



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Laboratório de Imunoparasitologia



**Isótipos de anticorpos específicos a *Toxoplasma gondii* presentes em amostras de leite humano: uma ferramenta para o diagnóstico de toxoplasmose aguda**

**Ana Carolina de Moraes Oliveira**

**Uberlândia – MG  
Setembro – 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Laboratório de Imunoparasitologia



**Isótipos de anticorpos específicos a *Toxoplasma gondii* presentes em amostras de leite humano: uma ferramenta para o diagnóstico de toxoplasmose aguda**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas como  
parte de obtenção do título de Mestre

**Ana Carolina de Moraes Oliveira**

*Prof. Dr. José Roberto Mineo*  
Orientador

*Prof. Dra. Vânia Olivetti Steffen Abdallah*  
Coorientadora

**Uberlândia – MG**  
**Setembro – 2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

- O48i  
2013      Oliveira, Ana Carolina de Moraes, 1989-  
             Isótipos de anticorpos específicos a *Toxoplasma gondii* presentes  
             em amostras de leite humano: uma ferramenta para o diagnóstico de  
             toxoplasmose aguda / Ana Carolina de Moraes Oliveira. – 2013.  
             82 p. : il.
- Orientador: José Roberto Mineo.  
             Coorientador: Vânia Olivetti Steffen Abdallah.  
             Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
             Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
             Inclui bibliografia.
1. Imunologia - Teses. 2. Toxoplasmose - Teses. 3. *Toxoplasma*  
             *gondii* - Teses. I. Mineo, José Roberto. II. Abdallah, Vânia Olivetti  
             Steffen. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
             Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017

*"Nós podemos ter qualquer coisa que escolhermos.  
Não me importo com o tamanho do desafio."  
John Assaraf*

*"Dê o primeiro passo na fé. Você não precisa ver a  
escada inteira. Apenas dê o primeiro passo."  
Martin Luther King Jr.*



*Agradecimentos*

*A Deus, por ter me concedido sabedoria, força e perseverança para concluir mais esta etapa tão importante da minha vida profissional.*

*Aos meus pais Airton e Angela, e a meu irmão Augusto, pelo amor incondicional, pelo apoio inigualável e pelo incentivo incessante para que eu iniciasse e concluísse mais esse sonho. Agradeço profundamente à minha mãe pela dedicação e pela ajuda especial e fundamental para realização deste trabalho.*

*Ao meu noivo Murilo, pelo amor e carinho, pelo incentivo e apoio, e pela compreensão nos momentos de ausência.*

*Ao Prof. Dr. José Roberto, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de imunoparasitologia, pelos ensinamentos que vou carregar para sempre na minha carreira científica, e principalmente pela confiança em mim depositada.*

*À Prof. Dra. Vânia, por ter aceitado me coorientar com tanta dedicação e carinho, por todo conhecimento transmitido, e pelo grande auxílio durante o contato com as pacientes do estudo.*

*Ao Prof. Dr. Tiago, pelo conhecimento transmitido, pela disposição e pelo tempo despendido para me ajudar.*

*À Dra. Deise, que me auxiliou com o seu generoso e grandioso conhecimento.*

*A todos os amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, pela amizade, por todos os momentos partilhados, pelas boas risadas, e pela imensa ajuda durante a fase experimental. Agradeço especialmente à Hellen, ao Fernando, à Caroline e ao Arlindo, que me ajudaram diretamente e intensamente em todas as etapas do trabalho.*

*Aos funcionários do Laboratório de Imunologia: Max, Ana Cláudia, Marley, Zilda e Edilge, que auxiliaram para a viabilização deste trabalho.*

*Às funcionárias do Banco de Leite e do Lactário do HC-UFU, que carinhosamente contribuíram para que as coletas de leite humano fossem realizadas com sucesso.*

*À Dra. Cristina Guimarães, neonatologista do HC-UFU que atenciosamente atendeu todos os recém-nascidos que apresentavam risco de ter adquirido toxoplasmose congênita.*

*Às secretárias do Programa de Imunologia e Parasitologia Aplicadas: Lucileide e Lucélia, pela eficiência e pronto atendimento em ajudar em tudo que fosse necessário.*

*A meus chefes Dra. Marlene e Dr. Alexandre, pelo incentivo científico e por proporcionarem flexibilidade ao meu horário de trabalho, tornando possível a conclusão do mestrado.*

*A todos meus familiares e verdadeiros amigos, pelas alegrias vividas e compartilhadas, pelas orações e pela palavra de conforto e motivação nos momentos de dificuldade e desânimo.*

*A todas pacientes que colaboraram para a execução deste trabalho.*

***Todos vocês foram fundamentais durante essa jornada! Muito obrigada!***

## RESUMO

Toxoplasmose é uma zoonose causada pelo parasita intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii*, que infecta diversas espécies, incluindo mais de um terço da população humana mundial e pode causar danos severos ao feto na infecção congênita. A amamentação é a forma natural e segura de alimentar o recém-nascido, com capacidade de proporcionar o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do neonato. Todas as classes de imunoglobulinas estão presentes no leite humano, principalmente no colostro, as quais podem ser de fonte sistêmica e local. Diversos estudos documentaram que a amamentação protege a criança contra várias doenças, mas poucos esforços tem sido direcionados para identificar a ação protetora do leite humano contra doenças parasitárias, inclusive *T. gondii*. Devido à importância da amamentação e à alta prevalência de toxoplasmose, o objetivo desse estudo foi detectar e avaliar a presença de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* presentes em amostras pareadas de soro e colostro humano. Foram incluídas neste estudo 289 puérperas do Hospital de Clínicas da UFU (média de idade: 24,8 anos, intervalo: 14-43 anos). As amostras foram analisadas pelos imunoenaios ELISA e *Immunoblotting* contra antígenos solúveis de *T. gondii*. O ELISA teve reatividade para IgG, IgM e IgA específicos, respectivamente, em 136 (47,9%), 20 (6,9%), 8 (2,8%) das amostras de soro e em 133 (46,0%), 23 (7,9%), 8 (2,8%) das amostras de colostro. Também foi observada correlação significativa entre os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* das amostras de soro e colostro. O *Immunoblotting* mostrou que foi possível detectar os três isótipos de anticorpos específicos a diferentes antígenos de *T. gondii* em ambas amostras. Anticorpos IgG presentes em amostras de soro e colostro reconheceram mais frações antigênicas comparado com IgM e IgA. IgG sérica detectou mais frações antigênicas do que anticorpos IgG presentes no colostro da mesma paciente. Em contraste, IgA específica presente no colostro reconheceu maior número de antígenos do que IgA presente em amostras de soro da mesma paciente. Adicionalmente, mostramos que a fração de 60 kDa pode ser um bom marcador de diagnóstico para infecção aguda, pois ela foi reconhecida frequentemente por anticorpos IgG de baixa avididade de ambas amostras; e a fração de 39 kDa pode ser um marcador de diagnóstico de toxoplasmose congênita. Nossos resultados demonstraram uma associação significativa entre anticorpos específicos a *T. gondii* presentes em amostras de soro e leite, evidenciando que é possível diagnosticar toxoplasmose usando leite humano, uma forma não invasiva de obter amostra biológica.

**Descritores:** *Toxoplasma gondii*, anticorpos, colostro.



## ABSTRACT

Toxoplasmosis is a zoonosis caused by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*, which infects different hosts including up to a third of the world's human population and may cause severe damage to the fetus in congenital infection. Maternal breastfeeding is the most natural and safe way to feed a newborn, with the ability to provide good development of the infant's immune system. All immunoglobulin isotypes are present in human breast milk, mainly in the colostrum, with systemic or local source. There are several pieces of evidence showing that breastfeeding protects the infant against a wide range of diseases, but few efforts have been directed to identifying the protecting action of human milk against parasitic infections, including *T. gondii*. Due to the importance of breastfeeding and to the high prevalence of toxoplasmosis, this study was conducted in order to detect and evaluate the presence of specific *T. gondii* IgG, IgM and IgA antibodies in paired serum and colostrum samples. The study was carried out on 289 puerperal women from Clinical Hospital of Universidade Federal de Uberlândia (mean age 24.8 years, range 14 – 43 years). Their serum and colostrum samples were analyzed by ELISA and immunoblotting assays against soluble antigens from *T. gondii*. ELISA tests showed reactivity for anti-*T. gondii* IgG, IgM and IgA, respectively, in 136 (47.0%), 20 (6.9%), 8 (2.8%) serum samples and in 133 (46.0%), 23 (7.9%), 8 (2.8%) colostrum samples. Also, it was observed significant correlation rates between anti-*T. gondii* antibodies levels in serum and colostrum samples. Immunoblotting assays showed that it was possible to detect IgG, IgM and IgA antibodies specific to different antigens of *T. gondii* in serum as well as colostrum. IgG present in serum and colostrum recognized more antigenic fractions compared to the IgM and IgA, and seric IgG always detected more antigenic fractions than IgG in colostrum from the same patient. In contrast, specific IgA antibodies present in colostrum recognized a higher number of antigens than IgA present in serum from the same patient. Furthermore we have shown that 60 kDa antigenic fraction may be a good marker to diagnose acute toxoplasmosis infection, because it was recognized frequently by low avidity IgG antibodies in both samples; and 39 kDa antigenic fraction may be a marker to diagnose congenital toxoplasmosis. Our results showed a significant association between *T. gondii*-specific antibodies present in serum and in milk samples from the patients, demonstrating that it is possible to diagnose toxoplasmosis using human milk, a noninvasive way to obtain biological samples.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, antibodies, colostrum.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis-3 etilbenzotiazolino-6 sulfônico (2,2'- <i>azinobis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid</i> )
<b>B</b>	Branco
<b>C-</b>	Controle negativo
<b>C+</b>	Controle positivo
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>Cepa RH</b>	Cepa altamente virulenta de <i>T. gondii</i>
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>dL</b>	Decilitros (unidade de volume)
<b>DO</b>	Densidade óptica
<b>ELISA</b>	Ensaio Imunoenzimático ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b><i>g</i></b>	Força relativa da gravidade
<b>GALT</b>	Tecido linfoide associado ao intestino
<b>gm</b>	Média geométrica
<b>HC-UFU</b>	Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia
<b>HeLa</b>	Linhagem de células imortalizadas obtidas de um adenocarcinoma cervical, coletadas em 1951 de Henrietta Lacks
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>HTLV</b>	Vírus T-linfotrópico humano
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IA</b>	Índice avidez
<b>IE</b>	Índice ELISA
<b>IgA</b>	Imunoglobulina da classe A
<b>IgD</b>	Imunoglobulina da classe D
<b>IgE</b>	Imunoglobulina da classe E
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina da classe M
<b>Int Band</b>	Intensidade em pixels
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliampère
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal

<b>med</b>	Mediana/intervalo
<b>mg</b>	Miligramas (unidade de peso)
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>mL</b>	Mililitros (unidade de volume)
<b>mm</b>	Milímetros
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>p</b>	Probabilidade
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada com fosfatos
<b>PBS-T</b>	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05%
<b>PBS-T-M1%</b>	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05% e 1% de leite em pó desnatado
<b>PBS-T-M5%</b>	Solução salina tamponada com fosfatos contendo Tween 20 a 0,05% e 5% de leite em pó desnatado
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>r</b>	Índice de correlação de Spearman
<b>RPMI</b>	Meio de cultura desenvolvido no <i>Roswell Park Memorial Insitute</i> (1969)
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
<b>sIgA</b>	Imunoglobulina A secretória
<b>STAg</b>	Antígenos solúveis de taquizoítas de <i>T. gondii</i>
<b>UFU</b>	Universidade Federal de Uberlândia
<b>UI</b>	Unidades internacionais
<b>vs</b>	<i>Versus</i>
<b>µg</b>	Micrograma

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** ELISA para a detecção dos isótipos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro e colostro humano de 289 puérperas de Uberlândia, MG, Brasil. 39
- Tabela 2.** Número (n) e porcentagem (%) de amostras de soro e colostro de puérperas, de acordo com a associação entre os três isótipos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii*, mensurados por ELISA. 45

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, determinados por índice ELISA (IE), em amostras de soro e colostro de 289 puérperas. A linha tracejada representa o valor do cut-off (IE=1,2). \*\*\* Dados estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon). 40
- Figura 2.** Correlação entre níveis de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos a *T. gondii* presentes em amostras de soro e colostro de 289 puérperas. Coeficientes de correlação foram calculados pelo teste de correlação de Spearman. 42
- Figura 3.** Correlação entre os níveis dos isótipos de anticorpos específicos a *T. gondii* presentes em amostras de soro (A, C, E) e colostro (B, D, F) de 289 puérperas. Coeficientes de correlação foram calculados pelo teste de correlação de Spearman. 43
- Figura 4.** *Immunoblotting* representativo realizado com antígeno solúvel de *T. gondii* para a detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos ao parasito em amostras de soro e colostro de puérperas. Peso molecular (kDa) mostrado ao lado esquerdo. C+ controle positivo, C- controle negativo, B branco. 47
- Figura 5.** Frequências (%) de reconhecimento de frações antigênicas (kDa) de *T. gondii* por anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) presentes em amostras de soro e colostro de puérperas. 49
- Figura 6.** Esquema do *Immunoblotting* referente à frequência (%) de reconhecimento das frações antigênicas de *T. gondii* pelos isótipos IgG, IgM e IgA em amostras de soro e colostro de puérperas. T: Todas as frações antigênicas detectadas na amostra. O peso molecular aparente da fração proteica é mostrado à esquerda. Cores diferentes representam densidade de pixels diferentes. 50
- Figura 7.** *Immunoblotting* de IgG avidez representativo realizado com antígeno solúvel de *T. gondii* e amostras de soro e colostro de puérperas. Peso molecular (kDa) mostrado ao lado esquerdo. 1 e 2 tiras da membrana incubadas com amostra de soro e, respectivamente, não tratadas ou tratadas com ureia 6M. 3 e 4 tiras da membrana incubadas com amostra de colostro e, respectivamente, não tratadas ou tratadas com ureia 6M. C+ controle positivo, C- controle negativo, B branco. 52
- Figura 8.** Avidez de anticorpos IgG a frações antigênicas de *T. gondii* em amostra de soro e colostro humano de puérperas, valores em índice avidez (IA). A Avidez média das frações antigênicas. B Frequências das frações antigênicas reconhecidas com baixa avidez (IA<50%). C Frequências das frações antigênicas reconhecidas com alta avidez (IA>75%). 53

*Sumário*

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i> e toxoplasmose.....	16
1.2. Mecanismos imunológicos da toxoplasmose .....	18
1.3. Aleitamento materno e leite humano.....	20
1.4. Toxoplasmose e amamentação.....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
4.1. Aspectos éticos.....	30
4.2. Pacientes .....	30
4.3. Amostras de leite humano.....	30
4.4. Amostras de sangue.....	31
4.5. Manutenção e obtenção de <i>T. gondii</i> .....	31
4.6. Preparo de antígenos solúveis de <i>T. gondii</i> .....	32
4.7. Ensaio imunoenzimático.....	33
4.7.1. ELISA indireto para detecção de IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	33
4.7.2. ELISA de captura para detecção de IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> .....	34
4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) .....	34
4.9. <i>Immunoblotting</i> .....	35
4.10. <i>Immunoblot</i> -avidez para anticorpos IgG anti- <i>T. gondii</i> .....	36
4.11. Análise estatística .....	36
4.12. Normas de biossegurança .....	37
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1. Detecção de anticorpos em amostras de soro e colostro de puérperas .....	39
5.2. Correlação entre os níveis de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro e colostro .....	41
5.3. Associações entre IgG, IgM e IgA anti- <i>T. gondii</i> em amostras de soro e colostro .....	44
5.4. Detecção de frações antigênicas de <i>T. gondii</i> por anticorpos IgG, IgM e IgA específicos.....	46

5.5. Avidéz de anticorpos IgG à frações antigênicas de <i>T. gondii</i> .....	51
5.6. Assistência e acompanhamento clínico .....	54
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>63</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>81</b>





## *1. Introdução*

### 1.1. *Toxoplasma gondii* e toxoplasmose

O protozoário *Toxoplasma gondii* é um parasita intracelular obrigatório que tem capacidade de invadir e se replicar em quase toda célula nucleada, e acomete ampla faixa de hospedeiros, incluindo humanos, animais domésticos e aves, sendo o agente causal de uma das mais comuns zoonoses parasitárias, a toxoplasmose (TENTER; HECKEROTH; WEISS; 2000, MONTOYA; LIESENFELD, 2004). Os felídeos são os hospedeiros definitivos e únicos animais onde ocorre o estágio sexual do parasita (TENTER, 1999).

