

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

SISBI/UFU



1000220648

MON  
612.017.4  
C972C  
TES/MEM

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MIMETOPOS H2 (SAG2A) E B12  
(SRS6) DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE *Toxoplasma gondii***

Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor

JAIR PEREIRA DA CUNHA JÚNIOR

UBERLÂNDIA - MG  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS MIMETOPOS H2 (SAG2A) E B12  
(SRS6) DE MOLÉCULAS DE SUPERFÍCIE DE *Toxoplasma gondii***

**Tese apresentada ao colegiado do  
programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor**

**JAIR PEREIRA DA CUNHA JÚNIOR**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO**

**UBERLÂNDIA - MG  
2005**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

UmU  
612.017.4  
C972c  
TES

**Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor**

JAIR PEREIRA DA CUNHA JÚNIOR

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO

UBERLÂNDIA - MG  
2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas  
Telefax: (034)3218-2333 E-Mail [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br)  
Av. Pará 1720 - Campus Umuarama 38400-902 Uberlândia MG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Biblioteca

Ⓟ SISBI/UFU  
220648

FU00034837-1

### FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de  
Catalogação e Classificação

C972c Cunha Júnior, Jair Pereira da, 1974-  
Caracterização molecular dos mimetopos H2 (SAG2A) e B12 (SRS6)  
de moléculas de superfície de *Toxoplasma gondii* / Jair Pereira da Cunha  
Júnior. - Uberlândia, 2005.  
84f. : il.  
Orientador: José Roberto Mineo.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de  
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.  
1. Antígenos - Teses. 2. Epitopos - Teses. 3. *Toxoplasma gondii* - Te-  
ses. I. Mineo, José Roberto. II. Universidade Federal de Uberlândia. Pro-  
grama de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III.  
Título.

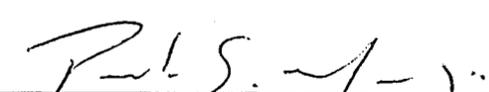
CDU: 612.017.4(043.3)

Ata da Argüição de Tese de Doutorado do candidato JAIR PEREIRA DA CUNHA JÚNIOR  
junto ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da  
Universidade Federal de Uberlândia.

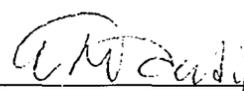
As catorze horas e trinta minutos do dia 31 de março do ano de 2005, no anfiteatro do  
hospital do câncer no Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a  
Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Professores Doutores Renato Arruda  
Mortara – EPM/UNIFESP, Paulo Sérgio Monzani – DCB/UDESC, Luiz Ricardo Goulart Filho  
– INGB/UFU, Neide Maria da Silva – ICBIM/UFU, José Roberto Mineo, ICBIM/UFU –  
Orientador do candidato. Iniciando os trabalhos o presidente da mesa Dr. José Roberto Mineo  
concedeu, preliminarmente, a palavra ao candidato para uma breve exposição do seu trabalho  
intitulado: “Caracterização molecular dos mimetopos H2(SAG2A) e B12(SRS6) de moléculas  
de superfície de *Toxoplasma gondii*”. A seguir o senhor presidente concedeu a palavra, pela  
ordem sucessivamente, aos examinadores, os quais passaram a argüir o candidato, durante o  
prazo máximo de 30 minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a  
argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta,  
emitiu o parecer final individual anexos a esta ata. Em face do resultado obtido, a Comissão  
Julgadora considerou o candidato aprovado.

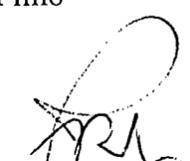
Nada mais havendo a tratar encerrou-se os trabalhos às 18 horas e 05 minutos. Eu João  
Martins Neto, secretário do Programa, lavrei a presente ata que após lida e achada conforme  
foi assinada pela Comissão.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Paulo Sérgio Monzani

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Neide Maria da Silva

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Orientador

Dedico à minha esposa Daniela,  
Aos meus pais, Jair e Bárbara,  
Aos meus irmãos, Jane e Jânio,  
Ao meu amigo Luciano Henrique Serato (*in memoriam*),  
Ao meu sogro e sogra, Everaldo e Cecília  
Pelo apoio, compreensão e tolerância durante  
a condução deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A **DEUS** por ter me dado força e me sustentado até aqui.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo pela orientação, confiança e paciência durante a condução de nosso trabalho de doutoramento.

