle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2012, doi: 10.1007/s12010-012-9648-1.

BUGULISKIS, J.S.; BROSSIER, F.; SHUMAN, J.; SIBLEY, D. Rhomboid 4 (ROM4) affects the processing of surface adhesins and facilitates host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathogens**, v.6, n.4, e1000858, 2010

BUXTON, D.; MALEY, S.W.; WRIGHT, S.E.; RODGER, S.; BARTLEY, P.; INNES, E.A. *Toxoplasma gondii* and ovine toxoplasmosis: New aspects of an old story. **Veterinary Parasitology**, v.149, n.1-2, 25-28 p., 2007.

CAI, Y.C.; GUO, J.; CHEN, S.H.; TIAN, L.G.; STEINMANN, P.; CHEN, M.X.; LI, H.; AI, L.; CHEN, J.X. Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*. **Parasitology International**, 2012, doi: 10.1016/j.parint.2012.01.008.

CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. **Acta tropica**, v.81, n.2, 111-122 p., 2002.

CARRUTHERS, V.B.; TOMLEY, F.M. Microneme proteins in apicomplexans. **Subcellular Biochemistry**, v.47, 33-45p., 2008.

CHALGHOUNI, R.; THÉWIS, A.; PORTETELLE, D.; BECKERS, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. **Poultry Science**, v.87, n.1, 32-40p., 2008.

CHASSAIGNE, H.; TRÉGOAT, V.; NORGAARD, J.V.; MALEKI, S.J.; van HENGEL, A. Resolution and identification of major peanut allergens using a combination of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis, Western blotting and Q-TOF mass spectrometry. **Journal of Proteomics**, v.72, n.3, 511-526p., 2009.

CHE, F.Y.; MADRID-ALISTE, C.; BURD, B.; ZHANG, H.; NIEVES, E.; KIM, K.; FISER, A.; ANGELETTI, R.H.; WEISS, L.M. Comprehensive proteomic analysis of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Cellular Proteomics**, v.10, n.1, M110.000745, 2010.

CHEN, C.C.; TU, Y.Y.; CHEN, T.L.; CHANG, H.M. Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white lysozyme by immunoaffinity chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.19, 5424-5428p., 2002.

CUI, X.; LEI, T.; YANG, D.; HAO, P.; LI, B.; LIU, Q. *Toxoplasma gondii* immune mapped protein-1 (TgIMP1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. **Vaccine**, v.30, n.13, 2282-2287p., 2012 doi:10.1016/j.vaccine.2012.01.073

da COSTA-SILVA, T.A.; da SILVA MEIRA, C.; FRAZZATTI-GALLINA, N.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. *Toxoplasma gondii* antigens: recovery analysis of

tachyzoites cultivated in Vero cells maintained in serum free medium. **Experimental Parasitology**, v.130, n.4, 463-469p., 2012.

DAVISON, F.; MAGOR, K.E.; KASPERS, B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, Elsevier, San Diego, USA, 481p., 2008.

de PAULA, V.S.; da SILVA ADOS, S.; de VASCONCELOS, G.A; IFF, E.T.; SILVA, M.E.; KAPPEL, L.A.; CRUZ, P.B.; PINTO, M.A. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **Journal of Virological Methods**, v.171, n.1, 102-102p., 2011.

DECKERS, S.; BRAREN, I.; GREUNKE, K.; MEYER, N.; RÜHL, D.; BREDEHORST, R.; SPILLNER, E. Establishment of hapten-specific monoclonal avian IgY by conversion of antibody fragments obtained from combinatorial libraries. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v.59, n.pt1, 79-87p., 2009.

DELLACASA-LINDBERG, I.; FUKS, J.M.; ARRIGHI, R.B.; LAMBERT, H.; WALLIN, R.P; CHAMBERS, B.J.; BARRAGAN, A. Migratory activation of primary cortical microglia upon infection with *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.79, n.8, 3046-3052p., 2011.

DIAS da SILVA, W.; TAMBOURGI, D.V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, n.3-4, 173-180p., 2010.