*T. gondii* pertence ao filo Apicomplexa, caracterizado pela presença do complexo apical composto por duas organelas secretórias especializadas chamadas micronemas e roptrias, as quais permitem o reconhecimento e adesão inicial do parasita à célula hospedeira e sua penetração posterior, respectivamente (BESTEIRO; DUBREMETZ; LEBRUN, 2011, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

O ciclo de vida desse protozoário consiste de uma fase sexuada em seu hospedeiro definitivo, os felídeos, e de uma assexuada em seus hospedeiros intermediários, que são a maioria dos animais, inclusive o ser humano (SOUZA et al., 2010, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011). Estão presentes no ciclo evolutivo do parasito, três formas infectantes, uma forma de multiplicação rápida da fase aguda chamada taquizoíta, uma forma de multiplicação lenta de baixo metabolismo, encontrada dentro de cistos teciduais na fase crônica, chamada bradizoíta, e uma forma encontrada nos oocistos chamada esporozoíta. Devido à ação do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas diferenciam-se em bradizoítas, que formam os cistos teciduais (SOUZA et al., 2010).

A fase sexuada do ciclo tem início com a ingestão de cistos teciduais através do carnivorismo dos felídeos. Após a ingestão, vários ciclos complexos sucedem-se até a geração

de micro e macro gamontes, de cuja fusão resultam oocistos que são eliminados com as fezes do hospedeiro e disseminados no ambiente. A fase assexuada tem início com a ingestão de oocistos, pelos hospedeiros intermediários, através de água ou alimentos contaminados, de forma que os esporozoítas são liberados no aparelho digestivo do hospedeiro que, então, infectam células epiteliais do intestino, dando origem aos taquizoítas da fase aguda da infecção (DUBEY, 1998, SOUZA et al., 2010). O desenvolvimento de cistos teciduais em vários locais do corpo define a fase crônica do ciclo assexuado. Uma vez que o parasita é capaz de atravessar a barreira epitelial do intestino, ele dissemina por todo o corpo e encista no cérebro, músculos, placenta ou olho, onde podem permanecer pelo resto da vida do hospedeiro sem causar resposta inflamatória (DUBEY et al., 1998, LINDSAY; DUBEY, 2011, MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Dessa forma, hospedeiros intermediários também podem ser infectados após a ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos de bradizoítas (SOUZA et al., 2010). Além disso, *T. gondii* também pode ser transmitido verticalmente da mãe para o feto via placenta, resultando em aborto, anomalias fetais ou sequelas significativas em bebês (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011, MATTOS et al., 2011).

Estima-se que *T. gondii* acomete mais de um terço da população mundial (ARAÚJO-ANDRADE et al., 2007). Embora a maioria das infecções seja assintomática em indivíduos adultos imunocompetentes, a infecção pode ser fatal durante a gravidez e em indivíduos imunocomprometidos (MUNOZ; LIESENFELD; HEIMESAAT, 2011).

Em indivíduos imunocomprometidos, os cistos contendo bradizoítas podem se romper levando à reativação da infecção latente resultando em encefalite toxoplásmica ou coriorretinite (PORTER; SANDE, 1992).

As infecções congênicas geralmente ocorrem devido à infecção aguda durante a gravidez, principalmente no primeiro e no segundo trimestre de gestação, resultando em

graves problemas ao feto (aborto, encefalite, hidrocefalia, retardo mental e coriorretinite), e constituem as mais sérias formas da doença (ARAUJO-ANDRADE et al., 2007, HOTOP; HLOBIL; GROSS, 2012), o que também constitui um importante problema de saúde pública devido à alta morbidade e mortalidade (MATTOS et al., 2011).

Em resumo, as principais vias de transmissão para o homem compreendem: (1) a ingestão de oocistos (eliminados nas fezes de gatos) através de água ou alimentos contaminados, ou por vetores mecânicos (cães, moscas, baratas, ratos); (2) a ingestão de cistos teciduais contidos em carnes cruas ou mal cozidas; e (3) a transferência de taquizoítas através da placenta ou secreções como saliva, urina, esperma e leite, ou ainda por órgãos transplantados e acidentes laboratoriais (DUBEY, 1998).

## **1.2. Mecanismos imunológicos e imunodiagnóstico na toxoplasmose**

A resposta imune a *T. gondii* envolve mecanismos da imunidade mediada por células, mas a resposta imune humoral também destrói muitos taquizoítas. Geralmente, os anticorpos IgM específicos são gerados dentro de uma semana após a infecção, atingindo um pico, e então diminuem rapidamente. Anticorpos IgG específicos aparecem dentro de 1-2 semanas após a infecção e persistem por toda a vida dos pacientes, atingindo títulos máximos em aproximadamente 6 semanas de infecção (CAMARGO et al., 1978, LIU et al., 2011). Estes anticorpos possuem importante papel inibitório da invasão de taquizoítas na célula hospedeira e na sua disseminação sistêmica (COUPER et al., 2005). Devido à pressão do sistema imunológico do hospedeiro, os taquizoítas que escapam da destruição se transformam em bradizoítas e ficam dentro de cistos (SOUZA et al., 2010). Desta forma, observa-se que a imunidade não determina o fim da infecção, mas impede a multiplicação de taquizoítas e a destruição da célula hospedeira. Assim, os anticorpos não são importantes para estabelecer a

imunidade, mas podem prevenir a disseminação dos parasitos durante a infecção crônica (LIPSKA; WYSOCKA; TUROWSKI, 2000).

A toxoplasmose aguda pode ser caracterizada sorologicamente pela presença de anticorpos IgM e/ou IgA específicos. Por outro lado, altos títulos de anticorpos séricos IgG indicam apenas que o indivíduo foi uma vez infectado com *T. gondii*, mas não pode diferenciar entre infecção recente e distante. Em infecções recentes, anticorpos IgG estão presentes mas apresentam baixa avidéz para os antígenos correspondentes. Com o transcorrer da infecção e a maturação da resposta imune, anticorpos IgG vão apresentando avidéz crescente de modo que nas infecções de longa duração encontra-se um predomínio marcante de anticorpos IgG de alta avidéz (CAMARGO et al., 1991, LIU et al., 2011).

Os anticorpos são um dos principais modos de defesa do nosso organismo contra antígenos e são divididos em cinco classes: IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. É possível detectar anticorpos associados a um antígeno de *T. gondii* em diversos fluidos biológicos, como soro sanguíneo, líquido cefalorraquidiano ou leite humano (CHOI et al., 1992, ARAUJO-ANDRADE et al., 2007). O ensaio combinado das classes de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* é uma das ferramentas mais utilizadas no diagnóstico e identificação das diferentes fases da toxoplasmose (AMIN et al., 2012).

Os métodos sorológicos são os mais utilizados para o diagnóstico da infecção por *T. gondii* e são baseados na detecção de anticorpos específicos ao parasito em amostras biológicas, principalmente soro, de pacientes (CAMARGO et al., 1978, DUBEY, 1987). Embora esses ensaios sejam fundamentais para auxiliar no diagnóstico da toxoplasmose, cada técnica apresenta limitações, podendo resultar em testes falso-positivos e falso-negativos (SENSINI, 2006).

### 1.3. Aleitamento materno e leite humano

Os primeiros anos de vida de uma criança são caracterizados por crescimento acelerado e requerimentos nutricionais elevados para seu desenvolvimento, nesse período o aleitamento materno é de crucial importância para a sobrevivência, crescimento, desenvolvimento, saúde, nutrição e proteção dos lactentes (SILVA; SOUZA, 2005, SILVA, 2008). Sendo assim, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2002) e o Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) preconizam o aleitamento materno exclusivo até os seis meses de idade e complementado até dois anos ou mais.

O aleitamento materno é a forma natural e mais segura de alimentar um recém-nascido (HANSON, 2007), pois o leite humano é constituído por mais de 200 substâncias diferentes, sendo uma mistura de carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, minerais, tipos variados de células e água (LAMOUNIER et al., 2002, LAWRENCE; LAWRENCE, 2005). Uma substância viva pela sua complexidade biológica, o leite materno possui atividade protetora e imunomoduladora, com capacidade de proporcionar o desenvolvimento adequado do sistema imunológico do recém-nascido, e adaptado para atender as necessidades nutritivas da criança promovendo seu crescimento e desenvolvimento (LAMOUNIER et al., 2002). É sabido que a amamentação protege o bebê contra uma variedade de doenças, e por isso, vários estudos concentraram na identificação das substâncias imunoativas presentes no leite humano que contribuem para esse fator protetor (CLEARY, 2004, PARAMASIVAM et al., 2006, MOTA-FERREIRA et al., 2009).

O leite humano é dotado de fatores bioativos, tais como lactoferrina, lisozima, hormônios, fatores de crescimento neuropeptídios, citocinas, agentes antiinflamatórios e nucleotídeos. Adicionalmente as propriedades protetoras do leite humano podem ser divididas em fatores celulares e fatores humorais. Dentre os fatores celulares incluem-se macrófagos,

linfócitos, neutrófilos e células epiteliais que correspondem a aproximadamente 4000/mm<sup>3</sup>. Os fatores humorais correspondem às imunoglobulinas. Todas as classes de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG, IgE, IgD) estão presentes no leite humano, sendo que a IgA, principalmente IgA secretória (sIgA) é a mais importante delas, não somente em concentração como também em atividade biológica (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005, JACKSON; NAZAR, 2006). As citocinas induzem uma troca de classe das células B locais IgM+ a se tornarem linfócitos B IgA+ (SCHULTZ; COFFMAN, 1991, WHITMORE et al., 1991, GOLDMAN, 1993).

A sIgA representa cerca de 90% das imunoglobulinas presentes no leite humano (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005), sendo sua concentração média de 50-100 mg/dL (HAMOSH, 2001). Essa imunoglobulina é formada em consequência à prévia exposição da mãe aos agentes infecciosos, e tem capacidade de neutralizar os patógenos quando estão presentes nas superfícies mucosas da criança, enquanto ao mesmo tempo limita os efeitos danosos da inflamação tecidual que pode ocorrer com outros isótipos de anticorpos (CARBONARE; CARNEIRO-SAMPAIO, 2002, HANSON et al., 2003, LONNERDAL, 2004, JACKSON; NAZAR, 2006, PARAMASIVAM et al., 2006). A sIgA é sintetizada por plasmócitos no tecido mamário. Os plasmócitos fazem parte do tecido linfóide associado ao intestino (GALT), o maior órgão imune do organismo que inclui as placas de Peyer, células linfóides e mielóides na lâmina própria e linfócitos intra-epiteliais (HURLEY & THEIL, 2011). Linfócitos do sistema GALT migram para a glândula mamária e fornecem uma relação direta entre a resposta a antígenos no sistema imune de mucosa intestinal da mãe e o repertório de sIgA da glândula mamária (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005, BRANDTZAEG, 2010), ou seja, uma relação entero-mamária. Isto significa que o leite materno contém anticorpos específicos para os agentes patogênicos que podem atingir o intestino e outros tecidos da mucosa do neonato (BRANDTZAEG, 2003, BRANDTZAEG, 2010).

As imunoglobulinas, IgM e IgG, estão presentes no leite humano em quantidades menores que IgA, em concentrações de até 2,5 mg/mL e cerca de 0,1 mg/mL, respectivamente. Anticorpos IgM de alta avidéz, reativos com vírus e bactérias, podem ter um importante papel na defesa das superfícies mucosas do lactente. A IgG tem atividade opsonizante, pode ativar o complemento e a citotoxicidade dependente de anticorpo, atividades pouco presentes nas superfícies mucosas do lactente (CARBONARE; CARNEIRO-SAMPAIO, 2002). Imunoglobulinas encontradas nas secreções mamárias podem ser de fonte sistêmica e local. No caso de IgG no leite, a maior parte vem do soro (HURLEY; THEIL, 2011).

IgD e IgE também já foram mensuradas no leite humano (BAHNA; KELLER; HEINER, 1982) e encontram-se em concentrações muito baixas. Os níveis de IgE e IgD do plasma não foram correlacionados com os níveis encontrados no leite humano, sugerindo que essas imunoglobulinas são produzidas localmente na glândula mamária (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005). Tanto IgD quanto IgE podem se combinar com microrganismos e outros antígenos na mucosa (CARBONARE; CARNEIRO-SAMPAIO, 2002).

O leite humano apresenta três estágios diferentes: colostro, leite de transição e leite maduro, e seus componentes correspondentes são significantes para os recém-nascidos e sua adaptação fisiológica à vida extra-uterina (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005).

O colostro é o primeiro produto de secreção láctica da nutriz perfeito como primeiro alimento da criança, pois permite a boa adaptação fisiológica do recém-nascido à vida extra-uterina. Apresenta coloração amarelada, devido ao seu elevado teor de beta-caroteno, é particularmente rico em imunoglobulinas, peptídeos antimicrobianos, leucócitos e outras moléculas bioativas, incluindo substâncias imunomoduladoras e antiinflamatórias (EUCLYDES, 2005, CASTELLOTE et al., 2011), contém menos carboidratos e gordura, e apresenta concentrações maiores de sódio, potássio e cloro do que o leite maduro. O volume



secretado varia amplamente de 10 a 100 mL/dia, com média em torno de 30 mL. É produzido deste o último trimestre da gestação e na primeira semana pós-parto. Portanto, considera-se colostro a produção láctea do 1º ao 7º dia após o parto (LAMOUNIER et al., 2002). O leite de transição é aquele produzido no período intermediário entre o colostro e o leite maduro (SILVA, 2008), ou seja, entre o 7º e o 14º dia após o parto. O leite maduro é produzido após a segunda semana de lactação, ou seja, a partir do 15º dia após o parto (LAMOUNIER et al., 2002).

Os níveis de imunoglobulina, particularmente IgA e IgM, são bastante altos no colostro e depois declinam no leite maduro, no entanto IgG não apresenta esse declínio (LAWRENCE; LAWRENCE, 2005).

#### **1.4. Toxoplasmose e amamentação**

A transmissão da toxoplasmose pelo leite parece ocorrer entre animais, porém em humanos esta via de transmissão não foi bem demonstrada. Um caso de transmissão em criança através de leite de cabra (SACKS; ROBERTO; BROOKS, 1982) e outros dois de possível transmissão através do leite materno em filho de mãe com doença aguda (LANGER, 1963, BONAMETTI et. al., 1997) já foram descritos. Entretanto, considerando-se o fato de que os taquizoítas podem ser destruídos no trato digestivo e que a mãe infectada também transmite anticorpos que podem ser protetores, ainda não é contra indicado o aleitamento materno em mães com a doença aguda (SUCCI, 2002, LAWRENCE; LAWRENCE, 2005).