A Dra. Deise A. O Silva pela dedicação e colaboração em todas as partes deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Neide M. Silva pela paciência e colaboração.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart pela confiança e valorosa contribuição.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Janethe D.O. Pena pela atenção e ajuda com os ensaios de *gliding*.

Aos Professores da Disciplina de Imunologia, Dr. Rodolfo P. Mendes e Dr. Ernesto A. Taketomi pela atenção e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, Guilherme Souza e Carlos Roberto Prudêncio pelo companheirismo e colaboração.

Aos Professores, Dr. Julio C. M. Cascardo e Msc. Carlos P. Pirovane pela atenção e análises em gel bidimensional.

Aos todos os colegas do Laboratório de Imunologia, em especial as pós-graduandas Áurea (COIPA-UFU) e Karine (FMTM-Uberaba).

Aos todos os colegas do Laboratório de Genética Molecular.

Aos técnicos do laboratório de Imunologia, Antônio Tomas Junior e Maria Andréia Pires.

Aos colegas da Comissão de Micro-Imunologia da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), pelo apoio a minha qualificação.

E a todos aqueles que contribuíram em algum momento para este trabalho.

# SUMÁRIO

Páginas

## LISTA DE ABREVIATURAS

## RESUMO

## SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>TOXOPLASMA GONDII</i> E A TOXOPLASMOSE .....	1
1.2. BIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO PARASITO <i>T. GONDII</i> .....	7
1.3. SUPERFAMÍLIA DE SEQÜÊNCIAS RELACIONADAS À SAG-1 (SAG-1 RELATED SEQUENCES – SRS) .....	9
1.4. A TECNOLOGIA DE SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS RANDÔMICOS A PARTIR DE BIBLIOTECA DE FAGOS (“PHAGE DISPLAY”) .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
3.1. PARASITOS E PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS .....	16
3.2. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS (MABS) .....	18
3.3. ELETROFORESE UNI- E BI-DIMENSIONAL (SDS-PAGE 1D E 2D) .....	19
3.4. IMMUNOBLOTTING .....	20
3.5. PURIFICAÇÃO DE ANTI-P30 POR IMUNOADSORÇÃO .....	21
3.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	21
3.7. ENSAIOS DE SECREÇÃO .....	22
3.8. ENSAIOS DE DETENÇÃO DAS TRILHAS DE DESLIZAMENTO (“GLIDING”) DEIXADAS POR TAQUIZOÍTAS DE <i>T. GONDII</i> .....	23
3.9. PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS POR AFINIDADE .....	23
3.10. SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS ATRAVÉS DE BIBLIOTECA DE FAGOS (“PHAGE DISPLAY”) .....	24
3.11. ELISA FAGO .....	25
3.12. ELISA INIBIÇÃO .....	26
3.13. SEQÜENCIAMENTO DE DNA E DEDUÇÃO DE AMINÁCIDOS .....	27
3.14. ANÁLISES DAS SEQÜÊNCIAS E VISUALIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA MOLÉCULA DE SAG1 .....	28
3.15. ENSAIO DE BLOQUEIO EPITÓPICO POR MONOCLONAIS A4D12 E A3A4 .....	28