DIAZ, S.L.; PADLER-KARAVANI, V.; GHADERI, D.; HURTADO-ZIOLA, N.; YU, H.; CHEN, X.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E.C; VARKI, A.; VARKI, N.M. Sensitive and specific detection of the non-human sialic acid N-Glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products. **PLoS One**, v.4, n.1, e4241, 2009 doi: 10.1371/journal.pone.0004241.

DING, J.; QIAN, W.; LIU, Q.; LIU, Q. Multi-epitope recombinant vaccine induces immunoprotection against mixed infection of *Eimeria* spp. **Parasitology Research**, doi: 10.1007/s00436-011-2764-y. 2011

DZIADEK, B.; GATKOWSKA, J.; BRZOSTEK, A.; DZIADEK, J.; DZITKO, K.; DLUGONSKA, H. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 e ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. **Experimental Parasitology**, v.123, n.1, 81-89p., 2009.

DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a water-borne zoonosis. **Veterinary Parasitology**, v.126, n.1-2, 57-72 p., 2004.

DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii* infections in chickens (*Gallus domesticus*): prevalence, clinical disease, diagnosis and public health significance. **Zoonoses Public Health**, v.57, n.1., 60-73p., 2010.

DUBEY, J.P.; JONES J.L. *Toxoplasma gondii* infection in human and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.11, 1257-1278 p., 2008.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America – Food Animal Practice**, v.22, n.3, p.645-671, 2006.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structure 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.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.2, p.323-367, 2007.

DUBEY, J.P.; VELMURUGAN, G.V.; CHOCKALINGAM, A.; PENA, H.F.; de OLIVEIRA, L.N.; LEIFER, C.A.; GENNARI, S.M.; BAHIA OLIVEIRA, L.M., SU.C.

Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* isolates from chickens from Brasil, **Veterinary Parasitology**, v.157, 299-305p., 2008.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M.L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YERA, H.; GONDON, E.; JANAUD, J.C.; THULLIEZ, P. Congenital toxoplasmosis and reinfection during pregnancy. Case report, strain characterization, experimental model of reinfection, and review. **The Journal of Infectious Disease**, n.199, v.2, p.280-285, 2009.

ERHARD, M.; SCHADE, R. Short introduction to hen's humoral immune system. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk: antibodies, production and application – Igy-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, p.255, 2001.

FENTRESS, S.J.; SIBLEY, L.D. The secreted kinase ROP18 defends *Toxoplasma's* border. **Bioessays**, v.33, n.9, p.693-700, 2011.

FENTRESS, S.J.; BEHNKE, M.S.; DUNAY, I.R.; MASHAYEKHI, M.; ROMMEREIM, L.M.; FOX, B.A.; BZIK, D.J.; TAYLOR, G.A.; TURK, B.E.; LICHTI, C.F.; TOWNSEND, R.R.; QIU, W.; HUI, R.; BEATTY, W.L.; SIBLEY, L.D. Phosphorylation of immunity-related GTPases by a *Toxoplasma gondii*-secreted kinase promotes macrophage survival and virulence. **Cell Host Microbe**, n.8, 484-495p., 2010.

FERREIRA DA SILVA MDA, F.; BARBOSA, H.S.; GROB, U.; LÜDER, C.G. Stress-related and spontaneous stage differentiation of *Toxoplasma gondii*. **Molecular Biosystem**, n.4, v.8, p.824-834, 2008.

FRANCO, P.S.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; GOMES, A.O.; SILVA, A.L; PENA, J.D.; MINEO, J.R.; FERRO, E.A 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, 2010.

FRITZ, H.M.; BOWYER, P.W.; BOGYO, M.; CONRAD, P.A.; BOOTHROYD, J.C. Proteomic analysis of fractionated *Toxoplasma* oocysts reveals clues to their environmental resistance. **PLoS One**, v.7, n.1, e29955, 2012.