## *2. Justificativa*

*Toxoplasma gondii* pode ocasionar infecção fetal através de passagem transplacentária, quando a mãe adquire a infecção durante a gestação ou, menos comumente, quando mulheres cronicamente infectadas tem um imunocomprometimento importante (VARELLA, 2003). Apesar de a maioria dos recém-nascidos infectados não apresentar sintomas, quase todos desenvolvem seqüelas após o nascimento, incluindo coriorretinite, retardo mental e uma moderada perda da audição (MATSUI, 1994, McAULEY et al., 1994).

O risco de um feto se infectar com *T. gondii* e a gravidade das sequelas está associado ao trimestre gestacional em que a mãe é exposta ao parasito. No início da gestação (primeiro trimestre) existe menor propensão do parasita atravessar a barreira placentária e infectar o feto, mas caso isso ocorra a gravidade da doença é maior do que quando a infecção ocorre no terceiro trimestre, em que a transmissão é mais provável de ocorrer, mas a doença é geralmente menos grave (LINDSAY & DUBEY, 2011).

A prevalência de soropositividade em gestantes varia conforme regiões geográficas, características climáticas, fatores culturais e hábitos alimentares (VARELLA, 2003). No Brasil, existem alguns estudos que relataram a prevalência de gestantes soropositivas para IgG anti-toxoplasma, sendo 77,1% no Rio de Janeiro (MEIRELLES FILHO, 1985), 69,4% em Recife (NÓBREGA et al., 1999), 59,8% em Porto Alegre, Rio Grande do Sul (VARELLA, 2003), 51,6 % em Uberlândia, Minas Gerais (SEGUNDO et al.; 2004) e 32,4% na região metropolitana da cidade de São Paulo (VAZ et al., 1990).

A amamentação confere proteção contra várias doenças. Vários estudos documentaram componentes imunológicos específicos no leite humano que protegem contra agentes infecciosos (PALMEIRA et al., 2005, MAKITA et al., 2007, SADEHARJU et al., 2007, BALLARD; MORROW, 2013) mas poucos estudos investigaram proteção contra infecções parasitárias, principalmente contra *T. gondii*.

Portanto, o melhor entendimento da composição e especificidade das imunoglobulinas direcionadas a *T. gondii* presentes no leite humano poderá prover maiores subsídios para o desenvolvimento de insumos que poderão ser utilizados para diagnóstico, tratamento e profilaxia da doença.



### *3. Objetivos*

### 3.1. Objetivo geral

- Detectar e avaliar os isótipos IgG, IgM e IgA específicos a antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*, presentes em amostras pareadas de soro e colostro humano de puérperas.

### 3.2. Objetivos específicos

- Detectar a presença e porcentagem dos isótipos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras pareadas de soro e de colostro humano;
- Correlacionar os níveis dos isótipos de anticorpos detectados nas amostras de soro e colostro humano;
- Avaliar o perfil de detecção antigênica dos três isótipos de anticorpos específicos presentes em amostras de soro e colostro humano, utilizando antígenos solúveis de *T. gondii*;
- Determinar a avidéz dos anticorpos IgG detectados em amostras de soro e colostro humano frente às frações antigênicas de *T. gondii*;
- Identificar frações antigênicas de *T. gondii* como possíveis marcadores para o diagnóstico de toxoplasmose aguda e congênita.



#### *4. Material e Métodos*

#### **4.1. Aspectos éticos**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/ Número do protocolo: 104.110) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), que regulamenta a pesquisa envolvendo seres humanos (ANEXO I). Os indivíduos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (ANEXO II e III), estando cientes de todos os procedimentos adotados.

#### **4.2. Pacientes**

O presente estudo envolveu 289 puérperas (média de idade 24,8 anos, mediana 24 anos, intervalo de 14 – 43 anos) atendidas no Centro Obstétrico do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) no período de Outubro de 2012 a Janeiro de 2013, que estavam hospitalizadas devido ao parto e que aceitaram participar do estudo após serem devidamente esclarecidas. Os critérios de exclusão do estudo consistiram em mulheres soropositivas para HIV e/ou HTLV, cuja amamentação é contra-indicada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2008).

O estudo laboratorial foi desenvolvido no Laboratório de Imunoparasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

#### **4.3. Amostras de leite humano**

Mediante o aceite em participar do presente estudo, por meio da assinatura do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, foram coletado, por ordenha manual, aproximadamente 3 mL de leite humano de cada puérpera, sendo essa amostra relativa ao



colostro. A amostra de leite foi coletada nos leitos da Enfermaria de Ginecologia e Obstetrícia do HC-UFU, entre o 1º e 6º dias após o parto da paciente, para garantir que a amostra realmente fosse de colostro humano. Todas as amostras foram processadas: centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4°C para remoção da parte lipídica, o leite desnatado foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C até o uso.

#### **4.4. Amostras de sangue**

O Laboratório de Análises Clínicas do HC-UFU colhe sangue rotineiramente de todas as puérperas hospitalizadas, um dia após o parto, para realização de exames laboratoriais. Portanto foi requisitado ao laboratório o volume de sangue restante das puérperas que assinaram o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”; dessa forma, não foi necessária nova coleta de sangue das mães que concordaram em participar do estudo. O soro obtido foi distribuído em alíquotas e armazenado a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

#### **4.5. Manutenção e obtenção de *T. gondii***

As formas taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos em cultura celular, usando linhagens de células HeLa como descrito anteriormente (RIBEIRO et al., 2009). As células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* que foram mantidos por passagens seriadas em meio RPMI com 2% de Soro Fetal Bovino, a cada 48-72 horas. Os parasitos livres foram coletados por descamação da monocamada celular (cell scraper) e parcialmente purificados por passagens forçadas através de agulha 13 x 4 mm e centrifugação rápida (45 x g por 1 minuto a 4°C) para remover restos celulares. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (700 x g por 10 minutos a 4°C) com solução salina tamponada com fosfatos

0,01 M (PBS, pH 7,2). O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspendido em PBS e os parasitas contados em câmara de Neubauer, utilizando o corante de exclusão vital azul de Tripan a 0,4% (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

Os parasitos foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a preparação do antígeno solúvel de *T. gondii*.

#### **4.6. Preparo de antígenos solúveis de *T. gondii***

Antígenos solúveis de taquizoítas de *T. gondii* (STAg) foram preparados como descrito anteriormente por Scott e colaboradores (1987), com modificações. Suspensões parasitárias contendo aproximadamente  $10^8$  taquizoítas/mL foram tratadas com coquetel de inibidores de proteases (Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche Applied Science) e submetidas a dez ciclos rápidos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , seguido por oito ciclos de ultra-som (Thorton – INPEC Eletrônica S/A, Santo Amaro, SP, Brasil) durante 5 minutos a 60 Hz em banho de gelo. Após centrifugação a  $10.000 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , o sobrenadante foi coletado e determinado sua concentração proteica (Bicinchoninic acid kit, BCA, Sigma, St. Louis, MO, USA). Foram armazenadas alíquotas do extrato com antígenos solúveis totais a  $-20^{\circ}\text{C}$  até utilização posterior.

## 4.7. Ensaios imunoenzimáticos

### 4.7.1. ELISA indireto para detecção de IgG anti-*T. gondii*

Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detecção de anticorpos IgG, presentes tanto nas amostras de soro quanto nas amostras de leite, foram realizados segundo a técnica descrita anteriormente (MINEO; CAMARGO; FERREIRA, 1986) com modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com STAg (10 µg/mL) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, SP – PBS-T-M5%), por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soro foram diluídas a 1:64 em PBS-T-M5%, enquanto as amostras de colostro foram diluídas a 1:5 em PBS-T e incubadas por 1 hora a 37°C. Após seis lavagens, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG humana (1:2000) conjugado com peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e incubado por 1 hora à 37°C. Após novas lavagens, a reação foi revelada por meio da adição do substrato enzimático, solução A e solução B (v:v) de Peroxidase Substrate System (ABTS, Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washington, DC, EUA). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados em leitor de placas de microtitulação (Titertek Multiskan Plus MKII, Flow Laboratories, McLean, EUA) a 405 nm. Controles positivos e negativos foram incluídos na placa. Os níveis de anticorpos foram arbitrariamente expressos em índice ELISA (IE), segundo a fórmula:  $IE = DO_{amostra} / cut\ off$ , onde *cut off* foi calculado como a média da DO de soros controles negativos acrescida de três desvios padrões. Valores de  $IE \geq 1,2$  foram considerados positivos para excluir valores de reatividade limítrofes próximos a valores de  $IE = 1,0$ .

#### **4.7.2. ELISA de captura para detecção de IgM e IgA anti-*T. gondii***

ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgA presentes tanto nas amostras de soro quanto nas amostras de colostro, foram realizados segundo a técnica descrita anteriormente (MINEO, CAMARGO, FERREIRA, 1986) com modificações. Placas de alta afinidade (Corning Incorporated Costar®, Corning Laboratories Inc., New York, EUA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IgM humana (1:200) (Kirkegaard & Perry Laboratories, KPL, Washington, DC, EUA) ou anti-IgA humana (1:100) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e bloqueadas com PBS-T-M5% por 1 hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, as amostras de soro foram diluídas a 1:16 em PBS-T-M5%, enquanto as amostras de colostro foram diluídas a 1:5 em PBS-T e incubadas por 2 horas a 37°C. Após seis lavagens, as placas foram incubadas com STAg (100 µg/mL) em PBS-T-M5% por 2 horas a 37°C, seguida de novas lavagens. O antígeno ligado foi detectado pela adição da porção F(ab')<sub>2</sub> de anticorpo de coelho anti-*T. gondii* conjugado com peroxidase (preparado segundo Wilson e Nakane, 1978) diluído 1:500 em PBS-T-M5%, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. As etapas finais foram conforme descrito para o ELISA indireto.

#### **4.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)**

A eletroforese em uma dimensão (1D) foi realizada segundo Laemmli (1970), o extrato com antígenos solúveis totais foi solubilizado (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 0,1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%), aquecidos a 100°C durante 5 minutos e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a

12%, com gel de empilhamento a 5%, em condições desnaturantes e não redutoras. Foi utilizado o sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, CA, EUA), sob corrente constante de 26 mA por 1 hora.

Foi aplicado um volume de 200 µL em cada corrida e, em paralelo, marcador de peso molecular (Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,22 µm (Sigma Chemical Co.) como previamente descrito (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979), utilizando um sistema semi-úmido de transferência (Multiphor Novablot II, Pharmacia-LKB, Suécia) por 2 horas a uma corrente constante de 0,8 mA/cm<sup>2</sup> do gel. A transferência foi confirmada pela coloração com solução de Ponceau a 0,5%.

#### **4.9. Immunoblotting**

As membranas de nitrocelulose previamente eletrotransferidas com antígenos solúveis totais ou frações de antígenos de *T. gondii* foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm de largura e colocadas em canaletas apropriadas para reação. As tiras foram bloqueadas com PBS-T-M5% por 2 horas a 37°C. Após lavagens com PBS-T, as tiras de nitrocelulose foram incubadas por 18 horas a 4°C, sob agitação pendular, com amostras de soro (diluídas em PBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado – PBS-T-M1% – 1:100 [IgG] ou 1:50 [IgM e IgA]) ou com amostras de colostro humano (diluídas em PBS-T, 1:10 [IgG] ou 1:5 [IgM e IgA]). Após seis ciclos de lavagens, foram adicionados os conjugados de detecção anti-IgG humana, anti-IgM humana ou anti-IgA humana marcados com peroxidase (Sigma Chemical Co.), diluídos 1:2000, 1:1000 e 1:2000 em PBS-T-M1%, respectivamente, por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas e reveladas pela

adição de diaminobenzidina (Stable DAB, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), e as reações foram interrompidas com água destilada quando bandas de coloração marrom forem visualizadas.

#### **4.10. Immunoblot-avidez para anticorpos IgG anti-*T. gondii***

Após o bloqueio das tiras de nitrocelulose como descrito para no item 4.10, as tiras foram incubadas em duplicata com as amostras de soro ou colostro positivas no ensaio de *immunoblot*, por 18 horas a 4°C. Em seguida, uma das tiras foi lavada com solução de uréia 6 M em PBS-T por 10 minutos, enquanto a outra tira da duplicata foi lavada somente com PBS-T. Posteriormente, ambas as tiras foram lavadas por três vezes com PBS-T por 5 minutos. As etapas finais foram realizadas como descritas para o *immunoblot*.

Os resultados obtidos para as amostras não tratadas (uréia<sup>-</sup>) ou tratadas com uréia 6 M (uréia<sup>+</sup>) foram avaliados quanto à intensidade em pixels (Int Band), utilizando o programa de imagens Image Lab 4.0.1 (Bio-Rad Laboratories), sendo expressos em Índice de avidez (IA), calculado de acordo com a seguinte fórmula:  $IA = (Int\ Band\ uréia^{+} / Int\ Band\ uréia^{-}) \times 100$ . IA < 50% corresponderam à reatividade com anticorpos de baixa avidez, enquanto IA > 75% corresponderam à reatividade com anticorpos de alta avidez.

#### **4.11. Análise estatística**

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA).

Assumindo-se que a amostragem não seguiu a distribuição normal, diferenças entre os níveis de anticorpos do mesmo isótipo para amostras pareadas de soro e colostro foram

analisados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Também foi utilizado teste de correlação de Spearman para correlacionar os níveis de imunoglobulinas entre os diferentes isótipos e as diferentes amostras. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

#### **4.12. Normas de biossegurança**

Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foram realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005).



## *5. Resultados*



### 5.1. Detecção de anticorpos em amostras de soro e colostro de puérperas

Anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* foram detectados por ELISA em ambas as amostras de todas as pacientes, sendo que 47,0%, 6,9%, 2,8% das amostras de soro e 46,0%, 7,9%, 2,8% das amostras de colostro foram positivas para IgG, IgM e IgA, respectivamente (Tabela 1).

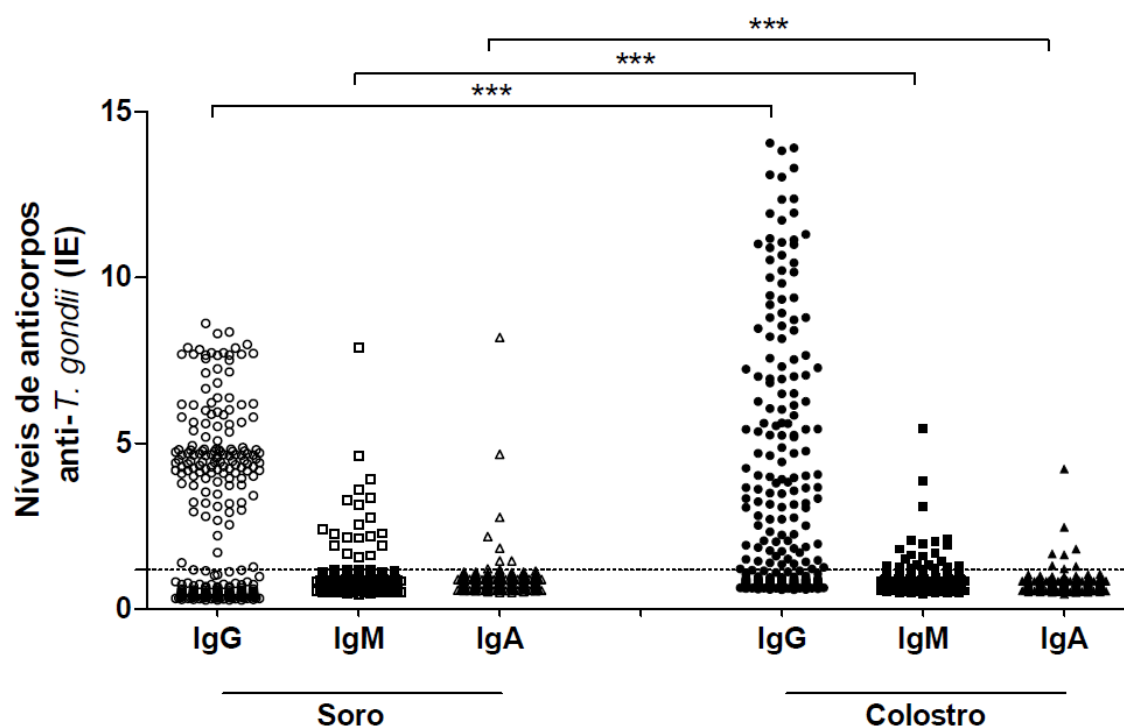
**Tabela 1.** ELISA para a detecção dos isótipos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostras de soro e colostro humano de 289 puérperas de Uberlândia, MG, Brasil.

