

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação e Caracterização de Antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* Ligantes de Concanavalina A (Con-A) através de Immunoblotting

Daniella Azevedo Mendes

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a Obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação e Caracterização de Antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* Ligantes de Concanavalina A (Con-A) através de Immunoblotting

Daniella Azevedo Mendes

José Roberto Mineo

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal de Uberlândia, para a Obtenção do grau de
bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho - 2005

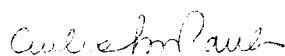
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação e Caracterização de Antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* Ligantes de Concanavalina A (Con-A) através de Immunoblotting

Daniella Azevedo Mendes

José Roberto Mineo
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela Coordenação do Curso
de Ciências Biológicas em 24/02/05



Coordenadora do Curso

Uberlândia – MG
Julho - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Purificação e Caracterização de Antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* Ligantes de Concanavalina A (Con-A) através de Immunobloting

Daniella Azevedo Mendes

Aprovada pela banca Examinadora em: 27 / 07 / 05 Nota: 90,0



Prof. Dr. José Roberto Mineo



Prof. Dr. Margareth Leitão Gennari Cardoso



Prof. Dr. Danielle Reis Napolitano

Uberlândia, 12 de julho de 2005

Purificação e Caracterização de Antígenos de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* Ligantes de Concanavalina A (Con-A) através de Immunoblotting.

Daniella Azevedo Mendes, Margareth Leitão Gennari Cardoso, Flávia Andrade Chaves Borges, José Roberto Mineo
Universidade Federal de Uberlândia; Instituto de Ciências Biomédicas; Laboratório de Imunologia

RESUMO

O *Toxoplasma gondii* é um parasita protozoário causador da toxoplasmose, infecção que pode se desenvolver com diferentes formas clínicas. *T.gondii* se apresenta de formas diferentes dependendo de seu estágio de evolução. A forma taquizoíta se manifesta na fase aguda da infecção e tem um papel importante no diagnóstico da doença. Vários antígenos de *T.gondii* têm sido propostos para utilização no diagnóstico da toxoplasmose. O método sorológico é o mais utilizado para a detecção da doença. Esses métodos sorológicos confirmam estágios específicos em pacientes infectados, segundo os antígenos detectados. Dentre as metodologias utilizadas para o isolamento e caracterização desses antígenos, as lectinas se tornam ferramentas importantes para a detecção de antígenos glicosilados, que podem ser altamente imunogênicos.

Neste estudo, utilizou-se a cromatografia de afinidade para isolar frações antigênicas de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* com afinidade para Concanavalina A.

Estas frações antigênicas foram denominadas EatTg-ConA (Extrato Antigênico de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ligantes de Concanavalina A). A análise eletroforética desse extrato antigênico (EatTg-ConA) em SDS-PAGE apresentou frações moleculares de massa molecular aparente de 22 kDa e 64 kDa. Verificamos através de Western blotting que tais frações foram reativas com soros de pacientes infectados em diferentes fases da doença. As frações moleculares de massa aparente de 22 kDa foram visíveis no extrato de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, bem como no EatTg-ConA. Houve forte reação com a IgG de fase crônica do EatTg-ConA, assim como com IgG de fase crônica e aguda do extrato bruto da preparação antigênica do parasito. As bandas de 64 kDa foram visíveis no extrato de taquizoítos de *T. gondii* e no EatTg-ConA apenas na fase crônica da doença. Os EatTg-ConA de alto peso molecular 177 e 159 kDa apresentaram maior frequência de reatividade frente a todos os soros IgG de fase aguda e crônica e IgM, se repetindo em 100 % dos soros. Na preparação antigênica EatTg-ConA do presente estudo, quando analisamos a eletroforese em SDS-PAGE e coloração pela prata, observamos uma fraca coloração do material nessa porção do gel.

No nosso estudo contribuimos para o desenvolvimento de novas técnicas para separação e caracterização parcial de antígenos de taquizoítos de *T.gondii* ligantes de Con-A e verificamos se tais frações antigênicas reagiram com soros de pacientes infectados em diferentes fases de infecção da toxoplasmose.

PALAVRAS-CHAVE: *Toxoplasma gondii*, taquizoítos, lectinas.

INTRODUÇÃO

O protozoário parasita *Toxoplasma gondii* é altamente prevalente na natureza. É o agente causador da toxoplasmose, infecção que pode se desenvolver com diferentes formas clínicas (Kong *et al.* 2003).

T.gondii pertence ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia, se apresenta de várias formas diferentes, dependendo de seu estágio de evolução. A forma taquizoíta, se manifesta na fase aguda da infecção, é de rápida multiplicação e tem um papel importante no diagnóstico da doença, pois causa uma forte resposta inflamatória e destruição do tecido com conseqüentes evidências de manifestações clínicas nos pacientes. Os bradizoítos, são a forma encontrada na fase crônica da doença, de lenta multiplicação. Encontram-se aglomerados em cistos, que são resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro, e por isso, fundamentais na transmissão da doença. Os oocistos, que contém os esporozoítos, estão presentes nas fezes dos gatos numa forma infectante, se ingeridos pelos homens, que posteriormente evoluirão para a forma de taquizoítos (Montoya.2004). *T.gondii* possui um ciclo de vida heteroxeno, reproduzindo sexuadamente em felídeos, seus hospedeiros definitivos, e tem o homem como hospedeiro intermediário, onde se reproduz assexuadamente. A infecção é adquirida principalmente pela ingestão de comida ou bebida que estejam contaminados com oocistos, ou alimentos crus onde se encontram cistos teciduais (Neves.2002). Segundo Iglesias (1997), no Brasil a toxoplasmose ocorre entre 30 e 80% da população. É uma infecção capaz de atingir todas as faixas etárias, sendo mais grave em imunocomprometidos, crianças recém-nascidas e transplantados. Nos imunocomprometidos pode induzir sérias enfermidades (McCabe e Remington.1988; Luft

*et al.*1983). Já em indivíduos imunocompetentes, o parasito geralmente conduz a uma infecção assintomática (Myoung-hee Ahn *et al.* 1997). Neste caso, os indivíduos desenvolvem uma resposta imunológica com padrão I de citocinas de linfócitos T auxiliares (T helper), induzindo a uma imunidade protetora ao longo da vida contra uma reinfecção (Godard *et al.*1994). Além disso, a multiplicação dos taquizoítos é normalmente inibida por mecanismos imunológicos que favorecem a formação de cistos contendo bradizoítos (Soete *et al.*1993).