<b>4. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
4.1. MABS PRODUZIDOS RECONHECEM PROTEÍNAS DE 30/60 (P30/60) E 22 KDA (P22) EM ANTÍGENOS DE <i>T. GONDII</i> .....	29
4.2. OS COMPONENTES DE 30 E 22 KDA ESTÃO PRESENTES NA SUPERFÍCIE DE <i>T. GONDII</i> .....	31
4.3. ANTICORPOS ESPECÍFICOS CONTRA P30 RECONHECEM COMPONENTES DE 30 E 60 KDA EM ANTÍGENO DE <i>T. GONDII</i> .....	31
4.4. CLONES OBTIDOS A PARTIR DOS HIBRIDOMAS A3A4 E E9 APRESENTAM PERFIL DE REATIVIDADE SIMILAR AO OBSERVADO COM OS HIBRIDOMAS PARENTAIS. ....	36
4.5. MAB A4D12 RECONHECE EPITOPO LINEAR ENQUANTO MABS A3A4 E E9 RECONHECEM EPITOPOS CONFORMACIONAIS PRESENTES EM ANTÍGENOS DE <i>TOXOPLASMA GONDII</i> .....	41
4.6. MAB A4D12 RECONHECE DUAS ISOFORMAS DE P22 ENQUANTO O MAB A3A4 RECONHECE CINCO FORMAS VARIANTES DE P30. ....	43
4.7. OS ANTÍGENOS DE P22 E P30 SÃO ENRIQUECIDOS NA FRAÇÃO ESA E SÃO LIBERADOS POR TAQUIZOITAS DE <i>T. GONDII</i> DURANTE OS EVENTOS DE MOTILIDADE SOBRE O SUBSTRATO. ....	43
4.8. PURIFICAÇÃO DE MABS PARA EMPREGO EM TÉCNICA DE SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS A PARTIR DE BIBLIOTECAS DE EXPRESSÃO EM FAGOS ("PHAGE DISPLAY") .....	48
4.9. MAB A4D12 RECONHECE UM PEPTÍDEO SIMILAR A MOLÉCULA DE SUPERFÍCIE SAG2A .....	48
4.10. MAB A3A4 RECONHECE EPITOPO CONFORMACIONAL COMPARTILHADO ENTRE MEMBROS DA SUPERFAMÍLIA DE SRS (SAG-1 RELATED SEQUENCES),.....	54
4.11. MAB A4D12 E A3A4 RECONHECEM EPITOPOS EXPRESSOS EM DIFERENTES GENÓTIPOS DE <i>T. GONDII</i> (CEPAS) MAS NÃO EM OUTROS PARASITOS DO FILO APICOMPLEXA. ....	59
4.12. BLOQUEIO DE EPITOPOS UTILIZANDO OS MAB A4D12 E A3A4 NÃO PROTEGE ANIMAIS C57BL6 DE INFECÇÃO COM PARASITOS DA CEPA RH. ....	61
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>63</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABS	- Absorbância
BSA	- Soro albumina bovina
BSR	- Sequências relacionadas à SAG1 em bradizoítas
$\beta$ ME	- $\beta$ -mercaptoetanol
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- Ácido etilenoglicol-bis-( $\beta$ amino etil éter) N',N'-tetracético
EI	- Índice de reatividade
ESA	- Antígeno excretado/secretado
FITC	- Fluoroceína
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
HAT	- Meio de cultura hipoxantina, aminopterinina e timidina
HELPER	- Fago M13 selvagem
HEPES	- Ácido 2-etanosulfônico de n-2-hidroxi-etil piperazina
HT	- Meio de cultura hipoxantina e timidina
IEF	- Focalização isoelétrica
IgG	- Imunoglobulina G
kDa	- Kilodaltons
LB	- Meio de cultura de bactérias Luria-Bertania
mAb	- Anticorpo monoclonal
nm	- Nanômetro
OD	- Densidade óptica
OPD	- Orto-fenilendiamina
PBS	- Salina fosfato tamponado
PBST	- Salina fosfato tamponado suplementado com TWEEN 20 à 0,05%
Phage Display	- Sistema de expressão de proteínas em fagos
RPMI 1640	- Meio de cultura de células desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute (1969)

SAG	- Antígenos de superfície ligados à âncoras de glicosilfosfatidilinositol
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE 1D	- Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SDS-PAGE 2D	- Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SRS	- Superfamília de seqüências relacionadas à proteína SAG1
STD	- Padrão de parasitos ( <i>standard</i> )
TBST	- Salina tamponada com TRIS
TSA	- Antígeno solúvel de <i>Toxoplasma gondii</i>