Isótipos de anticorpos anti- <i>T. gondii</i>	Número de amostras positivas <sup>a</sup> n (%)	
	Soro	Colostro
IgG	136 (47,0)	133 (46,0)
IgM	20 (6,9)	23 (7,9)
IgA	8 (2,8)	8 (2,8)

a. Dados estão apresentados em número (n) e porcentagem (%) das amostras analisadas.

Os níveis de IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* no soro e colostro humano de todas as pacientes envolvidas neste estudo estão apresentados na Figura 1, em índice ELISA (IE). Os níveis de anticorpos IgG detectados em amostras de colostro (média: 5,90; mediana/ intervalo [med]: 5,26/1,22-14,05) foram significativamente maiores do que os níveis de IgG detectados em amostras de soro (média: 4,99; med:4,66/1,28-8,62)  $p < 0,0001$ . Por outro lado, os níveis

de anticorpos IgM e IgA detectados em amostras de colostro (média: 1,91; med: 1,61/1,22-5,46 e média: 1,96; med: 1,65/1,22-4,23, respectivamente) foram significativamente menores do que de IgM e IgA detectados em amostras de soro (média: 2,87; med: 2,36/1,58-7,88 e média: 2,98; med: 2,02/1,22-8,20, respectivamente),  $p < 0,0001$ .

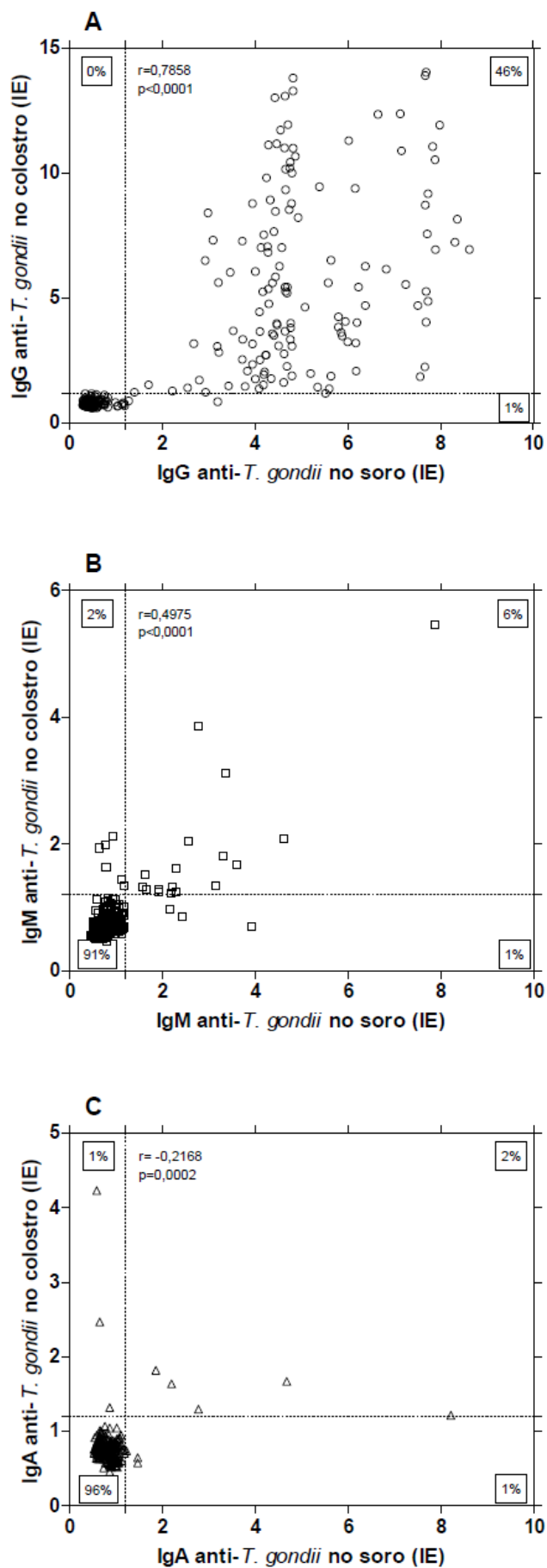


**Figura 1.** Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii*, determinados por índice ELISA (IE), em amostras de soro e colostro de 289 puérperas. A linha tracejada representa o valor do cut-off (IE=1,2). \*\*\* Dados estatisticamente significantes ( $p < 0,0001$ , Wilcoxon).

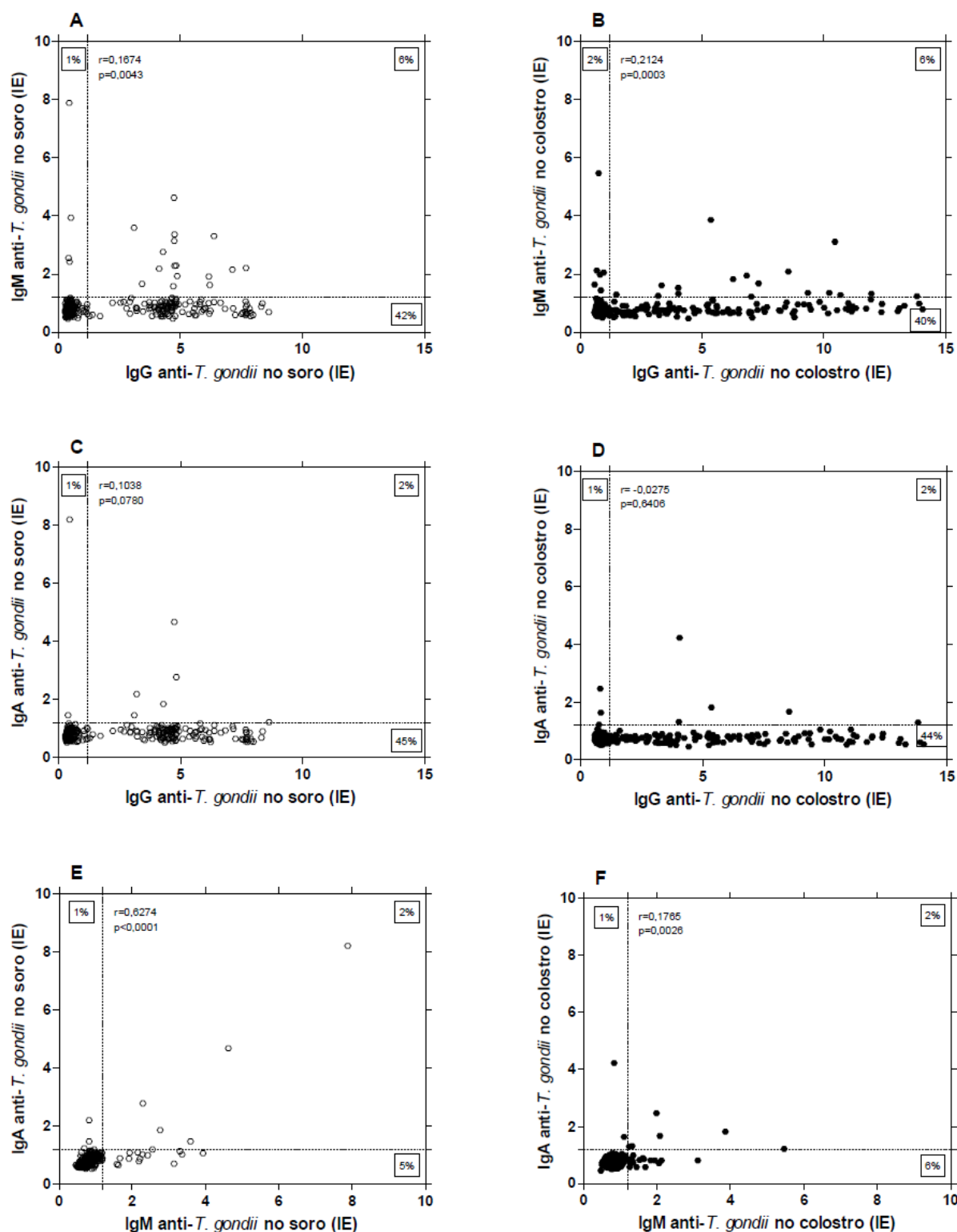
## 5.2. Correlação entre os níveis de anticorpos anti-*T. gondii* em amostras de soro e colostro

Analisando os isótipos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados em amostras de soro e do colostro, foi encontrada uma alta correlação positiva estatisticamente significativa quando comparados os níveis de IgG ( $r = 0,7858$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 2A), uma média correlação positiva significativa quando foram comparados os níveis de IgM ( $r = 0,4975$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 2B) e uma baixa correlação negativa significativa quando os níveis de IgA foram comparados ( $r = -0,2168$ ;  $p = 0,0002$ ) (Figura 2C).

Os níveis dos isótipos de anticorpos detectados nas amostras de soro apresentaram uma correlação positiva entre eles, como se segue: IgG *vs* IgM teve uma baixa correlação, contudo estatisticamente significativa ( $r = 0,1674$ ;  $p = 0,0043$ ) (Figura 3A), IgG *vs* IgA apresentou uma baixa correlação, mas não foi estatisticamente significativa ( $r = 0,1038$ ;  $p = 0,0780$ ) (Figura 3C) e IgM *vs* IgA teve uma média correlação estatisticamente significativa ( $r = 0,6274$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 3E). Considerando os níveis dos isótipos de anticorpos anti-*T. gondii* detectados nas amostras de colostro, contudo, uma baixa correlação positiva significativa foi observada para IgG *vs* IgM ( $r = 0,2124$ ;  $p = 0,0003$ ) (Figura 3B) e IgM *vs* IgA ( $r = 0,1765$ ;  $p = 0,0026$ ) (Figura 3F), mas não para IgG *vs* IgA, cuja correlação foi negativa e não significativa ( $r = -0,0275$ ;  $p = 0,6406$ ) (Figura 3D).



**Figura 2.** Correlação entre níveis de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos a *T. gondii* presentes em amostras de soro e colostro de 289 puérperas. Coeficientes de correlação foram calculados pelo teste de correlação de Spearman.



**Figura 3.** Correlação entre os níveis dos isótipos de anticorpos específicos a *T. gondii* presentes em amostras de soro (**A, C, E**) e colostro (**B, D, F**) de 289 puérperas. Coeficientes de correlação foram calculados pelo teste de correlação de Spearman.

### 5.3. Associações entre IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras de soro e colostro

Quatro amostras de soro e quatro amostras de colostro apresentaram reatividade simultânea contra *T. gondii* para os três isótipos analisados, sendo 60% de pacientes concordantes. Reatividade simultânea de dois isótipos foi observada para IgG associado a IgM, IgG associado a IgA e IgM associado a IgA tanto no soro como no colostro, com 66,7% de pacientes concordantes para IgG associado a IgM, e 50,0% para IgM associado a IgA. O caso mais frequente foi a reatividade somente para IgG (40,8% no soro e de 39,8% no colostro), com 94,2% das pacientes concordantes, enquanto que três amostras de soro e quatro de colostro foram reativas somente para IgA, e apenas uma amostra em cada fluido biológico foi reagente somente para IgM. Sendo que 94,1% das pacientes tiveram resultados concordantes para anticorpos anti- *T. gondii* quando analisado amostras de soro e colostro (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número (n) e porcentagem (%) de amostras de soro e colostro de puérperas, de acordo com a associação entre os três isótipos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii*, mensurados por ELISA.

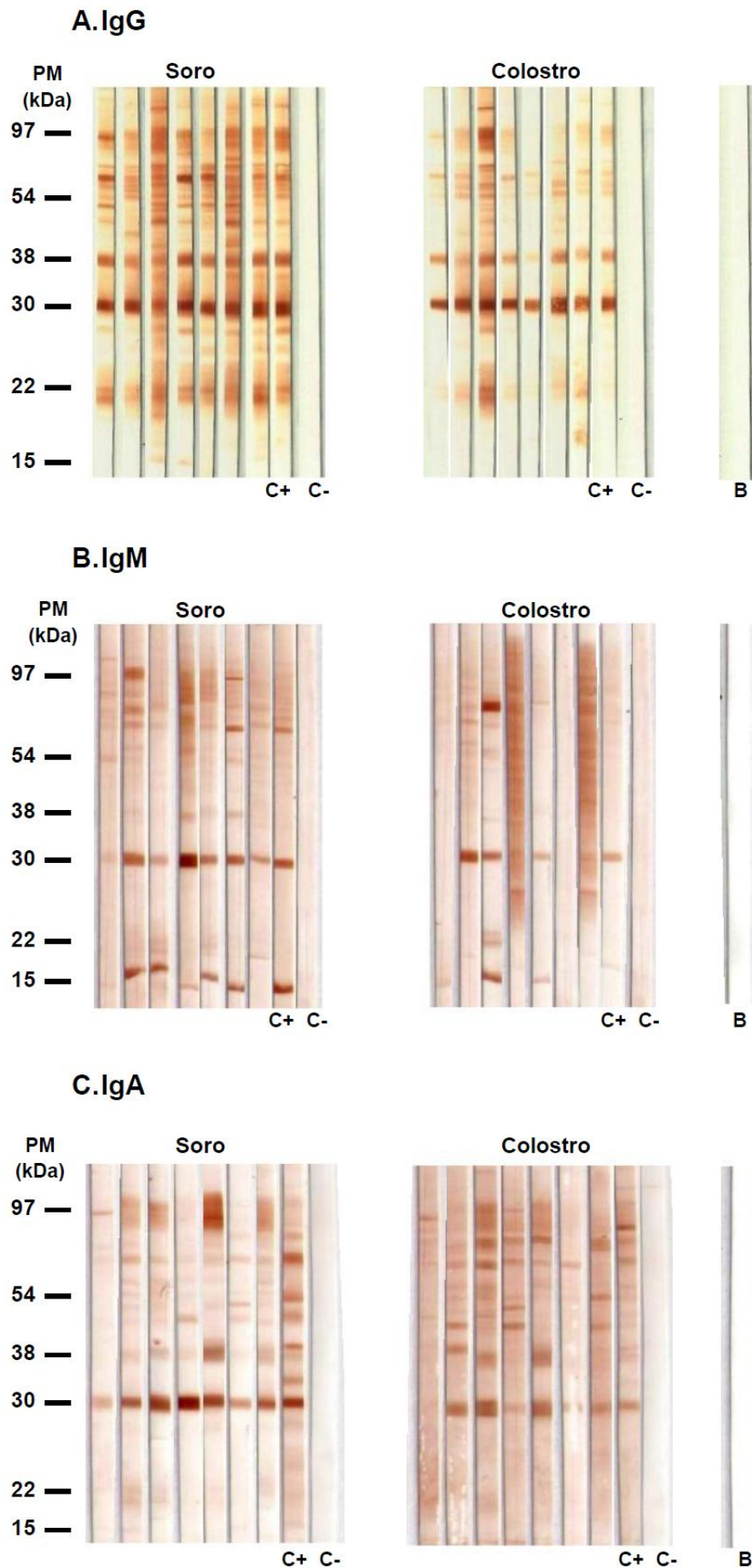
<b>Associação dos isótipos IgG/IgM/IgA</b>	<b>Soro n (%)</b>	<b>Colostro n (%)</b>	<b>Pacientes concordantes em soro e colostro n (%)</b>
+/+/+	4 (1,4)	4 (1,4)	3 (60,0)
+/+/-	12 (4,2)	13 (4,5)	10 (66,7)
+/-/+	2 (0,7)	1 (0,3)	0 (0)
-+/+	1 (0,3)	2 (0,7)	1 (50,0)
+/-/-	118 (40,8)	115 (39,8)	113 (94,2)
-/+/-	3 (1,0)	4 (1,4)	1 (16,7)
-/-/+	1 (0,3)	1 (0,3)	0 (0)
-/-/-	148 (51,3)	149 (51,6)	144 (94,1)
Total	289 (100,0)	289 (100,0)	272 (94,1)

#### **5.4. Detecção de frações antigênicas de *T. gondii* por anticorpos IgG, IgM e IgA específicos**

De acordo com os resultados dos ELISA sorológicos convencionais, 30 pacientes foram caracterizadas como grupo de risco para toxoplasmose aguda, pois suas amostras apresentaram IgA e/ou IgM no soro e/ou no colostro associados ou não à presença de IgG (Tabela 2). As amostras desse grupo de puérperas foram selecionadas para os ensaios de *immunoblotting* a fim de avaliar a detecção dos três isótipos de anticorpos frente às várias frações do antígeno solúvel de *T. gondii*. Amostras de soro e colostro de uma dessas pacientes não foram testadas devido ao volume insuficiente.