É interessante determinar antígenos que possam ser muito utilizados para diagnósticos, bem como quais os antígenos que são responsáveis pelo desenvolvimento dos mecanismos de proteção imunológica da toxoplasmose (Mclead *et al.*1991). O diagnóstico da toxoplasmose pode ser feito por detecção direta do parasito ou por técnicas sorológicas. O diagnóstico clínico não é fácil de se realizar, apenas cerca de 30% das infecções toxoplasmáticas adquiridas se acompanham de manifestações clínicas (Neves.2002). O quadro clínico é bastante polimórfico e pode ser confundido com o de outras doenças como a mononucleose, pois os casos de fase aguda podem levar à morte ou evoluir para a forma crônica, que pode se manifestar assintomaticamente.

Devido às limitações e dificuldades inerentes às técnicas parasitológicas, os métodos sorológicos são os mais comumente utilizados. A existência de estágios específicos do antígeno tem sido confirmado por imunofluorescência, immunoblotting e ELISA em pacientes infectados pelo parasita, bem como em animais imunizados ou também com anticorpos monoclonais (Kasper 1989; Tomavo *et al* 1993). Camargo *et al* (1978) definiu três perfis sorológicos para a infecção com o *T.gondii*: Perfil I- a principal característica é a presença de anticorpos específicos IgM, porém uma rápida ascensão de

anticorpos IgG; Perfil II- uma fase de transição sorológica em que anticorpos IgG são detectados em altos títulos, anticorpos IgM estão ausentes ou são encontrados em baixos níveis tendendo a desaparecer; Perfil III-anticorpos IgG estão presentes em baixos títulos e ausência de IgM. Em infecções humanas uma variedade de perfis em antígenos têm sido estudadas mas pouco se sabe sobre a resposta do anticorpo contra o parasita, e dos estágios desses antígenos associado com a fase da infecção (Vilavedra M *et al* 1998).

Dentre os antígenos presentes no protozoário, a proteína SAG-1 (30 kDa – denominada p30), é o principal antígeno de superfície dos taquizoítos de *T.gondii*. Esta proteína é altamente imunogênica e uma forte candidata para diagnósticos, assim como outras proteínas de superfície como a de 43 kDa, 35 kDa, 22 kDa e 14 kDa (Sharma *et al*.1988; Couvreur *et al* 1988). A proteína p30 induz altos níveis de anticorpos em humanos e é reconhecida por todas as amostras de soros de indivíduos infectados (Potasman *et al*.1986). Através do peso molecular, várias proteínas como a p30, p22, p23, p76, p97 tem sido identificadas e outras que podem ou não serem ancoradas na superfície da membrana do parasita, via glicosilfosfatidilinositol. (Maclead *et al*.1991).

Várias metodologias têm sido utilizadas para isolamento e caracterização de antígenos. Dentre essas, a propriedade de lectinas interagirem especificamente com carboidratos tornam essas proteínas ferramentas eficientes para o isolamento de antígenos glicosilados. Esses antígenos glicosilados têm se mostrado altamente imunogênicos (Tomavo *et al*.1993)

A lectina concanavalina A (ConA), extraída de um tipo de vagem , a *Conavalia ensiformes* liga-se especificamente à α -D-manose, α -D-glicose e α -D-frutose e tem sido utilizada como ferramenta para isolamento de glicoconjugados.

O desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação e purificação de macromoléculas biológicas como as proteínas tem sido de grande importância para o progresso na biotecnologia nas três últimas décadas. Por isso, no presente estudo, isolamos e caracterizamos parcialmente frações antigênicas de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* ligantes de Concanavalina A por cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A, e verificamos através do teste *Western blotting* se tais frações são reativas ou não com soros de pacientes infectados em diferentes fases de infecção da doença toxoplasmose.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de soros humanos:

Foram obtidas 30 amostras de soros, com índice ELISA (IE) e índice avidéz (IA) determinados previamente, cedidos pela pós-graduanda da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo), Flávia Borges, provenientes do Hospital de Clínicas de Uberlândia (Universidade Federal de Uberlândia-MG) e do Instituto Fleury (São Paulo). Estes soros foram classificados em 3 grupos para serem testados por Immunoblotting, conforme descrito a seguir: **Grupo I**- 15 soros positivos, caracterizados por apresentarem perfil sorológico do tipo I (IgG+ / IgM+ / IgA+). Foram testados para reatividade com IgM e IgG.

Grupo II-10 soros positivos, caracterizados por apresentarem perfil sorológico do tipo III(IgG+ / IgM- / IgA-), foram testados para reatividade com IgG.

Grupo III- 5 soros negativos, testados para reatividade com IgM e IgG.

Animais:

Foram utilizados camundongos alogênicos da linhagem Swiss-Webster para a manutenção e obtenção dos parasitas.

Manutenção dos parasitas

Taquizoítos da cepa RH do *T.gondii* foram mantidos através de transferência intraperitoneal seriada de 48 a 72 horas, inoculando-se 400µl de exsudato em cada

camundongo (com aproximadamente 10^6 taquizoítos). O exsudato peritoneal foi obtido por lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfato PBS pH 7,2 estéril e, após exame sob microscopia óptica, foram selecionados os exsudatos com maior quantidade de taquizoítos livres e menor contaminação com hemáceas e outras células.

Produção do extrato solúvel de taquizoítas de *T.gondii*:

Para obtenção do extrato solúvel de *T.gondii* foi seguido o método previamente descrito por SCOTT et al.(1987), com algumas modificações. Assim, formas taquizoítas do parasito da cepa RH, obtidas do exsudato peritoneal de camundongos Swiss foram centrifugados a 1500 rpm a 4° C por 10 min. O sedimento foi armazenado a -70° C. Os parasitas (concentração de 1×10^9 taquizoítos) foram descongelados e ressuspensos em 3 ml de PBS contendo inibidores de proteases (aprotinina 10 µl/ml, leupeptina 100 µl/ml e PMSF a 1,6 mµ), com incubação por 10 minutos em banho de gelo. A seguir, realizaram-se cinco ciclos de congelamento e descongelamento em N₂ líquido e banho- maria a 37° C, respectivamente. O extrato antigênico foi então submetido a seis ciclos de um minuto em ultrassom e posteriormente, clarificado por centrifugação a 10.000xg a 4° C por trinta minutos. O sobrenadante (Ag solúvel) foi coletado e sua concentração protéica determinada.