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita que infecta a ampla maioria dos vertebrados homeotermos. Ele penetra ativamente em todas as células já estudadas, utilizando inicialmente uma superfamília de antígenos de superfície que inclui produtos evolucionariamente bem conservados expressos pelos genes SRS (*SAG1-related sequences*), como as moléculas SAG1 and SAG2A, que participam da adesão e invasão das células hospedeiras. Levando-se em conta que pouca informação está disponível na literatura sobre os epitopos SRS, o objetivo do presente estudo foi caracterizar os epitopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais (mAbs) A3A4 e A4D12, utilizando a técnica de *phage display*. Quando avaliado por eletroforese uni- e bi-dimensional, o mAb A3A4 reconheceu um epitopo conformacional comum a cinco moléculas SRS6, BSR4, SAG5A, SAG5C and SAG5D, pertencentes à superfamília SRS, com componentes monoméricos (p30) or diméricos (p60) sendo detectados. Em contraste, um epitopo linear (p22) comum a duas isoformas de SAG2A foi reconhecido pelo mAb A4D12, sendo que o mapeamento epitopico identificou o peptídeo consenso DGSSA que apresentou um significativo alinhamento com a região C-terminal da molécula de SAG2A, localizada na posição correspondente ao 137º-141º resíduos de aminoácidos. Ensaio de secreção e motilidade revelaram que os epitopos A3A4 e A4D12 estão presentes nos antígenos excretados/secretados (ESA), e que eles fazem parte das trilhas deixadas por *T. gondii* durante sua motilidade. Os epitopos A3A4 e A4D12 estão presentes nas cepas de genótipos tipo I e II de *T. gondii*, mas ausentes em *N. caninum* ou *E. acervulina*, indicando que estes marcadores são espécie- mas não cepa-específicos. O tratamento prévio de taquizoítas da cepa RH com mAb A3A4 ou A4D12 não demonstrou uma proteção significativa em camundongos C57BL/6 infectados, sugerindo que o bloqueio destes epitopos parece não interferir com a infectividade in vivo desta cepa de *T. gondii*.

## SUMMARY

*Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite that infects the majority of warm-blooded vertebrates. It actively penetrates in any nucleated cell using a surface antigen superfamily, including the typical evolutionary and developmental products expressed by SRS (SAG1-related sequences) genes, as SAG1 and SAG2A molecules, which mediate host cell attachment and invasion. Considering that little is known about SRS epitopes, the main purpose of the present study was to characterize the epitopes recognized by A3A4 and A4D12 monoclonal antibodies (mAbs) by using *phage display* libraries. When evaluated by 1D and 2D electrophoresis, the A3A4 mAb recognized a conformational epitope shared by five isoforms of the SRS6, BSR4, SAG5A, SAG5C and SAG5D members of SRS superfamily from a monomeric (p30) or dimeric (p60) molecule. In contrast, a linear SAG2A epitope (p22) shared by two isoforms was recognized by A4D12 mAb and the epitope mapping showed a peptide core consensus at the DGSSA sequence that resulted in a considerable alignment with SAG2A located at its C-terminal domain (137-141 amino acids). Secretion and gliding assays revealed that both A3A4 and A4D12 epitopes are present in enriched excreted/secreted antigens (ESA). Also, they are shed in trails left by *T. gondii* during gliding motility. In addition, A3A4 and A4D12 epitopes are present in both type I and II genotypes of *T. gondii*, but no reactivity was detected in *N. caninum* or *E. acervulina* lysates, indicating these epitopes are species- but no strain-specific. Pretreatment of RH strain tachyzoites with A3A4 or A4D12 mAb did not show significant protection in C57BL6 mice against *T. gondii* infection, suggesting that the blockage of the epitopes seems that they do not interfere with infectivity of virulent RH strain *in vivo*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Toxoplasma gondii* e a toxoplasmose