Os ensaios de *Immunoblotting* mostraram que é possível detectar anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a diversas frações antigênicas de *T. gondii* no soro e no colostro humano (Figura 4).





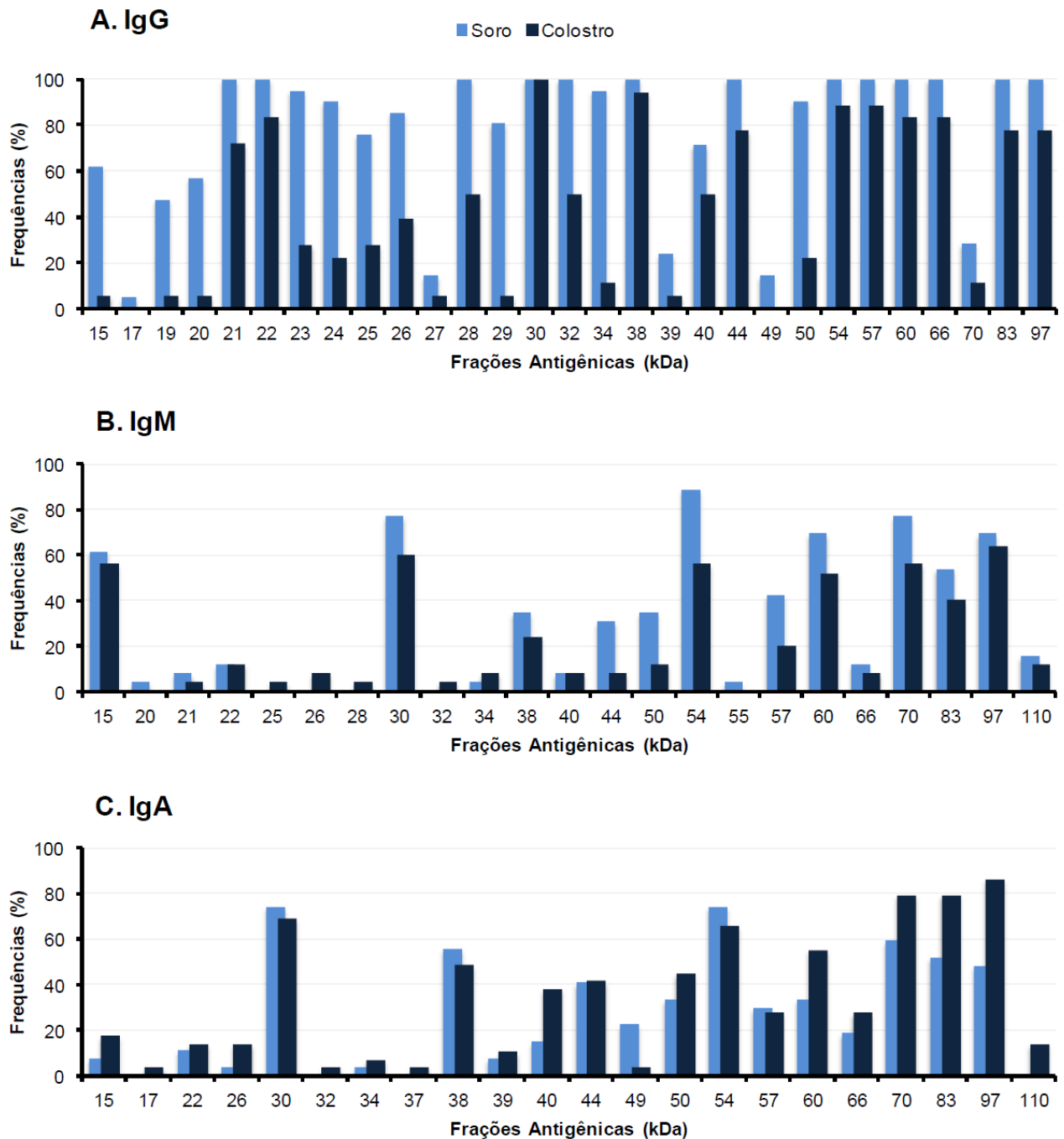
**Figura 4.** *Immunoblotting* representativo realizado com antígeno solúvel de *T. gondii* para a detecção de anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) específicos ao parasito em amostras de soro e colostro de puérperas. Peso molecular (kDa) mostrado ao lado esquerdo. C+ controle positivo, C- controle negativo, B branco.

Anticorpos IgG anti-*T. gondii* presentes em amostras de soro e colostro reconhecem mais frações antigênicas que anticorpos IgM e IgA específicos ao parasito (Figura 5). Além disso, considerando os anticorpos IgG específicos, podemos observar que mais de 75% das amostras de soro das pacientes reagiram com 20 frações antigênicas (97, 83, 66, 60, 57, 54, 50, 44, 38, 34, 32, 30, 29, 28, 26, 25, 24, 23, 22 e 21 kDa), portanto houve uma semelhança no reconhecimento. Diferentemente do que foi apresentado com as amostras de colostro, cujo reconhecimento variou bastante entre as pacientes, com a reatividade a 14 frações antigênicas (70, 50, 39, 34, 32, 29, 27, 26, 25, 24, 23, 20, 19 e 15 kDa) com menos de 50% de frequência (Figura 5A e Figura 6). No entanto, considerando ambas amostras da mesma paciente, foi possível notar que anticorpos IgG presentes no soro sempre reconhecem uma variedade maior de antígenos de *T. gondii* do que anticorpos IgG presentes no colostro.

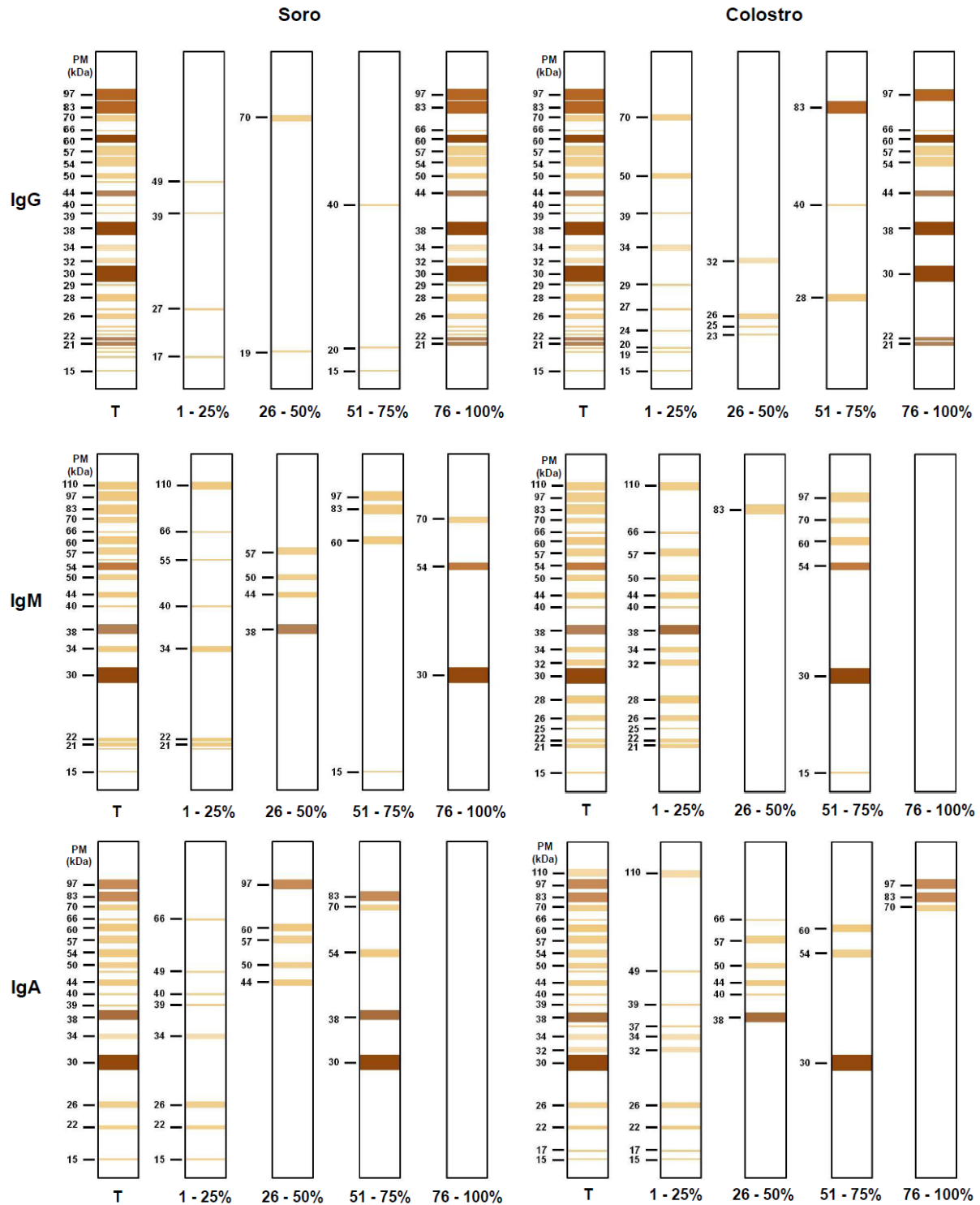
Em relação aos anticorpos IgM, a maioria das frações antigênicas foram detectadas em menos de 50% das amostras tanto de soro como de colostro. Um padrão de reconhecimento das frações antigênicas de *T. gondii* foi observado apenas em amostras de soro das pacientes, que reagiram com três frações (70, 54 e 30 kDa) com mais de 75% de frequência. Não houve reconhecimento antigênico com alta frequência pelos anticorpos do colostro (Figura 5B e Figura 6). Além disso, também é variável entre as puérperas o perfil de reconhecimento de IgM frente aos antígenos quando se leva em consideração ambas amostras biológicas da mesma mulher.

Quanto ao isótipo IgA parece haver uma inversão do perfil de anticorpos IgG, ou seja, os anticorpos IgA específicos presentes no colostro reconhecem maior número de frações antigênicas do que anticorpos IgA presentes no soro. Adicionalmente, as frações 97, 83 e 70 kDa foram reconhecidas por mais de 75% das amostras de colostro. No entanto, não existe um padrão de reconhecimento quando se analisa separadamente soro ou colostro de várias

puérperas, uma vez que a maioria das frações foram reconhecidas com frequências menores que 50% (Figura 5C e Figura 6).



**Figura 5.** Frequências (%) de reconhecimento de frações antigênicas (kDa) de *T. gondii* por anticorpos IgG (A), IgM (B) e IgA (C) presentes em amostras de soro e colostro de puérperas.



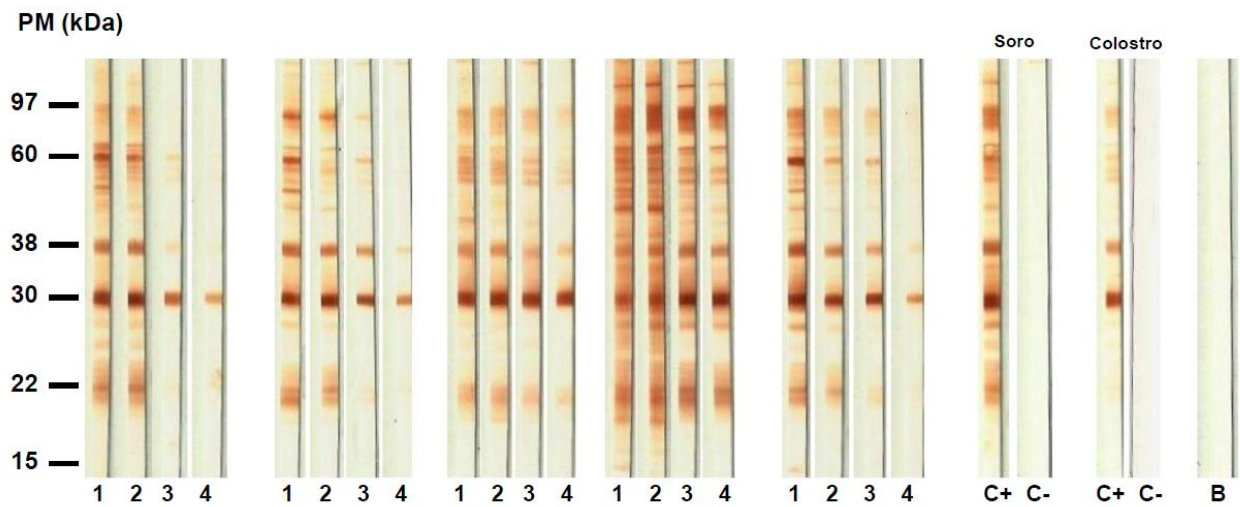
**Figura 6.** Esquema do *Immunoblotting* referente à frequência (%) de reconhecimento das frações antigênicas de *T. gondii* pelos isótipos IgG, IgM e IgA em amostras de soro e colostro de puérperas. T: Todas as frações antigênicas detectadas na amostra. O peso molecular aparente da fração proteica é mostrado à esquerda. Cores diferentes representam densidade de *pixels* diferentes.