Dosagem protéica do antígeno solúvel de taquizoítas de *T.gondii*

As dosagens protéicas foram determinadas pelo método de Lowry et al (1951).

A curva padrão de proteína foi feita com soro albumina (BSA) nas concentrações de 500 a 15,62 µg/ml em diluições duplas seriadas. A concentração de proteínas foi determinada em

mg/ml após cálculo utilizando-se o software Microplate manager 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc.,Hercules, EUA).

Cromatografia de afinidade do antígeno solúvel total de taquizoítas de *T.gondii* em coluna de Concanavalina-A-®Sepharose

A preparação do extrato solúvel do *T. gondii* (1.3 mg/ml) foi aplicada numa coluna de 3 ml de leito equilibrada com PBS 0.01 M, ph 7.2 (AXEN et al., 1967). A coluna foi lavada previamente com 30 ml de PBS e incubada com o antígeno por 2 horas a 4° C sob leve agitação. Após esse período, o material não ligante da coluna foi eluído com PBS ph 7.2, coletando-se frações de 2 ml. Cada fração foi submetida à leitura de absorbância em 280nm, até obter-se leitura de densidade óptica (DO) inferior a 0.02. A fração adsorvida na coluna foi eluída com solução de D- Manose 0.4M, coletando-se frações de 1.0 ml até a DO estipulada, inferior a 0.02. Os materiais ligantes e não ligantes foram ultradiafiltrados por três vezes sucessivas contra água deionizada em aparelho da AMICON, com membranas YM-10 e YM-3 (Whatman International Ltd-Maidstone, England) seus volumes finais foram concentrados para 2 ml e posteriormente dialisados em água deionizada em 40 vezes o volume inicial do concentrado, obtendo-se um volume de 1 ml de cada material ao final deste procedimento. A seguir, foi feito um pool destes materiais do EatTg-ConA com posterior dosagem protéica pelo método de Lowry, como descrito no item anterior, bem como a leitura da D.O. Foi então, comparada a leitura de D.O. com a dosagem protéica, determinando-se um índice de 0.7 de leitura de D.O. para conversão em

dosagem protéica do material. Esse material adsorvida da coluna foi denominado **EatTg-ConA** (Extrato antigênico de taquizoítos de *T. gondii* obtido com interação à Concanavalina-A) e aplicado posteriormente no gel para a separação eletroforética.

Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O extrato solúvel de taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, o EatTg-ConA e o eluato PBS da cromatografia de afinidade foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e redutoras com 2-mercapto-etanol (2ME), segundo Laemmli (1970), utilizando o sistema de eletroforese vertical em minigel (Hofer Mighty Small USA). Para tanto, os extratos descritos acima, foram misturados (v/v) em tampão de amostra para eletroforese (TRIS-HCl 0.1 M, SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.2%, 10% de 2ME). Todos os extratos foram submetidos a um aquecimento de 100°C durante três minutos e, a seguir, volumes de 150 µl foram aplicados em géis de poço único juntamente com padrões de peso moleculares NOVAGEN (15 a 150 kDa), e submetidos a uma corrente de 20 mA por 1 hora e 15 minutos. Após a separação eletroforética dos componentes protéicos no gel, foi efetuada a transferência para a membrana de nitrocelulose.

Western blotting

Após a separação eletroforética do extrato antigênico de taquizoítas de *T. gondii*, do EatTg-ConA e do eluato PBS, efetuou-se a transferência deste material para membranas de nitrocelulose com poros de 0.22 µm (Sigma) conforme o protocolo de Towbin et al (1979), utilizando um sistema úmido de transferência (Multiphor Novablot, Pharmacia-

LKB, Suécia) por 2 horas a uma corrente de 0.8mA por cm² de gel. As membranas de nitrocelulose eletrotransferidas foram cortadas em tiras de aproximadamente 3 mm e colocadas em placas adequadas para Western blotting. As tiras foram bloqueadas com

PBS contendo leite desnatado a 0.05 % (PBS-TM) por duas horas à temperatura ambiente, depois lavadas uma vez com PBS –TM a 1%. Adicionou-se os soros na diluição de 1:50 com posterior incubação overnight. Lavou-se com PBS-T 0,05% seis vezes, com intervalos de cinco minutos. Incubou-se as tiras por duas horas com cada conjugado enzimático específico: IgG de cabra anti-IgG humana-peroxidase (Sigma), ou IgG de cabra anti-IgM humana-peroxidase (Sigma) na diluição ótima de 1:1000 em PBS-TM a 1% e 1:500, respectivamente. Realizou-se um novo ciclo de lavagens com PBS-T 0,05% e as tiras foram reveladas por substrato quimioluminescente ECL (Sigma Chemical Co, St. Louis, USA)

RESULTADOS

A Figura 1-A , apresenta o perfil cromatográfico do extrato antigênico de taquizoítas de *T. gondii*. O primeiro pico (Void) representa a fração protéica eluída da coluna, ou seja, o material não ligante da coluna (eluato PBS). O segundo pico cromatográfico da Fig. 1A (EatTg-ConA) mostra a fração do extrato antigênico de taquizoíto de *T. gondii* ligante de Concanavalina-A, eluída através da adição de D- manose, denominado EatTg-ConA. O pool do material EatTg-ConA tinha uma concentração protéica média de 0,7 mg/ml quando dosado pelos métodos descritos anteriormente, enquanto que o material eluato PBS 1,0 mg/ml.

A análise eletroforética do EatTg-ConA (Fig.1-B, pista 1), revelou a presença de frações antigênicas com proeminência de massa molecular aparente de 22 e 64 kDa. O material apresenta também uma coloração intensa na extremidade superior do gel, sugerindo concentração de material protéico, gerando um arraste na coloração aparente até 170 kDa. O extrato antigênico bruto de taquizoíta de *T.gondii* (Figura 1-B, pista 3) apresentou frações moleculares de pesos aparentes variando de 92 a 18 kDa, com 12 frações moleculares proeminentes de 92, 71, 64, 50, 41, 39, 34, 29, 27, 25, 22 e 18 kDa.