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório que tem ampla distribuição mundial e que pode virtualmente infectar células de todos os vertebrados até hoje estudados (PEZZELA- D'ALESSANDRO et al., 2001; TENTER et al., 2000). Foi originariamente descrito em 1908 por Nicole e Manceaux no roedor africano *Ctenodactylus gondi* e em coelhos por Splendore no Brasil (BLACK; BOOTHROYD, 2000) e é atualmente classificado no Filo Apicomplexa, subclasse Coccidae (SIBLEY et al., 2003)

*T. gondii* é um parasito facultativamente heteroxeno, apresentando duas fases no seu ciclo de vida, uma assexuada, que ocorre na maioria dos hospedeiros vertebrados e uma sexuada que ocorre somente em hospedeiros de espécies de felídeos (TENTER et al., 2000). Sendo que estes últimos podem tanto ser hospedeiros definitivos como intermediários (BLACK; BOOTHROYD, 2000).

Durante o ciclo de vida, este parasito pode adotar quatro formas principais de desenvolvimento: taquizoíta, bradizoíta, merozoíta e esporozoíta (LEKUTIS et al., 2001). Os taquizoítas são formas de multiplicação rápida, apresentando as dimensões de 2-4 µm de largura por 4-8 µm de comprimento. Estas formas são predominantes durante a infecção aguda e têm importância epidemiológica, uma vez que é a principal forma de transmissão por via placentária (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Após lise da célula hospedeira por replicação intensa, as formas taquizoítas infectam células adjacentes e eventualmente ganham a circulação

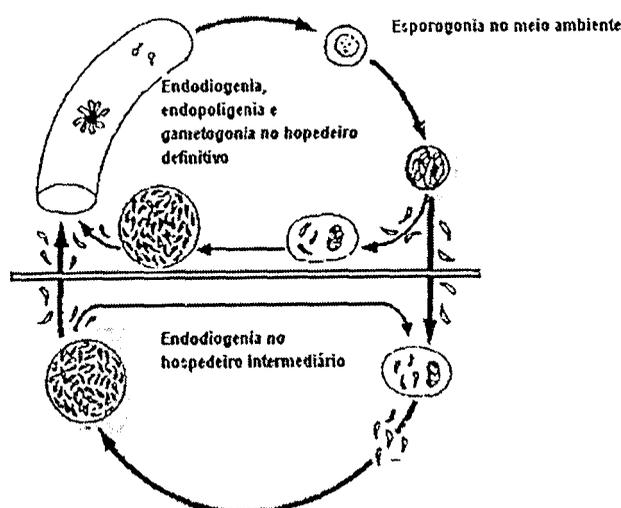
sanguínea. Nesta ocasião taquizoítas disseminados podem infectar o sistema nervoso, olhos, ossos, músculo cardíaco e a placenta (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Esta forma de desenvolvimento apresenta características antigênicas peculiares, induzindo uma forte resposta inflamatória que causa danos teciduais importantes e que são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (BLACK; BOOTROYD, 2000, TENTER et al., 2000, MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

A forma taquizoíta pode se converter em bradizoíta pela pressão da resposta imune do hospedeiro (LYONS et al., 2002). Os bradizoítas são semelhantes morfológicamente aos taquizoítas, no entanto, são formas de multiplicação lenta e características de infecções crônicas, podendo ser identificados nos músculos cardíaco e esquelético, cérebro e retina. Os bradizoítas desenvolvem cistos contendo dezenas ou mesmo centenas de parasitos que são resistentes à ação dos mecanismos imunológicos. Esta forma pode permanecer latente durante toda vida do hospedeiro sendo infectante tanto para hospedeiros definitivos como intermediários se ingeridos (TENTER et al., 2000, MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

Merozoítas e esporozoítas se desenvolvem no intestino dos hospedeiros definitivos. Merozoíta é a forma resultante da divisão assexuada que ocorre no interior dos enterócitos de felídeos, previamente ao início do ciclo sexuado (LEKUTIS et al., 2001). Já esporozoíta é a única forma de *T. gondii* resultante de multiplicação sexuada e normalmente são eliminados nas fezes dos felídeos na forma de oocisto contendo dois esporocistos que abrigam quatro esporozoítas cada. Estas formas apresentam dimensões de 10 a 12 µm de diâmetro e são formas extremamente resistentes,

principalmente em regiões quentes e úmidas (TENTER et al., 2000). Na Figura 01, representação esquemática do ciclo do parasito *T. gondii*.