### 5.5. Avidéz de anticorpos IgG à frações antigênicas de *T. gondii*

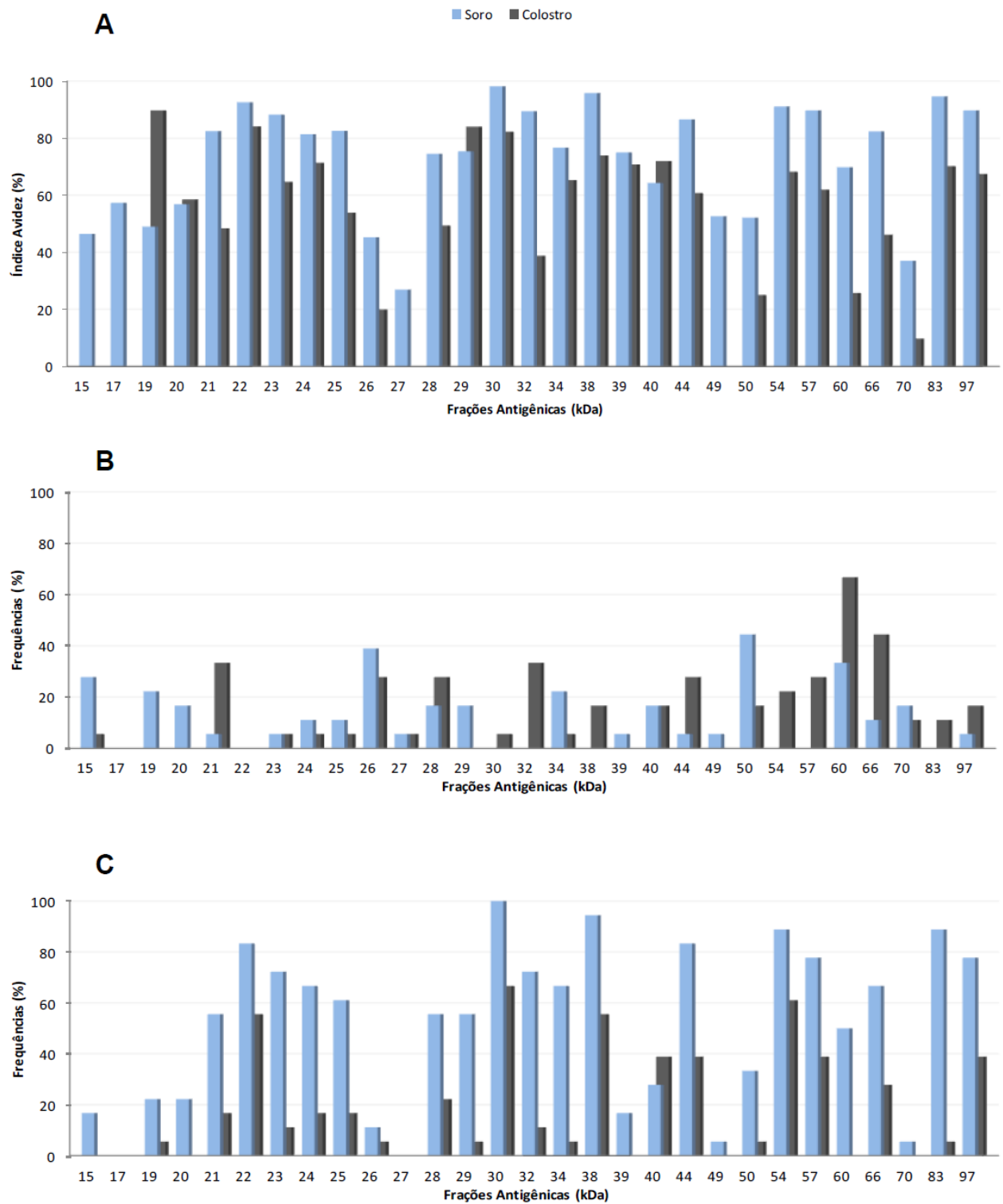
O ensaio de *immunoblotting* para avaliar a avidéz de anticorpos IgG foi realizado com as amostras de soro e colostro de 21 puérperas, que foram positivas para IgG dentre as 30 pacientes do grupo de risco (Figura 7).

A figura 8 mostra a média de avidéz de anticorpos IgG específicos a frações antigênicas de *T. gondii* (Figura 8A), bem como a frequência com que cada fração foi reconhecida por anticorpos IgG de baixa avidéz (Figura 8B) ou de alta avidéz (Figura 8C).

Todas as frações antigênicas detectadas com alta frequência (>75% das amostras) por anticorpos IgG do soro (Figura 5A) foram reconhecidas por anticorpos de alta avidéz, exceto as frações de 50 e 60 kDa, que menos de 50% das pacientes apresentaram anticorpos IgG de alta avidéz específicos a elas. Além disso, nenhuma paciente apresentou anticorpos IgG de baixa avidéz no soro para as frações de 22, 30, 32, 38, 54, 57 e 83 kDa (Figura 8B). Considerando os anticorpos IgG do colostro podemos notar que eles tiveram menor avidéz à quase todas frações antigênicas quando comparado com a avidéz de anticorpos IgG do soro (Figura 8A). Adicionalmente, merecem destaque as frações de 60 e 66 kDa que foram frequentemente reconhecidas por anticorpos IgG do colostro de baixa avidéz (Figura 8B), sendo que não foram detectados IgG de alta avidéz específico à fração de 60 kDa (Figura 8C). Por outro lado, as frações de 22, 30, 38 e 54 kDa foram frequentemente reconhecidas por anticorpos IgG de alta avidéz, para ambas amostras biológicas (Figura 8C).



**Figura 7.** *Immunoblotting* de IgG avides representativo realizado com antígeno solúvel de *T. gondii* e amostras de soro e colostro de puéperas. Peso molecular (kDa) mostrado ao lado esquerdo. **1 e 2** tiras da membrana incubadas com amostra de soro e, respectivamente, não tratadas ou tratadas com ureia 6M. **3 e 4** tiras da membrana incubadas com amostra de colostro e, respectivamente, não tratadas ou tratadas com ureia 6M. **C+** controle positivo, **C-** controle negativo, **B** branco.



**Figura 8.** Avidéz de anticorpos IgG a frações antigênicas de *T. gondii* em amostra de soro e colostro humano de púerperas, valores em índice avidéz (IA). **A** Avidéz média das frações antigênicas. **B** Frequências das frações antigênicas reconhecidas com baixa avidéz (IA<50%). **C** Frequências das frações antigênicas reconhecidas com alta avidéz (IA>75%).

## 5.6. Assistência e acompanhamento clínico

Vale ressaltar a importância assistencial que esse trabalho desempenhou. Durante o período de coleta de amostras de colostro humano todas as pacientes que aceitaram participar da pesquisa receberam orientações sobre: a importância da amamentação, como amamentar corretamente e como fazer a ordenha manual para aliviar a mama ingurgitada de leite.

Além disso, as pacientes cujas análises sorológicas resultaram em IgM e/ou IgA positivas para *T. gondii* foram comunicadas e, para seus filhos foi agendada uma consulta de acompanhamento com uma pediatra neonatologista do Hospital de Clínicas da UFU. A esses recém-nascidos foram solicitados os seguintes exames: sorologia para *T. gondii* (IgG e IgM), ultrassonografia de crânio para avaliação de calcificações cerebrais e ventrículomegalia como sinal de hidrocefalia, e exame de fundo de olho para avaliação de coriorretinite. Todos os exames foram realizados no Hospital de Clínicas da UFU.

Nove pacientes não compareceram para levar seus filhos à consulta, os demais neonatos foram examinados e acompanhados durante pelo menos seis meses após o nascimento para monitorar a possibilidade de infecção congênita. A maioria deles apresentou resultados normais para o exame de fundo de olho e ultrassonografia de crânio, acompanhado de sorologia IgM negativo e IgG positivo com níveis decrescentes, o que indica que era o anticorpo de transferência materna; no entanto três recém-nascidos manifestaram a doença e continuarão em acompanhamento e tratamento o tempo que for necessário, sendo os seguintes casos:

Caso 1 – Neonato apresentou sorologia positiva para IgM e IgG, acentuada dilatação dos ventrículos laterais do cérebro e alterações de fundo de olho caracterizando hidrocefalia e coriorretinite devido à infecção congênita de toxoplasmose. Durante o pré-natal, a mãe já havia sido diagnosticada com toxoplasmose aguda no 5º mês (2º trimestre) de gestação, e fez



uso de sulfadiazina, pirimetamina e ácido folínico até a 34ª semanas de gestação, depois espiramicina até o parto.

Caso 2 – Neonato apresentou sorologia negativa para IgM e positiva para IgG, múltiplas calcificações parenquimatosas cerebrais e exame de fundo de olho alterado, e lhe foi dado o diagnóstico de coriorretinite e microcefalia por toxoplasmose congênita. Durante o pré-natal, a mãe também já havia sido diagnosticada com toxoplasmose aguda no 6º mês (2º trimestre) de gestação, e fez uso de espiramicina até o final da gravidez.

Caso 3 – Neonato apresentou sorologia negativa para IgM e positiva para IgG com níveis crescentes, ultrassonografia de crânio normal, porém exame de fundo de olho alterado sendo diagnosticado como coriorretinite por toxoplasmose congênita. Esse último caso merece destaque porque a mãe havia sido diagnosticada imune à toxoplasmose durante o pré-natal, no entanto nossos resultados mostraram que ela estava com toxoplasmose aguda nos primeiros dias logo após o parto, com a presença de IgG, IgM e IgA específicas ao parasito nas amostras de soro e colostro.



## *6. Discussão*

A maioria das pessoas infectadas com *T. gondii* são assintomáticas devido ao bom funcionamento de seu sistema imunológico. No entanto, esse parasito intracelular obrigatório pode causar graves doenças fetais, inclusive abortos, em casos de toxoplasmose aguda materna (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). A transmissão materno-fetal pode variar de 6 a 72% de acordo com a idade gestacional da mulher no momento em que ela adquire a infecção; quanto maior a idade gestacional, maior o risco de transmissão. Porém o maior risco de doenças fetais graves ocorre quando a infecção materna se dá no primeiro trimestre da gestação, em que 61% dos fetos congenitamente infectados podem desenvolver alguma manifestação clínica grave (MONTROYA; REMINGTON, 2008), tais como diminuição da visão ou cegueira, diminuição da audição ou surdez e retardo mental.

Muitas vezes as infecções congênitas causadas por *T. gondii* são negligenciadas porque são assintomáticas no momento do nascimento e permanecem despercebidas. Isso acontece principalmente quando a infecção materna ocorre durante o terceiro trimestre da gravidez, e há transmissão tardia de parasitos maternos para o feto, o que reduz o tempo para a multiplicação do parasito no feto ou no recém-nascido, consequentemente os danos não são evidentes precocemente. Porém, manifestações clínicas podem aparecer semanas ou anos após o nascimento (CARLIER et al., 2012), normalmente na forma de coriorretinite grave (MELAMED et al., 2010). Por esse motivo, é extremamente importante que um teste de diagnóstico para toxoplasmose seja realizado em todas as puérperas logo após o parto, uma vez que a mulher pode ter sido infectada no final da gestação, ou a paciente pode ter sido diagnosticada imune à toxoplasmose durante o pré-natal, como foi evidenciado em nosso estudo pelo ‘Caso 3 do acompanhamento clínico’, e na realidade estava na fase aguda da infecção no final da gestação e seu bebê manifestou a forma ocular da doença congênita. Nesse caso podemos sugerir que os resultados dos testes de diagnóstico dessa paciente foram erroneamente interpretados e a paciente era suscetível à infecção do parasito e adquiriu a

infecção no final da gestação, ou essa paciente sofreu reativação de uma infecção prévia à gestação sendo capaz de infectar o feto, assim como já foi demonstrado (VOGEL et al., 1996; DOLLFUS et al., 1998; VILLENA et al., 1998; KODJIKIAN et al., 2004), ou ainda essa mulher pode ter sido reinfectedada por uma nova cepa de *T. gondii* que causou a toxoplasmose congênita, como também já foi descrito anteriormente (GAVINET et al., 1997; ELBEZ-RUBINSTEIN et al., 2009).

O Ministério da Saúde recomenda a realização da triagem sorológica para toxoplasmose por meio da detecção de anticorpos dos isótipos IgG e IgM na primeira consulta de pré-natal de todas as gestantes, principalmente em lugares onde a prevalência da doença é elevada. Além disso, aquelas com sorologia negativa devem ser orientadas sobre a prevenção da contaminação e, se possível, repetir a sorologia ao longo da gestação (BRASIL, 2012). Embora essa conduta seja preconizada pelo Ministério da Saúde, nem sempre isso é adotado por todos os postos de saúde e hospitais, e inclusive existe a possibilidade da infecção posterior aos testes de triagem do pré-natal. Por isso, nossos dados sugerem a necessidade de se fazer o diagnóstico de toxoplasmose na mulher momentos após o parto, e dessa forma é possível realizar o teste usando o leite humano, uma forma não invasiva de se obter amostra biológica, já que demonstramos a detecção dos três isótipos de imunoglobulinas no colostro humano.

Os plasmócitos produtores de IgG presentes no tecido mamário pouco contribuem para os níveis de IgG no colostro comparado com os níveis desse isótipo derivado do soro (HURLEY; THEIL, 2011). Nossos dados mostraram uma forte correlação dos níveis de IgG presentes em ambas amostras de soro e colostro, indicando que provavelmente o anticorpo IgG anti-*T. gondii* é transferido do plasma para a glândula mamária. Isso também explica nossos resultados dos ensaios *Immunoblotting*, em que anticorpos IgG presentes no soro reconheceram mais antígenos de *T. gondii* do que IgG presentes em amostras de colostro.

Contudo, esse não foi o caso para o anticorpo IgA, porque encontramos uma fraca correlação entre os níveis desse isótipo nas amostras de soro e colostro, além disso os ensaios *Immunoblotting* mostraram que os anticorpos IgA específicos presentes nas amostras de colostro reconheceram mais frações antigênicas em comparação com a IgA sérica. Isso está de acordo com a literatura, que mostra que a maioria da IgA é sintetizada por plasmócitos presentes na glândula mamária, originários do tecido linfoide associado à mucosa (GALT) (HURLEY; THEIL, 2011).

A detecção sorológica de anticorpos IgM anti-*T. gondii* é considerado o principal marcador de infecção aguda, quando associado a níveis ascendentes de IgG (CAMARGO et al., 1978). Porém, frequentemente são encontrados resultados falso-positivos e falso-negativos, devido à possível permanência dessa imunoglobulina por longos períodos em alguns pacientes, e pela baixa sensibilidade das técnicas diagnósticas (SENSINI, 2006), por isso, sempre é um desafio a interpretação dos resultados de IgM. Por esse motivo, a detecção de anticorpos IgA específicos e anticorpos IgG específicos de baixa avidéz foram posteriormente também propostos como marcadores de infecção recente. No entanto, um resultado negativo de IgA não exclui uma infecção aguda, e um resultado positivo de IgA não indica necessariamente uma infecção aguda. (CAMARGO et al., 1991; SENSINI, 2006). No presente estudo, pudemos observar que tanto no soro como no leite houve correlação positiva significativa entre os níveis de IgM e IgA, portanto a combinação das duas imunoglobulinas tem grande importância diagnóstica. Além disso, também demonstramos que houve correlação positiva significativa quando foram comparados os níveis de IgM do soro e do colostro, isso significa que o leite pode ser a amostra biológica de escolha para a realização do teste de diagnóstico de toxoplasmose.

Chardès e colaboradores (1990) demonstraram a presença de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos a *T. gondii* em amostra de soro, em secreções intestinais e no leite de

camundongos oralmente infectados com cistos do parasito. Eles também mostraram que o anticorpos IgG presentes no soro e no leite reconheceram mais frações antigênicas de *T. gondii* do que os isótipos IgA e IgM, e a maioria dos antígenos reconhecidos por IgA foram também detectados por IgG. Isso está de acordo com os nossos resultados para amostras de soro e colostro humano. Além disso, eles mostraram que os anticorpos murinos presentes em diferentes amostras biológicas detectaram as mesmas frações antigênicas de *T. gondii*; isso também vai de acordo com nosso trabalho, que em ambas as amostras biológicas humanas não houve produção de anticorpos a diferentes frações antigênicas, ou seja, não houve fração antigênica detectada exclusivamente por anticorpos de uma única localidade.