GAFFAR, F.R.; YATSUDA, A.P.; FRANSSEN, F.F.; de VRIES, E. Erythrocyte invasion by *Babesia bovis* merozoites is inhibited by polyclonal antisera directed against peptides derived from a homologue of *Plasmodium falciparum* membrane antigen-1. **Infection and Immunity**, v.72, n.5, p.2947-2955, 2004.

GARATE, M.; CUBILLOS, I.; MARCHANT, J.; PANJWANI, N. Biochemical characterization and functional studies of *Acanthamoeba* mannose-binding protein. **Infection and Immunity**, v.73, n.9, p.5775-5781, 2005.

GASSMANN, M.; THÖMMES, P.; WEISER, T.; HÜBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.

GONDIM, L.S.; ABE-SANDES, K; UZÊDA, R.S.; SILVA, M.S.; SANTOS, S.L.; MOTA, R.A.; VILELA, S.M.; GONDIM, L.F. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.168, n.1-2, p.121-124, 2009. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.09.055.

GREGG, B.; DZIERSZINSKI, F.; TAIT, E.; JORDAN, K.A.; HUNTER, C.A.; ROSS, D.S. Subcellular antigen location influences T-cell activation during acute infection with *Toxoplasma gondii*. **PLoS One**, v.6, n.7, e22936p., 2011.

GUIMARÃES, E.V.; CARVALHO, L.; BARBOSA, H.S. Interaction and cystogenesis of *Toxoplasma gondii* within skeletal muscle cells *in vitro*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.2, p.170-174, 2009.

EL HAJJ, H.; DEMEY, E.; PONCET, J.; LEBRUN, M.; WU, B.; BALÉOTTI, N.; FOURMAUX, M.N.; MERCEREAU-PUJALON, O.; VIAL, H.; LABESSE, G.; DUBREMETZ, J.F. The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins:

proteomic and genomic characterization and molecular modeling. **Proteomics**, v.6, n.21, p.5773-5784, 2006.

HAKANSSON, S.; CHARRON, A.J.; SIBLEY, L.D. *Toxoplasma* evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. **The EMBO Journal**, v.20, n.12, p.3132-3144, 2001.

HASSL, A.; ASPÖCK, H.; FLAMM, H. Comparative studies on purity and specificity of yolk immunoglobulin Y isolated from eggs laid by hens immunized with *Toxoplasma gondii* antigen. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A**, v.267, n.2, p.247-253, 1987.

HATTA, H.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY". **Agricultural and Biological Chemistry**, v.54, n.10, p.2531-2535, 1990.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.57, n.3, p.450-454, 1993.

HE, X.L.; GRIGG, M.E.; BOOTHROYD, J.C.; GARCIA, K.C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**, v.9, n.8, p.606-610, 2002.

HEHL, A.B.; LEKUTIS, C.; GRIGG, M.E.; BRADLEY, P.J.; DUBREMETZ, J.F.; ORTEGA-BARRIA, E.; BOOTHROYD, J.C. *Toxoplasma gondii* homologue of *Plasmodium* apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cell. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p.7078-7086, 2000.

HERNÁNDEZ-CAMPOS, F.J.; BRITO-DE LA FUENTE, E.; TORRESTIANA-SÁNCHEZ, B. Purification of egg yolk immunoglobulin (IgY) by ultrafiltration: effect of pH, ionic strength, and membrane properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.1, p.187-193, 2010. DOI: 10.1021/jf902964s.

HILL, D.; DUBEY, J.P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.10, p.634-640, 2002.

HILL, D.E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J.P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**, v.6, n.1., p.41-61, 2005.

HORIE, K.; HORIE, N.; ADBOU, A.M.; YANG, J.O.; YUN, S.S.; CHUN, H.N.; PARK, C.K.; KIM, M; HATTA, H. Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans. **Journal of Dairy of Science**, v.87, n.12, p.4073-4079, 2004.