*T. gondii* apresenta uma estrutura populacional mantida basicamente por três linhagens clonais, denominadas de tipo I, II e III que se distinguem entre si pelo grau de virulência e pelo padrão epidemiológico (HOWE; SIBLEY, 1995; MONTOYA; LIESENFELD, 2004). O genótipo do tipo II é o mais abundantemente encontrado na natureza e está associado à maioria das infecções, excetuando a forma congênita que normalmente pode também estar associada aos genótipos do tipo I ou recombinantes. Já os parasitos isolados de animais são predominantemente do tipo III. No entanto, recombinantes raros albergados em animais silvestres de florestas tropicais também podem estar associados a casos severos de toxoplasmose aguda (BOSSI; BRICAIRE, 2004). Mais recentemente, genótipos raros de *T. gondii* também foram associados à ocorrência de casos de toxoplasmose ocular (GRIGG et al., 2001).



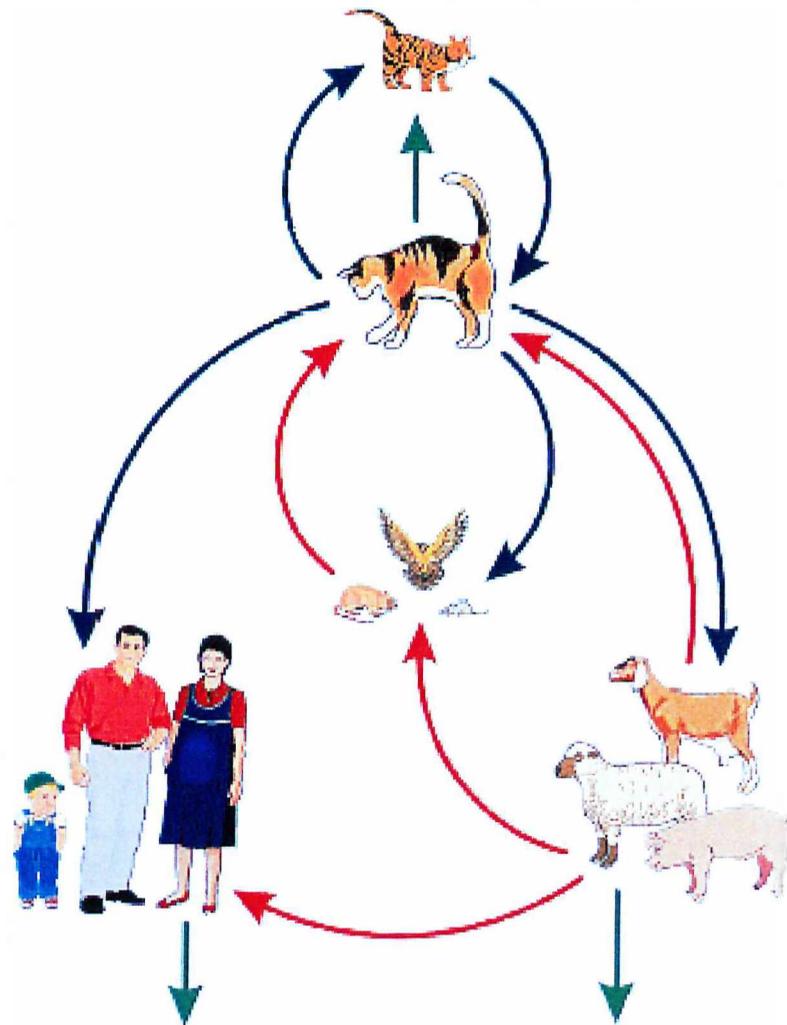
**Figura 1: Ciclo de vida do parasito *T. gondii*.** O desenvolvimento no hospedeiro intermediário está ilustrado abaixo da barra horizontal. Acima da barra horizontal, desenvolvimento no hospedeiro definitivo. Os estágios infecciosos, taquizoítas, cistos de bradizoítas e esporozoítas esporulados em oocistos estão indicado pela cor cinza (TENTER et al., 2000).