O immunoblotting do extrato antigênico de taquizoítas de *T.gondii* utilizando 15 soros de pacientes com toxoplasmose aguda (Figura 2, letras B e C) apresentou reatividade das frações antigênicas com 14 (93%) dos soros testados, tanto para imunoglobulinas IgM, quanto para IgG (Figura 3, letras B e C). Pacientes com toxoplasmose de fase aguda, com soros reagentes a IgM (Fig. 2, letra B) apresentaram frações antigênicas de peso molecular aparente de 184 kDa , 125 kDa , 89 kDa , 60 kDa , 49 kDa, 35 KDa , 29 KDa , 25 KDa e 18 KDa. Enquanto que na presença de IgG humana

(Fig.2, letra C), as frações protéicas apresentadas eram de 155, 112, 89, 60, 54, 49, 40, 35, 29, 25, 22 e 18 kDa. As bandas mais freqüentes frente à IgM foram as de 184 kDa, que apareceram em 13 (96 %) (Fig.3, letra B), enquanto que frente a IgG foram as de 89 kDa, vistas em 12 (86%) dos soros testados (Fig 3, letra C). A banda de 89 kDa foi a de peso molecular alto que apareceu com maior freqüência tanto nos soros de fase aguda da doença, que reagem frente a IgG, com 12 (86%), quanto nos soros que reagem frente a IgM, com 11(76 %) destes (Fig.3, letras B e C).

Quanto aos soros de pacientes de fase crônica da toxoplasmose (Fig.2, letra A), observou-se a presença de frações reativas que variavam de 184 a 18 kDa. Nestes, as frações imunogênicas mais proeminentes foram de 184, 98, 64, 40, 35 e 22 kDa que apareceram em 15 (100%) dos soros (Fig.3, letra A). Quando comparada com soro de pacientes de fase aguda (Fig.2, letra C) que reagia frente a IgG obtivemos a presença de uma fração de peso aparente de 184 kDa que se repetia em 100% destes e que não foi observado nos outros soros. Soros de pacientes de fase aguda da doença e de fase crônica, não apresentaram qualquer reatividade (Fig.2, letra D).

Os resultados observados no Immunoblotting para o EaTtg-ConA frente a soros humanos de fase aguda que reagem frente a IgM (Fig.4, pistas 7,8 e 9, letraC) evidenciam a presença de frações imunogênicas de 177, 151, 112, 40, 32 e 20 kDa. As frações de 177 e 112 kDa, se repetiram em 9 (69 %) do total dos soros testados (Figura 5, letras A, B e C), a fração de 151 kDa, em 38% dos soros humanos, a fração de 40 em 3 (23 %) dos soros, 32 kDa 2 (15 %) dos soros e a de 20 kDa em 31 %. As frações antigênicas reativas a IgG de soros humanos de fase aguda apresentava massa molecular aparente de 177, 134, 49 e 29 kDa (Figura 5- letra C). A fração de 177 kDa apareceu em 13 (93%) dos soros deste painel

de soros, enquanto que as frações moleculares de 134 e 49 kDa foram reativas em 7 (50%) e a banda de 29 kDa em 4 (29 %). Quando analisamos as frações antigênicas reativas a IgG de soro de pacientes em fase crônica da toxoplasmose observa-se a presença de bandas com peso molecular aparente de 177 a 20 kDa (Fig 4, pistas 1,2 e 3, letra A). Nestes observa-se a presença de bandas com peso molecular aparente de 177, 159, 134, 112, 64, 49, 40, 29, 22 e 20 kDa. Quando analisamos o perfil de frequência de imunogenicidade de soro IgG aguda da doença , as bandas que mais apareceram foram as de 177 kDa (Fig.5, letra C). Na fase aguda da doença de soro IgM (Fig.5, letra B) , as frações imunogênicas do purificado de ligante de manose, reagiram com 13(87 %) dos soros testados. As bandas de 177 e 112 kDa foram as que mais reagiram, com 69 % dos soros. A figura 4, pistas 10, 11 e 12, letra D, corresponde aos soros negativos para toxoplasmose que não apresentaram qualquer reatividade na presença de IgG de fase crônica, IgG de fase aguda e IgM de fase aguda.

DISCUSSÃO

O estudo de frações antigênicas capazes de interagir com lectinas que são glicosiladas e altamente imunogênicas (Tomavo *et al.* 1993) no presente estudo, obteve-se, a partir de um extrato de taquizoíta de *T. gondii* e um extrato de taquizoítas purificado por interação com Concanavalina-A (Con-A). Esse extrato foi denominado EatTg-ConA e foi parcialmente caracterizado através do perfil eletroforético em SDS-PAGE e por Immunoblotting frente a soros de pacientes com toxoplasmose aguda, segundo interação com IgM e/ou IgG (Perfil I na sorologia) ou crônica, segundo interação com IgG (Perfil III na sorologia).

Dentre as frações moleculares presentes nesse extrato, 5 bandas com peso molecular aparente variando de 177 a 112 kDa foram reativas no immunoblotting em quase 100% dos soros, tanto para soros de fase aguda quanto crônica. Ressalta-se ainda que a fração de 177 kDa foi reativa em todos os grupos. O estudo de Villavedra e colaboradores (1998) demonstra o reconhecimento de bandas de massa molecular entre 82 e 151 kDa somente por soros de pacientes na fase crônica e, em particular, uma fração de 132 kDa reconhecida por mais de 50% dos soros testados.

Na preparação antigênica EatTg-ConA do presente estudo, quando analisamos a eletroforese em SDS-PAGE e coloração pela prata, não observamos intensa coloração do material nessa porção do gel. Provavelmente, esta fração, obtida por interação com uma lectina, contenha componentes glicosilados, não corados pela prata, mas imunogênicos (SHARON & LIS, 1993).