HUANG, X.; LI, J.; ZHANG, G.; GONG, P.; YANG, J.; ZHANG, X. *Toxoplasma gondii*: protective immunity against toxoplasmosis with recombinant actin depolymerizing factor protein in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v.130, n.3, p.218-222, 2012. doi:10.1016/j.exppara.2012.01.001

HUYNH, M.H.; HARPER, J.M.; CARRUTHERS, V.B.. Preparing for an invasion: charting the pathway of adhesion proteins to *Toxoplasma* micronemes. **Parasitology Research**, v.98, n.5, p.389-395, 2006.

INNES, E.A. The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. **Parasitology**, v.134, n.pt13, p.1903-1910, 2007.

INNES, E.A.; MATTSSON, J.G. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.23, n.2, p.43-44, 2006.

JUNG, C.; LEE, C.Y.; GRIGG, M.E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. **International Journal for Parasitology**, v.34, n.3, p.285-296, 2004.

KARANIS, P.; ALDEYARBI, H.M. Evolution of *Cryptosporidium* in vitro culture. **International Journal for Parasitology**, v.41, n.12, p.1231-1242, 2011.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H. LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p.341-348, 2004.

KASPER, L.H. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v.57, n.3, p.668-672, 1989.

KASPER, L.H.; CURRIE, K.M.; BRADLEY, M.S. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Immunology**, v.134, n.5, p.3426-3431, 1985.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. Kuby: **Immunology**, 6th edition. W.H. Freedman and Company, New York, 2007, 574p.

KOBAYASHI, C.; YOKOYAMA, H.; NGUYEN, S.V.; KODAMA, Y.; KIMATA, T.; IZEKI, M. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in *scid* mice. **Vaccine**, v.23, n.2, p.232-235, 2004.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.3, n.12, p.163-182, 2012.

KOWALCZYK, K.; DAISS, J.; HALPERN, J.; ROTH, T.F. Quantification of maternal-fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v.54, n.4, p.755-762, 1985.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LARSSON, A.; WEJAKER, P.; FORSBERG, P.; LINDAHL, T. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **Journal of Immunological Methods**, v.156, n.1, p.79-83, 1992.

LEE S.H.; LILLEHOJ, H.S.; PARK, D.W.; JANG, S.I.; MORALES, A.; GARCÍA, D.; LUCIO, E.; LARIOS, R.; VICTORIA, G.; MARRUFO, D.; LILLEHOJ, E.P. Induction of passive immunity in broiler chickens against *Eimeria acervulina* by hyperimmune egg yolk immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v.88, n.3, p.562-566, 2009^a.

LEE, S.H.; LILLEHOJ, H.S.; PARK, D.W.; JANG, S.I.; MORALES, A.; GARCÍA, D.; LUCIO, E.; LARIOS, R.; VICTORIA, G.; MARRUFO, D.; LILLEHOJ, E.P. Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.1-2, p.123-126, 2009^b.

LEE, E.N.; SUNWOO, H.H.; MENNINEN, K.; SIM, J.S. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurim*. **Poultry Science**, v.81, p.632-641, 2002.

LEI, J.H.; GUAN, F.; XU, H.; CHEN, L.; SU, B.T.; ZHOU, Y.; WANG, T.; LI, Y.L.; LIU, W.Q. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with *Schistosoma japonicum*. **Veterinary Parasitology**, 2012, doi: 10.1016/j.vetpar.2011.12.017.

LEU, S.J.; LEE, Y.C.; SHIH, N.Y.; HUANG, I.J.; LIU, K.J.; LU, H.F.; HUANG, S.Y.; YANG, Y.Y. Generation and characterization of anti- α -enolase single-chain antibodies in chicken. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.137, n.3-4, p.251-260, 2010.

LI, X.; NAKANO, T.; SUNWOO, H.H.; PAEK, B.H.; CHAE, H.S.; SIM, J.S. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poultry Science**, v.77, n.2, p.266-270, 1998.

LIOU, J.F.; CHANG, C.W.; TAILIU, J.J.; YU, C.K.; LEI, H.Y.; CHEN, L.R.; TAI, C. Passive protection effect of chicken egg yolk immunoglobulins on enterovirus 71 infected mice. **Vaccine**, v.28, n.51, p.8189-8196, 2010.