A infecção pode ocorrer por ingestão de carnes ou derivados mal cozidos contendo cistos tissulares de *T. gondii* ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados com oocistos esporulados provenientes de fezes de felídeos (DUBEY, 1996). Já a transmissão vertical, ocorre pela infecção transplacentária, geralmente associada à infecção ou reinfecção durante o curso do período gestacional (TENTER et al., 2001; CARRUTHERS, 2002). A toxoplasmose quando adquirida após o nascimento é de baixa morbidade e letalidade. No entanto, quando adquirida durante a gravidez pode acarretar danos ao conceito, como lesões no sistema nervoso central e retina, podendo ainda, levar à morte fetal ou ao abortamento (BLACK; BOOTHROYD, 2000). Os riscos da infecção e as conseqüências clínicas da transmissão estão diretamente associados ao período de gestação, do estado imunológico da gestante e do número e virulência dos parasitos transmitidos ao feto (TENTER et al., 2000). No tocante à transmissão congênita estima-se que 1 a 10 recém-nascidos são infectados em cada 1000 nascimentos (TENTER et al., 2000, MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

Embora mais raras, outras formas de infecção foram descritas na literatura, como aquelas ocasionadas por transfusão de sangue e derivados, por transplantes de órgãos contendo taquizoítas ou cistos, por ingestão de leite caprino não pasteurizado contaminado com taquizoítas de *T. gondii*, e ainda por acidentes de laboratório (SIEGEL, et al., 1971; MONTOYA; LIESENFELD, 2004 ). A Figura 2 demonstra as principais vias de transmissão do parasito *T. gondii*.

A toxoplasmose acomete em torno de um terço da população mundial, apresentando valores de soroprevalência que varia de 15 a 85%

dependendo da região geográfica analisada e das diferenças observadas nas condições sócio-culturais e de higiene entre as populações estudadas (TENTER et al., 2000).



**Figura 2: Principais vias de transmissão do parasito *T. gondii*.** As setas em azul indicam a transmissão via oocistos. As em vermelho e verde representam respectivamente a transmissão via ingestão de cistos contendo bradizoítas e a transmissão congênita (TENTER et al., 2000).

Outro grupo da população em que o parasito *T. gondii* pode causar doença severa é aquele formado por pacientes imunossuprimidos, particularmente pacientes que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Nestes pacientes, a reativação de uma infecção latente pode causar doença sintomática incluindo encefalite toxoplásmica grave que pode conduzir ao óbito (LUFT; REMINGTON, 1992). Estudos conduzidos por diferentes grupos de pesquisadores demonstraram que até 40% dos portadores do vírus de imunodeficiência adquirida (HIV) poderiam ser afetados gravemente por este patógeno antes da introdução da terapia anti-retroviral (SOLDATI; BOOTHROYD, 1993; TENTER et al., 2001). Atualmente, a encefalite toxoplásmica passou a ser menos freqüente em pacientes HIV positivos que apresentam contagem de células CD4+ superiores a 200. Contudo, uma vez diagnosticada a doença, o paciente deve ser submetido ao tratado indefinidamente, já que o abandono do tratamento está fortemente associado ao alto risco de recidiva da toxoplasmose encefálica (TENTER et al., 2001). No entanto, como existem diversos países que apresentam limitações financeiras e de infra-estrutura para aquisição e distribuição de drogas anti-HIV, a toxoplasmose ainda é causadora de mortes em diversas regiões do planeta (CARRUTHERS, 2002).