É interessante observar que, a fração molecular de massa aparente de 112 kDa foi reativa somente com IgG de 80% dos soros de paciente em fase crônica, sugerindo sua

reatividade como possível marcador no Immunoblot para diferenciar IgG de fase crônica de IgG de fase aguda. Estudos posteriores se tornam necessários para melhor análise dessas frações.

As bandas de peso molecular aparente de 60-64 kDa presentes no extrato de taquizoítos de *T.gondii*, foram reativas, tanto a soros de fase crônica quanto soros de fase aguda. Esse resultado está de conformidade com o estudo de Marcolino e colaboradores (2000), em que mostram frações antigênicas de superfície do *Toxoplasma gondii* testadas frente a soro de pacientes com toxoplasmose aguda ou crônica, com reconhecimento intenso e freqüente de uma fração de 66 kDa por IgG de fase crônica e aguda.

De modo contrário aos estudos acima, na avaliação do extrato purificado EatTg-ConA por Immunoblot, uma banda de 64 kDa foi reativa à IgG de alta avidéz, ou seja, aos soros de infecções crônicas; porém, somente em 10% dos soros avaliados. E não houve reconhecimento dessa banda por soros de pacientes na fase aguda. Sugere-se, então, que o componente de massa molecular aparente de 64 kDa seja glicosilado, por ser obtido por interação com Con-A e assim, seja diferente do componente do estudo citado acima.

Dentre as bandas de mais baixo peso molecular, uma fração que merece avaliação em estudos posteriores é a de 22 kDa do extrato EatTg-ConA. Quando colocada frente a IgG de baixa avidéz (fase aguda da doença) não apresentou qualquer reatividade visível. Porém, essa fração é reativa a IgG de mais de 70% dos soros de paciente na fase crônica do extrato purificado EatTg-ConA. Já foi relatado por Sharma e colaboradores (1983) e por Couvreur e colaboradores (1988), que a proteína de superfície do *T. gondii*, p22 é altamente imunogênica, considerada uma fração antigênica importante do parasito. Apresentou alta reatividade (70% dos soros humanos toxoplasmose) frente a IgG de fase

crônica da doença. Na fase aguda da doença não apresentou qualquer reatividade com IgG. Em nosso estudo, no extrato bruto de taquizoítas de *T. gondii*, banda de 22 kDa foi reativa com soros de fase aguda e fase crônica. Detectou-se também a reatividade de banda de 29 kDa no extrato EatTg-ConA com IgG do soro de fase crônica e IgM de soro fase aguda. Diante do estudo realizado, sugerimos que mais investigações sejam realizadas utilizando-se o extrato de taquizoítas de *T. gondii* obtido por interação com Con-A, com possível avaliação dessas bandas para diagnóstico diferencial na Toxoplasmose, principalmente relacionando-se as IgGs de baixa e alta afinidade com os antígenos isolados.

AGRADECIMENTOS: Agradeço primeiramente à Deus por estar presente em minha vida me guiando e iluminando o tempo todo; à minha família pelo apoio incondicional; ao meu orientador Dr. José Roberto Mineo por ter me concedido um estágio no laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia; à minha co-orientadora Dr. Margareth Leitão Gennari Cardoso por ter me acolhido e me ensinado tanto conhecimentos científicos quanto humanos; à todos meus amigos que acompanharam minha luta, principalmente aquela que esteve o tempo todo me ajudando sendo uma amiga especial, Taísa Carrijo , à quem sempre me faz feliz, Leandro e ao CNPq pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Camargo ME, Ferreira AW, Mineo JR, Takiguti, Nakahara OS 1978. Immonoglobulin G and M enzyme linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect Immun* 21: 55-58.

Couvreur G, Sodak A, Fournier B, Dubremetz IF 1988. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol* 97:1-10.

Godard I, Estaquier J, Zenner L, Bossus M, Auriault C, Darcy F, Grass-Masse H e Capron A 1994. Antigenicity and immunogenicity of P30-derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. *Molecular Immunology* 31:17.

Iglesias JD 1997. Aspectos Médicos das Parasitoses Humanas. *MEDSI* 135-147.

Kasper LH 1989. Identification of stage-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 57: 668-672.

Kong JT, Michael EG, Lyle U, Stephen P, John CB 2002. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. *The J. Infect. Dias* 187:1484-95.

McCabe RE, Remington JS 1988. Toxoplasmosis: the time has come. *J. Med.* 318: 313-315.

- Mclead R, Mack D, Brown C 1991. *Toxoplasma gondii*, New Advances in cellular and molecular biology. Exp. Parasitol 72:109-121.
- Myoung-H A, Keun HH, Jeang OK, Duk YM 1997. Partially purified *Toxoplasma gondii* antigens by immunoaffinity chromatography. The Korean J. Paras. 35 4: 251-258.
- Montoya JG, Liesenfeld O 2004. Toxoplasmosis. The Lancet 363: 3584-3591.
- Neves, D.P 2002. Parasitologia humana. Atheneu 147-156.
- Remington JS, Mcleod R, Desmots G 1995. Toxoplasmosis. Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. W.B. Saunders 140.
- Sharma SD, Mullenax J, Araujo FG, Erlich HA, Remington JS 1983. Western blot analysis of the antigens of *Toxoplasma gondii* recognized by human IgM and IgG antibodies. J. Immun. 131: 977-983.
- Soete M, Fournier B, Camus D, Dubremetz JF 1993. *Toxoplasma gondii*: kinetics of bradyzoite-tachyzoite interconversion in vitro. Exp Parasitol 76: 259-264.

Tam JP, Savala F 1989. Multiple antigen peptide. A novel approach to increase detection sensitivity of synthetic peptides in solid-phase immunoassays. *J.Immunol.Methods* 124-53.

Tomavo S, Fortier B, Soete M, Ansel C, Camus D, Dubremetz JF 1991. Characterization of bradyzoite-specific antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infc Immun* 59: 3750-3753.

Villavedra M, Carol H, Nieto A 1998. Evolution of IgG antibody response against *Toxoplasma gondii* tissue cyst in acute and chronic human infections. *Rev Inst Med Trop* 40(2): 77-84.

LEGENDA DAS FIGURAS

Figura 1-A – Cromatografia de afinidade em coluna de Concanavalina A . Amostras dos tubos de 1 a 30- pico de D.O. do material não ligante do extrato solúvel de *T. gondii* eluído com PBS (Void); Amostras dos tubos de 31 a 60 -pico de D.O. do material ligante à Concanavalina-A obtida por eluição com PBS D-manose 0,4M .