Embora a fração antigênica de 39 kDa tenha sido reconhecida por anticorpos IgG e IgA do soro e do colostro em menos de 25% das amostras, ela foi reconhecida por anticorpos IgG séricos das três puéperas cujos bebês tiveram a manifestação congênita de toxoplasmose, e também foi detectada por anticorpos IgA do colostro de duas dessas mulheres. Portanto, a fração de 39 kDa de *T. gondii* pode ser um marcador para diagnóstico de toxoplasmose congênita, sendo necessário mais estudos para determinar a relação dessa fração antigênica com a infecção congênita. Adicionalmente, a fração de 60 kDa de *T. gondii* pode ser um bom marcador para o diagnóstico de infecção aguda por toxoplasmose, pois ela foi frequentemente reconhecida por anticorpos IgG de baixa avidéz em amostras de soro e colostro. Enquanto que as frações de 22, 30, 38 e 54 kDa podem ser bons marcadores para infecção por toxoplasmose, independente da fase da infecção, pois foram frequentemente reconhecidas por anticorpos IgG de alta avidéz, para ambas amostras biológicas. Esses resultados diferem parcialmente com os obtidos por Marcolino e colaboradores (2000), que demonstraram as frações de 38 e 54 kDa como bons marcadores de diagnóstico para a fase recente da toxoplasmose, devido à baixa avidéz dos anticorpos IgG séricos que as reconheceram; mas concordam no que diz respeito à fração de 60 kDa. As frações de 22 e 30 kDa correspondem a

dois antígenos de superfície imunodominantes do parasito, SAG2 e SAG1, respectivamente (KASPER; CRABB; PFEFFERKORN, 1983; JUNG; LEE; GRIGG, 2004), o que justifica a alta frequência de detecção dessas duas frações antigênicas. Já foi demonstrado que anticorpos monoclonais (mAb) específicos para SAG1 reconhecem epítomos conformacionais dessa proteína na forma monomérica (30 kDa) e também na forma dimérica (60 kDa) (HE et al., 2002; CARVALHO et al. 2008), sendo assim, podemos sugerir que a fração antigênica de 60 kDa, reconhecida com baixa avidéz no presente trabalho, seja a SAG1 na forma dimérica.

Guglietta e colaboradores (2007) demonstraram que recém-nascidos com toxoplasmose congênita demonstram em geral uma resposta imune deficitária de células T *helper* contra o parasito, sendo que a aquisição de uma resposta imunológica efetora é dependente da idade, ou seja, ela evolui progressivamente durante a infância, atingindo, por volta dos quatro anos de idade, propriedades semelhantes à resposta de adultos imunocompetentes que adquiriram toxoplasmose. A imunidade materna pode limitar a transmissão e o desenvolvimento de infecções no feto e no recém-nascido, pois anticorpos IgG maternos desempenham um papel protetor da toxoplasmose congênita, por reduzir a parasitemia materna na placenta e também por ser transferido ao feto através da placenta (CARLIER et al., 2012; CORREA et al., 2007; REDLINE, 2006). Nossos resultados demonstraram que o colostro materno apresentou altos níveis de anticorpos IgG específicos à *T. gondii*, portanto o leite humano pode ser também uma possível fonte de anticorpos IgG protetores. Além disso, demonstramos que no colostro humano também havia anticorpos IgA anti-*T. gondii*, e esse isótipo de imunoglobulina é classicamente descrito como adaptado para persistir nas membranas mucosas respiratória e gastrointestinal e resistir à digestão proteolítica, promovendo um revestimento protetor nas superfícies mucosas da criança, que previne o contato de patógenos com o epitélio (CARBONARE; CARNEIRO-SAMPAIO, 2002, HANSON et al., 2003, LONNERDAL, 2004, JACKSON; NAZAR, 2006,

PARAMASIVAM et al., 2006). No entanto, são necessários mais estudos que demonstrem se esses anticorpos específicos a *T. gondii*, evidenciados no leite humano das pacientes soropositivas para o parasito, possuem atividade protetora para o neonato, podendo desempenhar funções imunológicas importantes como neutralização do parasito, fagocitose e lise pelo complemento.

O leite humano é o alimento ideal para o neonato devido à sua rica composição de nutrientes juntamente com componentes bioativos que garantem a sobrevivência e o desenvolvimento infantil saudável. Por isso, os estudos sobre a composição do leite humano tem aumentado significativamente, com o objetivo de cada vez entender melhor esse alimento completo (BALLARD; MORROW, 2013). Considerando a falta de dados que comprovem a transmissão de *T. gondii* através da amamentação materna em seres humanos, e o fato de que mães infectadas podem eficientemente transferir diferentes isótipos de anticorpos parasito-específicos ao recém-nascido pelo leite, a amamentação não deve ser descontinuada se a mulher for infectada pelo parasito. Ainda, com nossos resultados podemos sugerir que o uso de amostras de leite humano poderá contribuir para o diagnóstico de toxoplasmose aguda, o que possibilitará melhor atenção aos bebês das mães infectadas, prevenindo graves sequelas tardias da doença.





## *7. Conclusões*

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que:

- A detecção de anticorpos IgG, IgM e IgA anti-*T. gondii* em amostras paralelas de soro e colostro de pacientes infectadas demonstra significativa correlação;
- Estes três isótipos de imunoglobulinas reconhecem frações antigênicas do parasito com características moleculares similares em ambas as amostras biológicas;
- A fração antigênica de 39 kDa do parasito foi reconhecida pelas amostras biológicas das três pacientes cujos bebês manifestaram toxoplasmose congênita, sendo, portanto, um possível marcador de infecção congênita;
- A fração antigênica de 60 kDa do parasito foi frequentemente detectada por anticorpos IgG de baixa avidéz, nas amostras de soro e principalmente de colostro, constituindo-se, portanto, num possível marcador de fase aguda da infecção;
- O leite humano é uma amostra biológica que pode ser coletada de forma não invasiva, por isso pode ser uma alternativa para o diagnóstico de toxoplasmose aguda, bem como de toxoplasmose congênita.



## *8. Referências*

AMIN, A.; MAZLOOMZADEH, S.; HANILOO, A.; MOHAMMADIAN, F.; FAZAELI, A. Evaluation of anti-Toxoplasma IgG, IgM, and IgA in mothers with spontaneous abortion in Zanjan, Northwest Iran. **The Korean Journal of Parasitology**, Seoul, v. 50, n. 4, p. 371-374, 2012.

ARAÚJO-ANDRADE, C.; PICHARDO-MOLINA, J. L.; BARBOSA-SABANERO, G.; FRAUSTO-REYES, C.; TORRES-LÓPEZ, A. Detection of the presence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in human colostrum by Raman spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Biomedical Optics**, Bellingham, v. 12, n. 3, 2007.

BAHNA, S. L.; KELLER, M. A.; HEINER, D. C. IgE and IgD in human colostrum and plasma. **Pediatric Research**, Basel, v. 16, n. 8, p. 604-607, 1982.

BALLARD, O.; MORROW, A. L. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 60, n. 1, p. 49-74, 2013.

BESTEIRO, S.; DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. The moving junction of apicomplexan parasites: a key structure for invasion. **Cellular Microbiology**, England, v. 13, n. 6, p. 797–805, 2011.

BONAMETTI, A. M.; PASSOS, J. N.; KOGA da SILVA, E. M.; MACEDO, Z. S. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 43, n. 2, p. 116, 1997.

BRANDTZAEG, P. Mucosal immunity: Integration between mother and the breast-fed infant. **Vaccine**, Amsterdam, v. 21, n. 24, p. 3382–3388, 2003.

BRANDTZAEG, P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. **The Journal of Pediatrics**, St. Louis, v. 156, S8–S15, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos**. Brasília: Anvisa, 2008. 160 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Atenção ao pré-natal de baixo risco**. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 318 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos) (Cadernos de Atenção Básica, n° 32).

BRASIL. Ministério da Saúde. Organização Pan-Americana da Saúde. **Guia alimentar para crianças menores de dois anos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 152 p. (Série A. Normas e manuais técnicos, n. 107).

CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; MINEO, J. R.; TAKIGUTI, C. K.; NAKAHARA, O. S. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. **Infection and Immunity**, Washington, v. 21, n.1, p. 55-58, 1978.

CAMARGO, M. E.; SILVA, S. M.; LESER, P. G.; GRANATO, C. H. Avidéz de anticorpos IgG específicos como marcadores de infecção primária recente pelo *Toxoplasma gondii*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 213-218, 1991.

CARBONARE, S. B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Composição do leite humano - aspectos imunológicos. In: REGO, J.D. (Ed) **Aleitamento Materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 83-97.

CARLIER, Y.; TRUYENS, C.; DELORON, P.; PEYRON, F. Congenital parasitic infections: a review. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 121, n. 2, p. 55-70, 2012.

CARVALHO, F. R.; SILVA, D. A. O.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, M. A.; OLIVEIRA, T. C.; BÉLA, S. R.; FARIA, G. G.; LOPES, C. S.; MINEO, J. R. Reverse enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies against SAG1-related sequence, SAG2A, and p97 antigens from *Toxoplasma gondii* to detect specific immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA antibodies in human sera. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 8, p. 1265-1271, 2008.

CASTELLOTE, C.; CASILLAS, R.; RAMÍREZ-SANTANA, C.; PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M.; MORETONES, M. G.; LÓPEZ-SABATER, M. C.; FRANCH, A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrums and transitional and mature human milk. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 141, n. 6, p. 1181-1187, 2011.

CHARDÈS, T.; BOURGUIN, I.; MEVELEC, M. N.; DUBREMETZ, J. F.; BOUT, D. Antibody responses to *Toxoplasma gondii* in sera, intestinal secretions, and milk from orally infected mice and characterization of target antigens. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 1240-1246, 1990.

CHOI, W. Y.; NAM, H. W.; YOUN, J. H.; KIM, D. J.; KONG, Y.; KANG, S. Y.; CHO, S. Y. Detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid to *Toxoplasma gondii* by indirect latex agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay. **Kisaengchunghak Chapchi**, Seoul, v. 30, n. 2, p. 83-90, 1992.

CLEARY, T. G. Human milk protective mechanisms. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 554, p. 145-154, 2004.

CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L. B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C. P. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, n. 12, p. 651-660, 2007.

COUPER, K. N.; ROBERTS, C. W.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J.; JOHNSON, L. L. *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin M limits parasite dissemination by preventing host cell invasion. **Infection and Immunity**, Oxford, v. 73, n. 12, p. 8060-8068, 2005.

DOLLFUS, H.; DUREAU, P.; HENNEQUIN, C.; UTEZA, Y.; BRON, A.; DUFIER, J. L. Congenital toxoplasma chorioretinitis transmitted by preconceptionally immune women. **The British Journal of Ophthalmology**, London, v. 82, n. 12, p. 1444-1445, 1998.

DUBEY, J. P. Toxoplasmosis. **Veterinary Clinics of North American – Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 1389-1404, 1987.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 269-299, 1998.

ELBEZ-RUBINSTEIN, A.; AJZENBERG, D.; DARDÉ, M. L.; COHEN, R.; DUMÈTRE, A.; YEAR, 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 diseases**, Chicago, v. 199, n. 2, p.280-285, 2009.

EUCLYDES, M.P. **Nutrição do lactente, base científica para uma alimentação saudável**, 3ª ed. Viçosa: Suprema, 2005. 548 p.

GAVINET, M. F.; ROBERT, F.; FIRTION, G.; DELOUVRIER, E.; HENNEQUIN, C.; MAURIN, J. R.; TOURTE-SCHAEFER, C.; DUPOUY-CAMET, J. Congenital toxoplasmosis due to maternal reinfection during pregnancy. **Journal of Clinical Microbiology**, New York, v. 35, n. 5, p. 1276-1277, 1997.

GOLDMAN, A. S. The immune system of human milk: Antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. **Pediatric Infectious Disease**, Baltimore, v. 12, n. 8, p. 664-671, 1993.

GUGLIETTA, S.; BEGHETTO, E.; SPADONI, A.; BUFFOLANO, W.; DEL PORTO, P.; GARGANO, N. Age-dependent impairment of functional helper T cell responses to immunodominant epitopes of *Toxoplasma gondii* antigens in congenitally infected individuals. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 2, p. 127-133, 2007.

HAMOSH, M. Bioactive Factors in Human Milk. In: SCHANLER, R. J. (Ed) **The Pediatric Clinics of North America: The evidence for breastfeeding**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001, p. 69-86.

HANSON, L.A. Session 1: feeding and infant development breast-feeding and immune function. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 66, p. 384–396, 2007.

HANSON, L.A.; KOROTKOVA, M.; LUNDIN, S.; HAVERSEN, L.; SILFVERDAL, S.; MATTSBY-BALTZER, I.; STRANDVIK, B. S.; TELEMO, E. The transfer of immunity from mother to child. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 987, p. 199–206, 2003.

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**, New York, v. 9, n. 8, p.606-611, 2002.

HOTOP, A.; HLOBIL, H.; GROSS, U. Efficacy of rapid treatment initiation following primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 55, n 11, p. 1545-1552, 2012.

HURLEY, W. L.; THEIL, P. K. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. **Nutrients**, Basel, v. 3, n. 4, p. 442-474, 2011.

JACKSON, K. M.; NAZAR, A. M. Breastfeeding, the immune response, and long-term health. **The Journal of the American Osteopathic Association**, Chicago, v. 106, n. 4, p. 203-207, 2006.

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

KASPER, L. H.; CRABB, J. H.; PFEFFERKORN, E. R. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, n. 5, p. 2407-2412, 1983.

KODJIKIAN, L.; HOIGNE, I.; ADAM, O.; JACQUIER, P.; AEBI-OCHSNER, C.; AEBI, C.; GARWEG, J. G. Vertical transmission of toxoplasmosis from a chronically infected immunocompetent woman. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 23, n. 3, p. 272-274, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. Composição do leite humano – Fatores nutricionais. In: REGO, J. D. (Ed) **Aleitamento Materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 47-58.

LANGER, H. Repeated congenital infection with *Toxoplasma gondii*. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 21, p. 318-329, 1963.

LAWRENCE, R. A.; LAWRENCE, R. M. **Breastfeeding: a guide for the medical profession**. 6th. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005. 1152 p.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: the changing paradigm of congenital toxoplasmosis. **Parasitology**, London, v. 138, p. 1829–1831, 2011.

LIPSKA, A.; WYSOCKA, J.; TUROWSKI, D. Immune response and diagnostic aspects during *Toxoplasma gondii* infection. **Wiadomości parazytologiczne**, Warszawa, v. 46, n. 3, p. 315-325, 2000.

LIU, L.; LIU, T.; YU, L.; CAI, Y.; ZHANG, A.; XU, X.; LUO, Q.; HU, Y.; SONG, W.; LUN, Z.; LU, F.; WANG, Y.; SHEN, J. rROP2(186-533): a novel peptide antigen for detection of IgM antibodies against *Toxoplasma gondii*. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2012.

LÖNNERDAL, B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 554, p. 11–25, 2004.

MAKITA, K.; HAYAKAWA, Y.; OKAME, M.; HOMMA, K.; PHAN, T. G.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. First detection of IgA against norovirus in breast milk. **Clinical Laboratory**, Heidelberg, v. 53, n. 3-4, p. 125–128, 2007.



MARCOLINO, P. T.; SILVA, D. A. O.; LESER, P. G.; CAMARGO, M. E.; MINEO, J. R. Molecular markers in acute and chronic phases of human toxoplasmosis: determination of immunoglobulin G avidity by Western blotting. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, n. 3, p. 384-389, 2000.

MATSUI, D. Prevention, diagnosis, and treatment of fetal toxoplasmosis. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 21, n.3, p. 675-689, 1994.