LITMAN, G.W.; RAST, J.P.; SHAMBLOTT, M.J.; HAIRE, R.N.; HULST, M.; ROESS, W.; LITMAN, R.T.; HINDS-FREY, K.R.; ZILCH, A.; AMEMIYA, C.T. Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. **Molecular Biology and Evolution**, v.10, n.1, p.60-72, 1993.

LU, Y.; XU, C.; MO, X.; CHEN, S.; FENG, Z.; WANG, X.; HU, W. Identification and profiling of circulating antigens by screening with the sera from schistosomiasis japonica patients. **Parasites and vectors**, v.5, 2012, online: doi:10.1186/1756-3305-5-115.

LÜDER, C.G.; GIRALDO-VELÁSQUEZ, M.; SENDTNER, M.; GROSS, U. *Toxoplasma gondii* in primary rat CNS cells: differential contribution of neurons, astrocytes, and microglial cells for the intracerebral development and storage differentiation. **Experimental Parasitology**, v.93, n.1, p.23-32, 1999.

MA, S.; ZHANG, Y. Preparation of immunoglobulin Y (IgY) against lipopolysaccharide using gel chromatography from the yolks of eggs laid by immunized hens. **The protein journal**, v.29, n.7, p.475-480, 2010.

MA, G.Y.; ZHANG, J.Z.; YIN, G.R.; ZHANG, J.H.; MENG, X.L.; ZHAO, F. *Toxoplasma gondii*: Proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. **Experimental Parasitology**, n.122, v.1, p.41-16, 2009.

McDONALD, V.; SHIRLEY, M.W. Past and future: vaccination against *Eimeria*. **Parasitology**, v.136, n.12, p.1477-1489, 2009.

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, n.2, p.283-287, 1980.

MINEO, J.R.; McLEOD, R.; MACK, D.; SMITH, J.; KHAN, I.A.; ELY, K.H.; KASPER, L.H. Antibodies to *Toxoplasmas gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. **The Journal of Immunology**, v.150, n.9, p.3951-3964, 1993.

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, p.239-245, 2001.

MORGADO, P.; ONG, Y.C.; BOOTHROYD, J.C.; LODOEN, M.B. *Toxoplasma gondii* induces B7-2 expression through activation of JNK signal transduction. **Infection and Immunity**, v.79, n.11, p.4401-4412, 2011.

MOURA, Mde .A.; AMENDOEIRAS, M.R.; BARBOSA, H.S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potential model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.6, p.862-864, 2009.

MULVEY, G.L.; DINGLE, T.C.; FANG, L.; STRECKER, J.; ARMSTRONG, G.D. Therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Clostridium difficile* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v.60, n.pt8, p.1181-1187, 2011.

NERI, P.; TOKORO, S.; KOBAYASHI, R.; SUGIYAMA, T.; UMEDA, K.; SHIMIZU, T.; TSUJI, T.; KODAMA, Y.; OGUMA, K.; MORI, H.; Specific egg yolk immunoglobulins as a new preventive approach for Shige-toxin-mediated diseases. **PLos One**, v.6, n.10, p.e26526, 2011.

NIKBAKHT BRUJENI, G.; JALALI, S.A.; KOOHI, M.K. Development of DNA-designed avian IgY antibodies for quantitative determination of bovine interferon-gamma. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.163, n.3, p.338-345, 2011.

ÓLAH, I.; VELVERDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K.A. **Avian Immunology**, 1st Edition. Elsevier, 481p., 2008.

ONG, Y.C.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Strain-dependent host transcriptional responses to *Toxoplasma* infection are largely conserved in mammalian and avian hosts. **PLos One**, v.6, n.10, p.e26369, 2011.

PALANIYAPPAN, A.; DAS, D.; KAMMILA, S.; SURESH, M.R.; SUNWOO, H.H. Diagnostics of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) nucleocapsid antigen using chicken immunoglobulin Y. **Poultry Science**, v.91, n.3, p.636-642, 2012.