Figura 1-B – Perfil eletroforético em SDS-PAGE - gel 12% corado por nitrato de prata.

Pista 1 – Extrato antigênico de *T.gondii* ligante de Concanavalina-A (EatTg-ConA).

Pista 2 – Extrato antigênico do eluato PBS obtida após cromatografia de afinidade;

Pista 3- Extrato antigênico bruto de taquizoítos de *T.gondii*

Marcador de peso molecular: Novagem 150-15 kDa; Albumina 66 kDa

Figura 2: Immunoblotting do extrato bruto da preparação antigênica de taquizoítos de *T.gondii*. Soro humano toxoplasmose fase crônica- IgG; (letra A, pistas 1,2 e 3); soro humano toxoplasmose fase aguda- IgM (letra B, pistas 4,5 e 6); soro humano toxoplasmose fase aguda- IgG (letra C, pistas 7,8 e 9); soro humano negativo para toxoplasmose(letra D, pistas 10,11 e 12).

Figura 3: Porcentagem de reconhecimento por immunoblotting de frações moleculares do extrato de taquizoíto de *T. gondii*. Soro humano toxoplasmose fase crônica (letra A) ;

FIGURA 1

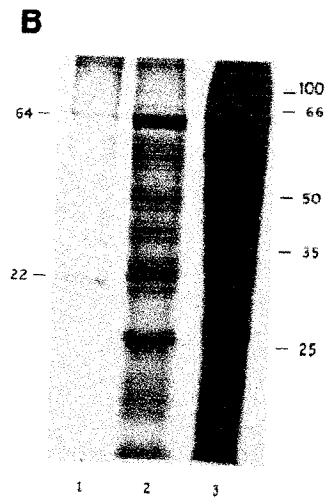
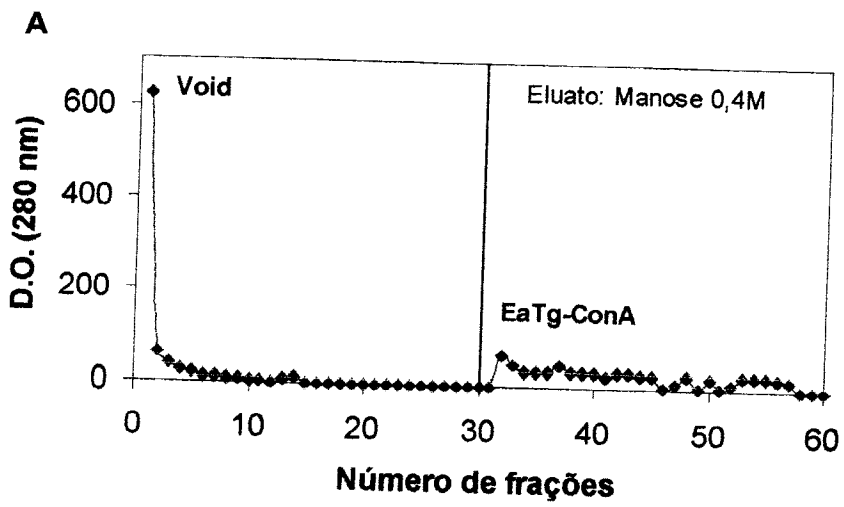