MATTOS, C. C. B.; SPEGIORIN, L. C. J. F.; MEIRA, C. S.; SILVA, T. C.; FERREIRA, A. I. C.; NAKASHIMA, F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; MATTOS, L. C. Anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in pregnant women and their newborn infants in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 129, n. 4, p. 261-266, 2011.

McAULEY, J.; BOYER, K. M.; PATEL, D.; METS, M.; SWISHER, C.; ROIZEN, N.; WOLTERS, C.; STEIN, L.; STEIN, M.; SCHEY, W.; REMINGTON, J.; MEIER, P.; JOHNSON, D.; HEYDEMAN, P.; HOLFELS, E.; WITHERS, S.; MACK, D.; BROWN, C.; PATTON, D.; MCLEOD, R. Early and longitudinal evaluations of treated infants and children and untreated historical patients with congenital Toxoplasmosis: The Chicago Collaborative Treatment Trial. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 18, n. 1, p. 38-72, 1994.

MEIRELLES FILHO, J. Toxoplasmose e gravidez: inquérito sorológico em gestantes e seus recém-nascidos na Maternidade-Escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 9, p. 393-401, 1985.

MELAMED, J.; ECKERT, G. U.; SPADONI, V. S.; LAGO, E. G.; UBERTI, F. Ocular manifestations of congenital toxoplasmosis. **Eye**, London, v. 24, n. 4, p. 528-534, 2010.

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**, Bethesda, v. 27, n. 2, p. 283-287, 1980.

MINEO, J. R.; CAMARGO, M. E.; FERREIRA, A. W.; ALMEIDA, G. Research on IgM anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by using a reverse immunoenzymatic technique. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 6-11, 1986.

MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O.; SOPELETE, M. C.; LEAL, G. S.; VIDIGAL, L. H. G.; TÁPIA, L. E. R.; BACCHIN, M. I Medidas de biossegurança em pesquisa na área biomédica. In: **Pesquisa na área biomédica: do planejamento à publicação**. 1ª edição, ed. EDUFU, 2005. p. 81-111.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**, London, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 554-566, 2008.

MOTA-FERREIRA, D. M. L.; GONÇALVES-PIRES, M. R. F.; JÚNIOR, A. F.; SOPELETE, M. C.; ABDALLAH, V. O. S.; COSTA-CRUZ, J. M. Specific IgA and IgG antibodies in paired serum and breast milk samples in human strongyloidiasis. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 109, n. 2, p. 103-107, 2009.

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

NÓBREGA, M. C.; MAGALHÃES, V.; ALBUQUERQUE, Y.; MAGALHÃES, C.; ARCOVERDE, C.; CASTRO, C. Toxoplasmose em gestantes e em seus recém-nascidos, atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. **Revista Brasileira de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 59, p. 23-29, 1999.

PALMEIRA, P.; CARBONARE, S. B.; AMARAL, J. A.; TINO-DE-FRANCO, M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **European Journal of Pediatrics**, Berlin, v. 164, n. 1, p. 37-43, 2005.

PARAMASIVAM, K.; MICHIE, C.; OPARA, E.; JEWELL, A.P. Human breast milk immunology: a review. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, Port Washington, v. 51, n. 5, p. 208-217, 2006.

PORTER, S. B.; SANDE, M. A. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 327, n. 23, p.1643-1648, 1992.

REDLINE, R. W. Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, Amsterdam, v. 11, n. 5, p. 296-301, 2006.

RIBEIRO, D. P.; FREITAS, M. M. P.; CARDOSO, M. R. D.; PAJUABA, A. C. A. M.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; SILVA, J. S.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. O. CpGODN combined with *Neospora caninum* lysate, but not with excreted-secreted antigen, enhances protection against infection in mice. **Vaccine**, Amsterdam, v. 27, n. 19, p. 2570-2579, 2009.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 248, n. 14, p. 1728-1732, 1982.

SADEHARJU, K.; KNIP, M.; VIRTANEN, S. M.; SAVILAHTI, E.; TAURIAINEN, S.; KOSKELA, P.; AKERBLUM, H. K.; HYÖTY, H.; FINNISH TRIGR STUDY GROUP. Maternal antibodies in breast milk protect the child from enterovirus infections. **Pediatrics**, London, v. 119, n. 5, p. 941-916, 2007.

SCHULTZ, C. L.; COFFMAN, R. L. Control of isotype switching by T cells and cytokines. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 350-354, 1991.

SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 139, n. 1, p. 221-227, 1987.

SEGUNDO, G. R. S.; SILVA, D. A. O.; MINEO, J. R.; FERREIRA, M. S. Congenital toxoplasmosis in Uberlândia, MG, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 50, n. 1, p. 50-53, 2004.

SENSINI, A. *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy: opportunities and pitfalls of serological diagnosis. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 504-512, 2006.

SILVA, A. P.; SOUZA, N. Prevalência do aleitamento materno. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 301-310, 2005.

SILVA, D. A. O.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W. P.; PAJUABA NETO, A. A.; FERRO, E. A.; MINEO, J. R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 107, n. 3, p.181-195, 2002.

SILVA, F. F. **Qualidade do leite materno em banco de Leite humano: aspectos bacteriológicos, físico-químicos e perfil de aminas bioativas**. 2008. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.

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

SUCCI, R. C. M. Doenças Maternas e Aleitamento Natural. In: REGO, J. D. (Ed) **Aleitamento Materno**. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 165- 173.

TENTER, A. M. Current knowledge on the epidemiology of infectious with *Toxoplasma*. **Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine**, Tokyo, v. 23, p. 391, 1999.

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

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

VARELLA, I. S.; WAGNER, M. B.; DARELA, A. C.; NUNES, L. M.; MÜLLER, R. W. Prevalência de soropositividade para toxoplasmose em gestantes. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 1, p. 69-74, 2003.

VAZ, A. J.; GUERRA, E. M.; FERRATTO, L. C. C.; TOLEDO, L. A. S.; AZEVEDO NETO, R. S. Sorologia positiva para sífilis, toxoplasmose e doença de Chagas em gestantes de primeira consulta em centros de saúde da área metropolitana, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 373-379, 1990.

VILLENA, I.; CHEMLA, C.; QUEREUX, C.; DUPOUY, D.; LEROUX, B.; FOUADRINIER, F.; PINON, J. M. Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis transmitted by an immunocompetent woman infected before conception. Reims Toxoplasmosis Group. **Prenatal Diagnosis**, Chichester, v. 18, n. 10, p. 1079-1081, 1998.

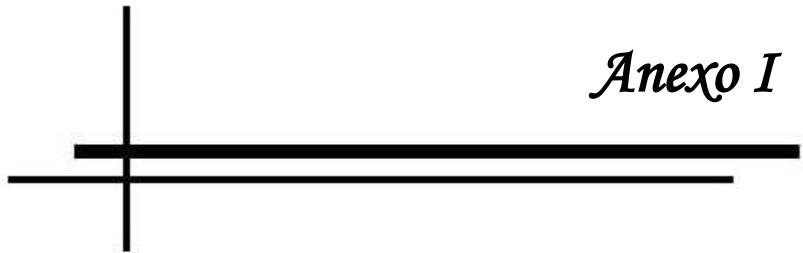
VOGEL, N.; KIRISITS, M.; MICHAEL, E.; BACH, H.; HOSTETTER, M.; BOYER, K.; SIMPSON, R.; HOLFELS, E.; HOPKINS, J.; MACK, D.; METS, M. B.; SWISHER, C. N.; PATEL, D.; ROIZEN, N.; STEIN, L.; STEIN, M.; WITHERS, S.; MUI, E.; EGWUAGU, C.; REMINGTON, J.; DORFMAN, R.; McLEOD, R. Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 23, n. 5, p. 1055-1060, 1996.

WHITMORE, A. C.; PROWSE, D. M.; HAUGHTON, G.; ARNOLD, L. W. Ig isotype switching in B lymphocytes. The effect of T cell-derived interleukins, cytokines, cholera toxin, and antigen on isotype switch frequency of a cloned B cell lymphoma. **International Immunology**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 95-103, 1991.

WHO. World Health Organization. **Infant and young child nutrition: global strategy on infant and young child feeding.** Geneva, WHA 55, 2002.

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

*Anexo I*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG****PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** Quantificação e caracterização da atividade de anticorpos pertencentes aos isotipos IgM, IgG, IgA e IgD, presentes em amostras de soro e leite humano de puérperas, específicos a antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 02023412.7.0000.5152

**Pesquisador:** José Roberto Mineo

**Instituição:** Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 104.110

**Data da Relatoria:** 03/08/2012

**Apresentação do Projeto:**

Quantificação e caracterização da atividade de anticorpos pertencentes aos isotipos IgM, IgG, IgA e IgD, presentes em amostras de soro e leite humano de puérperas, específicos a antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*

**Objetivo da Pesquisa:**

Quantificar e caracterizar a atividade dos isotipos IgM, IgG, IgA e IgD específicos a antígenos de *Toxoplasma gondii*, presentes em amostras de soro e leite humano de puérperas, bem como sua avidéz aos diversos antígenos solúveis do parasito, previamente selecionados por métodos de fracionamento.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Por ser uma pesquisa com seres humanos, sabe-se que existem certos riscos envolvidos na sua execução. Todos os procedimentos de coleta, manuseio de materiais biológicos e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, serão realizados de acordo com as normas de biossegurança compatíveis (MINEO et al., 2005). No entanto, os riscos às puérperas do estudo são mínimos.

**Benefícios :** A puérpera que por ventura não saiba que é soropositivo para *Toxoplasma gondii*, com infecção aguda, poderá se informar e tomar os devidos cuidados com relação à necessidade e adequação de um tratamento, bem como acompanhamento e tratamento para seu bebê caso seja necessário.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa muito relevante que irá acrescentar muito em medidas para as parturientes com relação ao leite materno e avaliação da possibilidade de serem protadoras de *T. Gongi* e prevenção.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE esta adequado.

**Recomendações:**

Sem recomendações.

**Endereço:** Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

**Bairro:** Santa Mônica

**CEP:** 38.408-144

**UF:** MG

**Município:** UBERLÂNDIA

**Telefone:** (34)3239-4131

**Fax:** (34)3239-4335

**E-mail:** cep@propp.ufu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
UBERLÂNDIA/MG



**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Data de entrega do Relatório final: agosto de 2013.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

**Orientações ao pesquisador**

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

¿ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária ¿ ANVISA ¿ junto com seu posicionamento.

¿ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLÂNDIA, 22 de Setembro de 2012

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br







Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Laboratório de Imunoparasitologia

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Quantificação e caracterização da atividade de anticorpos pertencentes aos isotipos IgM, IgG, IgA e IgD, presentes em amostras de soro e leite humano de puérperas, específicos a antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*”**, cujo principal objetivo é estudar os anticorpos presentes no leite de humano, específicos contra o agente causador de toxoplasmose: *Toxoplasma gondii*.

Durante esta pesquisa, a coleta de seus dados, e a coleta de três amostras de leite humano (cerca de 5mL por amostra) serão realizados na Enfermaria de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU) e/ou no Banco de Leite Humano do HC-UFU. Não será necessário coletar seu sangue, pois utilizaremos o restante da amostra que já foi colhida pelo laboratório do hospital para fazer seus exames de rotina.

Fica assegurado que essa pesquisa terá finalidade exclusivamente científica, que em nenhum momento você será identificada. Na publicação dos resultados desta pesquisa, sua identidade e informações relacionadas com a sua privacidade serão mantidas no mais rigoroso sigilo.

Neste estudo nem você nem seu bebê serão expostos a nenhum tipo de teste de substâncias ou drogas. Sabe-se que em pesquisa com seres humanos existem certos riscos envolvidos na sua execução. Sendo assim, todo o procedimento de coleta de leite será realizado com utilização de equipamentos de proteção, para minimizar qualquer risco possível de infecção. A pesquisa também lhe proporciona alguns benefícios, você poderá se informar se é soropositivo para toxoplasmose e tomar os devidos cuidados com relação à necessidade e adequação de um tratamento, bem como acompanhamento e tratamento para seu bebê caso seja necessário. Além disso, receberá orientações adequadas sobre amamentação no Banco de Leite Humano, nos dois retornos agendados para a coleta da 2ª e 3ª amostras de leite humano.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar desta pesquisa, e você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com esta pesquisa. Você é livre para se retirar da pesquisa a qualquer momento em que desejar sem necessidade prévia de explicações, e sem nenhum prejuízo.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você, e no caso de surgir qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

### Pesquisadores

Mestranda: Ana Carolina de Moraes Oliveira  
Universidade Federal de Uberlândia  
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, andar inferior,  
Campus Umuarama, Uberlândia, MG  
Tel: (34) 3218-2195

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Universidade Federal de Uberlândia  
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, andar inferior,  
Campus Umuarama, Uberlândia, MG  
Tel.: (34) 3218-2195/ 3218- 2058

Você poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

---

Assinatura do pesquisador

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da Pesquisa





Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Laboratório de Imunoparasitologia

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O MENOR

Sua filha está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Quantificação e caracterização da atividade de anticorpos pertencentes aos isotipos IgM, IgG, IgA e IgD, presentes em amostras de soro e leite humano de puérperas, específicos a antígenos solúveis de *Toxoplasma gondii*”**, cujo principal objetivo é estudar os anticorpos presentes no leite de humano, específicos contra o agente causador de toxoplasmose: *Toxoplasma gondii*.

Durante esta pesquisa, a coleta dos dados de sua filha, e a coleta de três amostras de leite humano (cerca de 5mL por amostra) serão realizados na Enfermaria de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU) e/ou no Banco de Leite Humano do HC-UFU. Não será necessário coletar sangue, pois utilizaremos o restante da amostra que já foi colhida pelo laboratório do hospital para fazer os exames de rotina.

Fica assegurado que essa pesquisa terá finalidade exclusivamente científica, que em nenhum momento ela será identificada. Na publicação dos resultados desta pesquisa, identidade e informações relacionadas com a privacidade de sua filha serão mantidas no mais rigoroso sigilo.

Neste estudo nem sua filha nem seu bebê serão expostos a nenhum tipo de teste de substâncias ou drogas. Sabe-se que em pesquisa com seres humanos existem certos riscos envolvidos na sua execução. Sendo assim, todo o procedimento de coleta de leite será realizado com utilização de equipamentos de proteção, para minimizar qualquer risco possível de infecção. A pesquisa também proporciona à sua filha alguns benefícios, ela poderá se informar se é soropositivo para toxoplasmose e tomar os devidos cuidados com relação à necessidade e adequação de um tratamento, bem como acompanhamento e tratamento para seu bebê caso seja necessário. Além disso, receberá orientações adequadas sobre amamentação no Banco de Leite Humano, nos dois retornos agendados para a coleta da 2ª e 3ª amostras de leite humano.

Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar desta pesquisa, e você terá a garantia de receber resposta a qualquer pergunta, ou esclarecimento a qualquer dúvida em relação aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com esta pesquisa. Você é livre para interromper a participação de sua filha da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma cópia deste Termo de Esclarecimento ficará com você, e no caso de surgir qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com:

### Pesquisadores

Mestranda: Ana Carolina de Moraes Oliveira  
Universidade Federal de Uberlândia  
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, andar inferior,  
Campus Umuarama, Uberlândia, MG  
Tel: (34) 3218-2195

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Universidade Federal de Uberlândia  
Avenida Pará, 1720 Bloco 4C, andar inferior,  
Campus Umuarama, Uberlândia, MG  
Tel.: (34) 3218-2195/ 3218- 2058

Você poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia –MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

---

Assinatura do pesquisador

Eu aceito que minha filha participe do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Assinatura do Responsável Legal pelo participante da Pesquisa