PAN, Z.; JI, X.Y.; SHI, Y.M.; ZHOU, J.; HE, E.; SKOG, S. Serum thymidine kinase 1 concentration as a prognostic factor of chemotherapy-treated non-Hodgkin's lymphoma patients. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v.136, n.8, p.1193-1199, 2010.

PARMA, Y.R.; CHACANA, P.A.; ROGÉ, A.; KAHL, A.; CANGELOSI, A.; GEOGHEGAN, P.; LUCCHESI, P.M.A.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, n.58, n.4, p.380-388, 2011.

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, v.88, n.2, p.281-290, 2009.

PENA, H.F; GENNARI, S.M.; DUBEY, J.P.; SU, C. Population structure and mouse-virulence of *Toxoplasma gondii* in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v.38, n.5, p.561-569, 2008.

PFAFF, A.W.; ABOU-BACAR, A.; LETSCHER-BRU, V.; VILLARD, O.; SENEGAS, A.; MOUSLI, M; CANDOLFI, E. Cellular and molecular physiopathology of congenital toxoplasmosis: The dual role of IFN- γ . **Parasitology**, v.134, n.pt13, p.1895-1902, 2007.

PSZENNY, V.; DAVIS, P.H.; ZHOU, X.W.; HUNTER, C.A.; CARRUTHERS, V.B.; ROOS, D.S. Targeted disruption of *Toxoplasma gondii* serine protease inhibitor 1 increases bradyzoite formation in vitro and parasite tissue burden in mice. **Infection and Immunity**, v.80, n.3, p.1156-1165, 2012.

QU, J.X.; LIN, Y.H; MA, R.S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polypeptide proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. **Protein Expression and Purification**, v.75, n.2, p.225-229, 2011.

ROCCHI, M.S.; BARTLEY, P.M.; INGLIS, N.F.; COLLANTES-FERNANDEZ, E.; ENTRICAN, G.; KATZER, F.; INNES, E.A. Selection of *Neospora caninum* antigens stimulating bovine CD4+ve T cell responses through immuno-potency screening and proteomic approaches. **Veterinary Research**, v.42, n.1, p.91, 2011. doi: 10.1186/1297-9716-42-91

RORMAN, E.; ZAMIR, C.S.; RILKIS, I.; BEN-DAVID, H. Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection. **Reproductive Toxicology**, v.21, n.4, p.458-472, 2006.

ROSE, M.E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in the yolk and white. **European Journal of Immunology**, v.4, n.7, p. 521-523, 1974.

SAEIJ, J.P.; BOYLE, J.P.; BOOTHROYD, J.C. Differences among the three major strains of *Toxoplasma gondii* and their specific interactions with the infected host. **Trends in Parasitology**, v.21, n.10, p.476-481, 2005.

SAGER, H.; GLOOR, M.; TENTER, A.; MALEY, S.; HÄSSIG, M.; GOTTSTEIN, B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. **Parasitology Research**, n.91. p.171-174, 2003.

SAHM, M.; FISHER, H.G.; GROSS, U.; REITER-OWONA, I.; SEITZ, H.M. Cyst formation by *Toxoplasma gondii* *in vivo* and in brain-cell culture: a comparative morphology and immunocytochemistry study. **Parasitology Research**, v.83, n.7, p.659-665, 1997.

SANTANA, S.S.; SILVA, D.A.; VAZ, L.D.; PIROVANI, C.P.; BARROS, G.B.; LEMOS, E.M.; DIETZE, R.; MINEO, J.R.; CUNHA-JÚNIOR, J.P. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. **Immunology Letters**, v.143, n.2, p.193-201, 2012.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **ATLA**, v.33, n.2, p.129-154, 2005.

SCHADE, R.; STAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; van REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **ATLA**, v.24, 925-934p., 1996.

SCHNEIDER, W.J.; OSANGER, A.; WACLAWEK, M.; NIMPF, J. Oocyte growth in the chicken: receptors and more. *Biological Chemistry*, v.379, n.9-8, p.965-971, 1998.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity if alternative adjuvants in comparison to Freund's complete adjuvant. **ALTEX**, v.13, n.5, Suplemento 96, p.22-25, 1996.