FIGURA 2

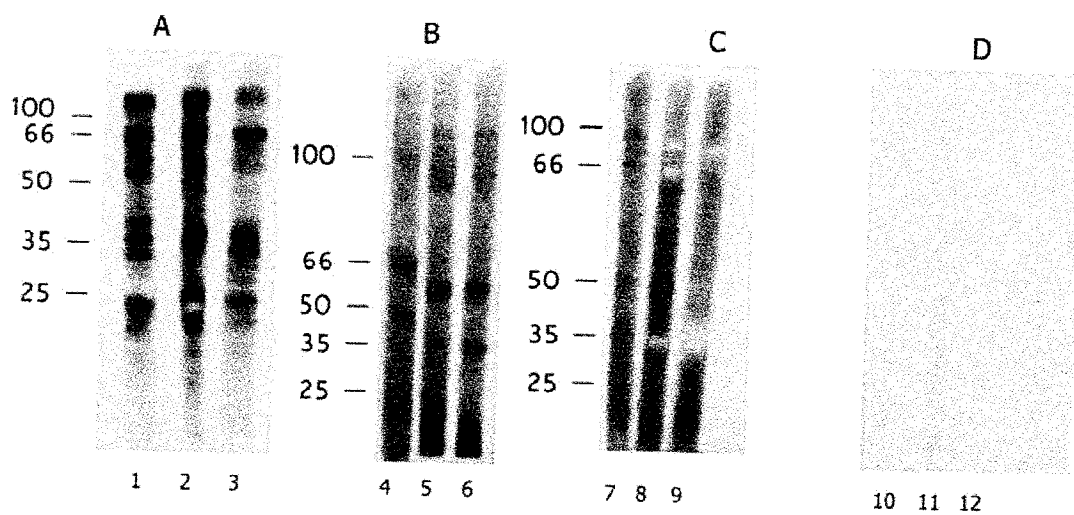


FIGURA 3

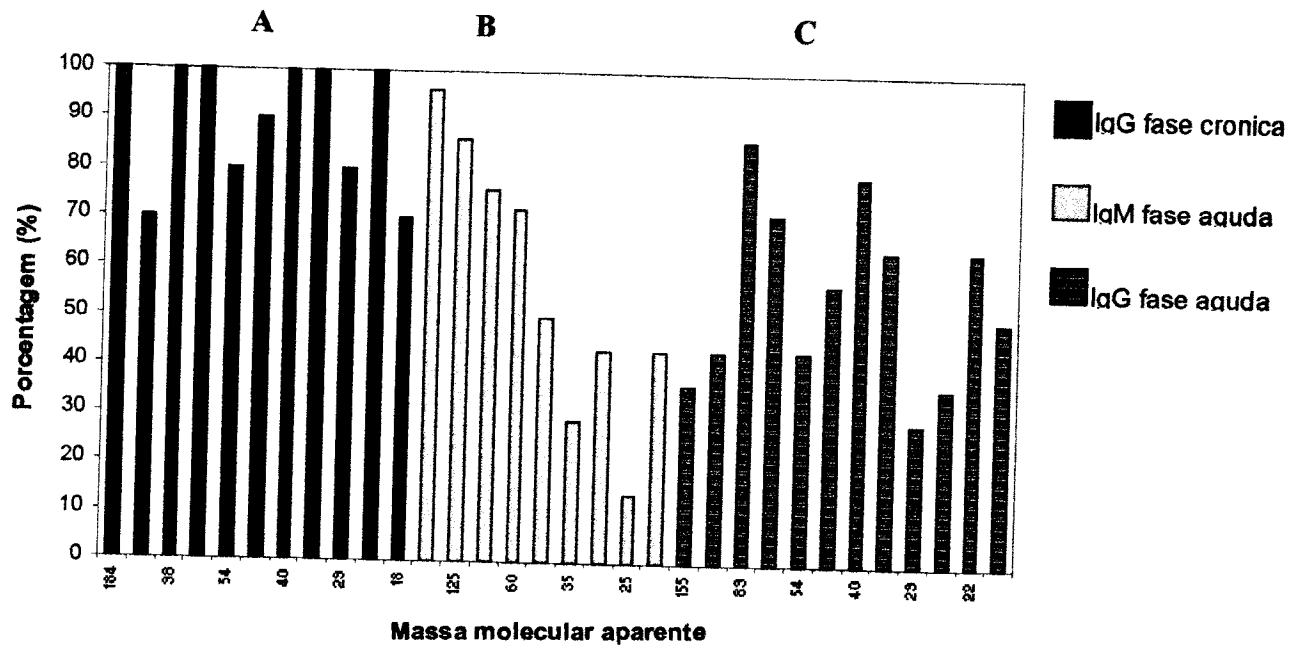


FIGURA 4

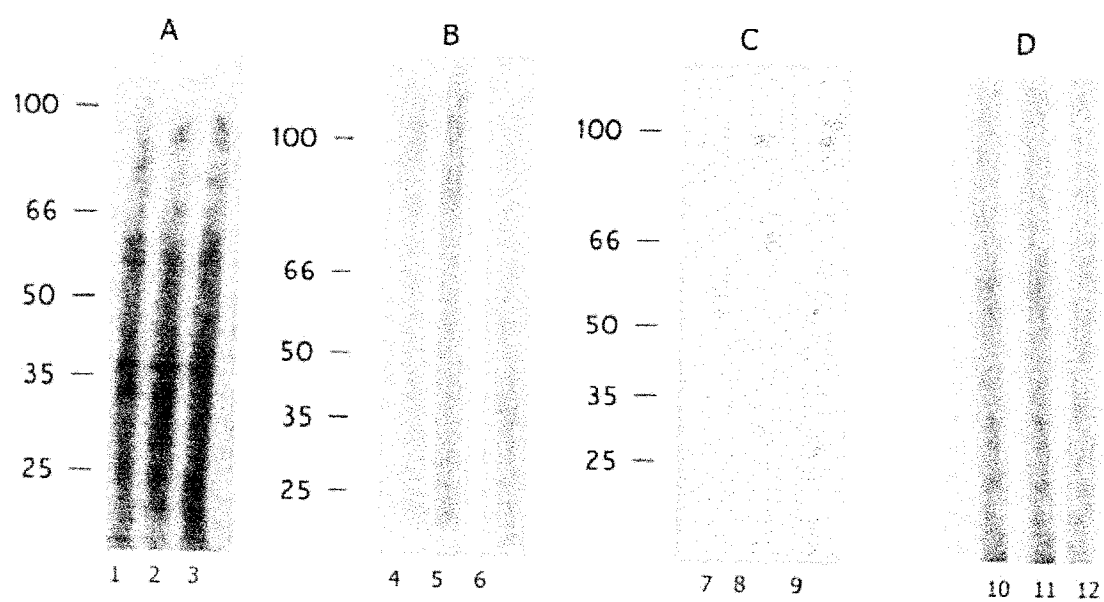
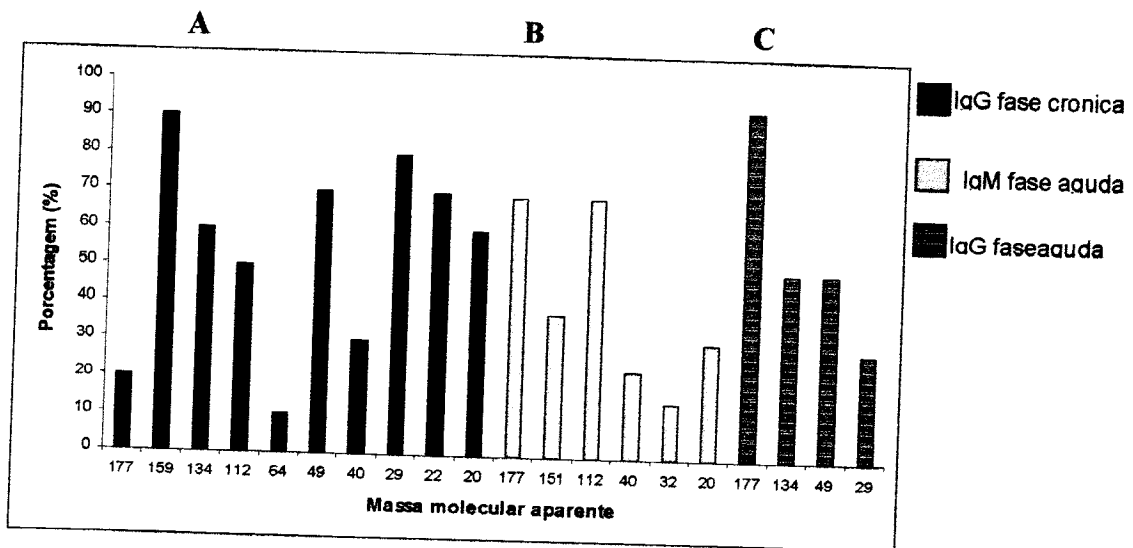


FIGURA 5





MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZ

ISSN 0074-0276
printed version

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Format style](#)
- [Checklist for manuscripts to be submitted](#)

Scope and policy

The **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** is a multidisciplinary journal which publishes original research throughout the fields of tropical medicine (including pathology, field epidemiology and clinical studies) medical and veterinary parasitology (including protozoology, helminthology, entomology and malacology), and medical microbiology (virology, bacteriology and mycology). It particularly welcomes basic and applied research in biochemistry, immunology, molecular and cell biology, physiology, pharmacology and genetics related to these fields. Short communications are also considered. Review articles are invited. The journal publishes eight issues constituting one volume per year. Occasionally papers presented at symposia or congresses are published as supplements. Submitted papers must be written in Portuguese or English. English of low quality is a major cause of delay in publication and we strongly advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist.