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M. Immunisation. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chickens egg yolk antibodies, production and applications – IgY-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, 255p., 2001.

SCOTT, T.R. Our current understanding of humoral immunity of poultry. **Poultry Science**, n.83, p.574-579, 2004.

SHARMA, J.M. Introduction to poultry vaccines and immunity. **Advances in Veterinary Medicine**, v.41, p.481-494, 1999.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular Stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.56, n.2, p.270-274, 1992.

SHIN, S.J.; LEE, S.S.; MANNING, E.J.; COLLINS, M.T. Production of and applications for a polyclonal IgY diagnostic reagent specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. **The Journal of Microbiology**, v.47, n.5, p. 600-609, 2009.

SIBLEY, L.D.; KHAN, A.; AJIOKA, J.W.; ROSENTHAL, B.M. Genetic diversity of *Toxoplasma gondii* in animals and humans. **Phylosophical Transactions of The Royal Society B**, v.364, n.27, p.2749-2761, 2009.

SILVA, N.M.; LOURENÇO, E.V.; SILVA, D.A.; MINEO, J.R. Optimisation of cut-off titres in *Toxoplasma gondii* specific ELISA and IFAT in dog sera using immunoreactivity to SAG-1 antigens as a molecular marker of infection. **The Veterinary Journal**, v.163, n.1, p.94-98, 2002.

SILVA, D.A.O.; LOBATO, J.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. **Veterinary Parasitology**, v.143, n.3-4, p.234-244, 2007.

SOHN, C.S.; CHENG, T.T.; DRUMMOND, M.L.; PENG, E.D.; VERMONT, S.J.; XIA, D.; CHENG, S.J.; WASTLING, J.M.; BRADLEY, P.J. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. **PLoS One**, v.6, n.4, p.e18383, 2011.

SOLDATI, D.; DUBREMETZ, J.F.; LEBRUN, M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, v.31, n.12, p.1293-1302, 2001.

STAAK, C.; SCHWARZKOPF, C.; BEHN, I.; HOMMEL, U.; HLINAK, A.; SCHADE, R.; ERHARD, M. Isolation of IgY from Yolk. In: SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C. **Chicken egg yolk: antibodies, production and application – Igy-Technology**. Springer-Verlag, Berlin, 255p., 2001.

SUBAUSTE, C. Animal Models for *Toxoplasma gondii* infection. **Current Protocols in Immunology**. Cap.19, Unid. 19.3, p.1-23, 2012.

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H. Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.91, n.11, p.1956-1950, 2011. doi: 10.1002/jsfa.4381.

SULLIVAN W.J.JR; JEFFERS, V. Mechanisms of *Toxoplasma gondii* persistence and latency. **FMES Microbiology Reviews**, v.36, n. 3, p.717-733, 2012.

TENTER, A.M.; HECKEROTH, A.R.; WEISS, L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12-13, p.1217-1258, 2000.

THAM, W.H.; HEALER, J.; COWMAN, A.F. Erythrocyte and reticulocyte binding-like proteins of *Plasmodium falciparum*. **Trends in Parasitology**, v.28, n.1, p.23-28, 2012.

THARRINGTON, J.B.; CURTIS, P.A.; JONES, F.T.; ANDERSON, K.E. Comparison of physical quality and composition of eggs from historic strains of single comb white Leghorn chickens. **Poultry Science**, v.78, n.4, p.591-594, 1999.

TINI, M.; JEWELL, U.R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology**, v.131, n.3, p.569-574, 2002.

TREES, A.J.; WILLIAMS, D.J.L. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. **Trends in Parasitology**, v.21, n.12, p.558-561, 2005.

TYLER, J.S.; BOOTHROYD, J.C. The C-terminus of *Toxoplasma* provides the crucial link between AMA1 and the host-associated invasion complex. **PLoS Pathogens**, v.7, n.2, p. e1001282, 2011.