Submission of a paper to the **Memórias** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors.

Manuscripts will be peer-reviewed; acceptance will be based on scientific content and presentation of the material.

All material should be sent to the Editorial Office, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Av. Brasil 4365, Pavilhão Mourisco sala 308, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Manuscripts that are not in accordance with these instructions will be immediately returned to authors.

Manuscripts and figures should be sent in quadruplicate (including photographs) together with a diskette containing the text (including tables, graphics and digitalized photographs) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted). **Each manuscript should be accompanied by a covering letter, signed by all authors, containing the full address of the author who will deal with correspondence, his e-mail and fax number.**

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that

if accepted for publication, copyright of the article, including the right to reproduce the article in all form and media, shall be assigned exclusively to the **Memórias**. The journal will not refuse any reasonable request by authors for permission to reproduce any contribution.

For other instructions the authors should consult and follow the most recent number of the **Memórias** or consult the home-page of the **Memórias** (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/>), or contact the Editorial Office by phone (+55-21-2598.4335), Telefax (+55-21-2280.5048 / 2561.1442), or e-mails (E-mails: memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br)

Format style

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm.

The manuscript should be arranged in the following order: running title, title, authors' names, institutional affiliations, summary, key words, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, and references. Sponsorships and corresponding author (mentioning fax number and e-mail address) should be as a footnote on the first page.

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

References: must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

The titles of journals should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus. Consult www.nlm.nih.gov/serials/lii.html.

- In the text use authors' surname and date:
Lutz (1910) or (Lutz 1910).

With two authors it is
(Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912).

When there are more than two authors, only the first is mentioned:
Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

- At the end of the paper use the following styles:

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Book or Thesis

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Illustrations: Figures and tables must be understandable without reference to the text.

- Figures should be mounted on a manuscript-size sheet. Photographs must be sharply focused, well contrasted, black and white glossy prints. Photographs and line drawings must be marked on the back with the author's name, the figure number and an arrow pointing to the top. If mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and

referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow inclusion of the legend. Legends must be provided on a separate sheet. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. Colour illustrations can only be accepted if the authors defray the cost. However, a colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover at no charge.

- Tables should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Short communications should communicate rapidly single results or techniques. They should occupy no more than four printed pages including figures and/or tables. They should not contain excessive references. References should be cited at the end of the paper using the same format as in full papers. A brief summary and three key words must be provided.

Alternative format: manuscripts may be submitted following the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produced by the International Committee of Medical Journal Editors also known as the Vancouver Style. In this case, authors should follow the guidelines in the fifth edition (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, or at the website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm>) and will be responsible for modifying the manuscript where it differs from the instructions given here, if the manuscript is accepted for publication.

Authors should also follow the Uniform Requirements for any guidelines that are omitted in these Instructions.

Once a paper is accepted for publication, the authors must provide:

- a diskette containing the text of the final approved version of the manuscript (including tables and graphics) in Word or Word Perfect for Windows format (Macintosh formats should be converted);
- an **affidavit**, provided by the Editorial Office, signed by all authors. Authors from different countries or institutions may sign in different sheets containing the same basic statement;
- a copyright assignment form, provided by the Editorial Office, signed by the corresponding author.

Page charges: there will be no page charges.

Proofs: one set of page proofs will be supplied for the author to check for typesetting accuracy, to be returned by the stipulated date. No changes to the original manuscript will be allowed at this stage.

Offprints: authors will receive 30 free offprints. An order form will be sent to the author enabling further offprints to be ordered at prices listed on the form.

Checklist for manuscripts to be submitted

Please check every item below before submitting your manuscript to **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

- Please provide a cover letter, **signed by all authors**, with your submission specifying the corresponding author as well as an address, telephone and facsimile number, and e-mail.
- Submit four printed copies of your manuscript, each with a complete set of original illustrations, and a diskette containing the text, tables, graphics and digitalized photographs.
- The entire manuscript (including tables and references) must be typed double-spaced, font size 12, and printed on standard-sized paper. The left and right margins must be at least 3 cm.
- Please number pages beginning with the title page.
- The title page must include a running headline of not more than 40 characters, a title of no more than three printed lines (250 letters and spaces), authors (no titles or degrees), institutional affiliations, complete address of author to whom correspondence must be addressed, and footnotes indicating sources of financial support and changes of address.
- The order of appearance of material in all manuscripts should be as follows: running headline, title, authors, institutional affiliations, abstract, key words, footnotes, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgements, references, tables, legends for figures, and figures.
- References must be cited on the line of the text and in parentheses, e.g., (Chagas 1909). References not cited in the text cannot appear in the reference section. Reference citations must follow the format established by the "Index" (see examples in [Format style](#)).
- If you reference your own unpublished work (i.e., an "in press" article) you must enclose an acceptance letter from the journal.
- If you cite unpublished data that are not your own, you must provide a letter of permission from the author of that publication.
- Please provide three glossy or laser-produced prints of each figure. Label all figures with the first author's name and figure number (place typed label on back of figure). Provide a figure legend for each figure on a separate page at the end of the manuscript.
- Tables must be on a separate page at the end of the manuscript. A short descriptive title must be provided for each table.

[\[Home\]](#) [\[About the journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 1997-2005 **Fundação Oswaldo Cruz**

Av. Brasil, 4365
21040-900 Rio de Janeiro RJ Brazil

Tel.: +55 21 2598-4335
Fax: +55 21 2280-5048 / 2561-1442



memorias@fiocruz.br