UNNO, A.; SUZUKI, K.; BATANOVA, T.; CHA, S.Y.; JANG, H.K.; KITO, K.; TAKASHIMA, Y. Visualization of *Toxoplasma gondii* stage conversion by expression of stage-specific dual fluorescent proteins. **Parasitology**, v.136, n.6, p.579-588, 2009.

VEGA, C.; BOK, M.; CHACANA, P.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F.; PARRENÓ, V. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.142, n.3-4, p.156-169, 2011.

VIRREIRA WINTER, S.; NIEDELMAN, W.; JENSEN, K.D.; ROSOWSKI, E.E.; JULIEN, L.; SPOONER, E.; CARADONNA, K.; BURLEIGH, B.A.; SAEIJ, J.P.J.; PLOEGH, H.L.; FRICKEL, E.M. Determinants of GBP recruitment to *Toxoplasma gondii* vacuoles and the parasitic factors that control it. **PLoS One**, v.6, n.9, p.e24434, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0024434.

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology Advances**, v.29, n.6, p.860-868, 2011.

YAGUCHI, K.; OHGITANI, T.; NORO, T.; KANESHIGE, T.; SHIMIZU, Y. Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. **Avian Disease**, v.53, n.2, p.245-249, 2009.

YAMAMOTO, M.; MA, J.S.; MUELLER, C.; KAMIYAMA, N.; SAIGA, H.; KUBO, E.; KIMURA, T.; OKAMOTO, T.; OKUYAMA, M.; KAYAMA, H.; NAGAMUNE, K.; TAKASHIMA, S.; MATSUURA, Y.; SOLDATI-FAVRE, D.; TAKEDA, K. ATF6 β is a host cellular target of the *Toxoplasma gondii* virulence factor ROP18. **The Journal of Experimental Medicine**, v.208, n.7, p.1533-1546, 2011.

YANG, Y.S.; MURCIANO, B.; MOUBRI, K.; CIBRELUS, P.; SCHETTERS, T.; GORENFLOT, A.; DELBECQ, S.; ROUMESTAND, C. Structural and functional characterization of BC28.1, the major erythrocyte binding protein *Babesia canis*

merozoite surface. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.12, p.9495-9508, 2012, 2012. doi:10.1074/jbc.M111.260745;

WANG, Y.H.; LI, X.R.; WANG, G.X.; YIN, H.; CAI, X.P.; FU, B.Q.; ZHANG, D.L. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens. **Parasitology International**, v.60, n.1, p.105-107, 2011.

WARR, G.W.; MAGOR, K.E.; HIGGINS, D.A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v.16, n.8, p.392-398, 1995.

WEN, J.; ZHAO, S.; HE, D.; YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, S. Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus. **Antiviral Research**, v.93, n.1, p.154-159, 2012.

WEST, A.P. Jr; HERR, A.B.; BJORKMAN, P.J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. **Immunity**, v.20, n.5, p.601-610, 2004.

WOOLLEY, J.A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods**, v.178, n.2, p.253-265, 1995.

ZHANG, Y.W.; HALONEN, S.K.; MA, Y.F.; TANOWTIZ, H.B.; WEISS, L.M. A purification method of enrichment of the *Toxoplasma gondii* cyst wall. **Journal of Neuroparasitology**, 2010, doi:10.4303/jnp/N101001.

ZHANG, H.; LEE, E.G.; KAWANO, S.; HUANG, P.; LIAO, M.; KAWASE, O.; ZHANG, G.; ZHOU, J.; FUJISAKI, K.; NISHIKAWA, Y.; XUAN, X. Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. **Parasitology Research**, v.109, n.3, p.899-911, 2011^a.

ZHANG, M.J.; YANG, J.; ZHU, C.Z.; DUAN, Z.M.; NIU, X.L. Generation and application of anti-ouabain IgY antibodies. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.358, n.1-2, p.241-247, 2011^b.

ZHEN, Y.H.; JIN, L.J.; GUOL, J.; LI, X.Y.; LI, Z.; FANG, R.; XU, Y.P. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.5, p.1529-1535, 2008.