Desta forma, pela capacidade de infectar amplo número de vertebrados e permanecer em uma forma quiescente assintomática e por estar associado a um número considerável de doenças congênitas ou abortamentos em animais e humanos, incluindo reinfecções em pacientes imunossuprimidos, a toxoplasmose é uma das mais importantes zoonoses descritas até o

momento. Isto justifica a realização dos estudos que enfatizem os aspectos básicos da biologia de *T. gondii* que podem produzir avanços no tratamento, diagnóstico e prevenção da toxoplasmose (TENTER, et al., 2001; CARRUTHERS, 2002; MONTOYA; LIESENFELD, 2004).

## 1.2. Biologia da infecção pelo parasito *T. gondii*

O elemento chave na sobrevivência de *T. gondii* é a penetração na célula hospedeira. A invasão do parasito à célula hospedeira é um processo complexo, no qual o parasito utiliza a motilidade baseada no sistema acto-miosina (DOBROWOLSHI; SIBLEY, 1996; DOBROWOLSHI et al., 1997; HETMAN, et al., 2000; HEINTZELMAN; SCHWARTZMAN, 2001) para alcançar a célula hospedeira e se posicionar de maneira que a região apical do parasito possa estar voltada para a interface celular. A adesão inicial do parasito é mediada em parte pelos antígenos da superfamília de proteínas de superfície, ligadas à membrana de *T. gondii* por âncoras de glicosilfosfatidilinositol-GPI (*surface antigen glycosyl-phosphatidylinositol linked* - SAG) (TOMAVO et al, 1989, LEKUTIS et al., 2001; JUNG et al., 2004). Estas moléculas parecem funcionar como adesinas entre a membrana do parasito e da célula hospedeira reduzindo a força repulsiva estabelecida pelas cargas negativas produzidas pelos fosfolipídios de ambas as membranas (BLACK; BOOTHROYD, 2001; CARRUTHERS, 2002).

Uma vez estabelecido o primeiro contato com as células hospedeiras o parasito se reorienta com a face apical voltado à interface celular e por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido de transdução de sinal ativa a descarga de proteínas presentes nas organelas intracelulares denominadas

micronemas (CARRUTHERS, 2002). As proteínas secretadas pelas micronemas são proteoliticamente processadas e funcionam como elementos adicionais na adesão parasitária que potencializam a invasão ativa de *T. gondii* (SOLDATI et al., 2001). O sistema actina-miosina do parasito força a penetração ativa de *T. gondii* através da membrana celular da célula hospedeira, criando um vacúolo nascente. Este vacúolo recebe a secreção do segundo grupo de organelas secretórias de *T. gondii*, as roptrias (BLACK; BOOTHROYD, 2000; CARRUTHERS et al., 2002). As proteínas secretadas pelas roptrias parecem favorecer a expansão do vacúolo parasitóforo até que o parasito ultrapasse a delgada contração produzida na membrana celular hospedeira. O mecanismo preciso da ação das proteínas de roptrias ainda é desconhecido, contudo a característica altamente básica de seus membros tem sugerido que participem como policatiônicos favorecendo a penetração e a expansão do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS et al., 2002).

Uma vez formado o vacúolo parasitóforo um terceiro grupo de organelas de *T. gondii*, denominadas de grânulos densos liberam seus conteúdos. As proteínas de grânulos densos parecem estar tanto associadas à expansão final do vacúolo parasitóforo quanto da criação de um sistema tubular-vesicular responsável pela criação de poros, via oligomerização de proteínas de grânulos densos, necessários à obtenção de nutrientes (CARRUTHERS et al., 2002). O vacúolo parasitóforo recém formado impede a acidificação de seu interior, possivelmente por exclusão da H<sup>+</sup>-ATPase de membrana via proteínas secretadas, recrutando ainda mitocôndrias e retículo

endoplasmático que funcionariam acessoriamente como organelas que proporcionam a replicação parasitária (CARRUTHERS et al., 2002).

### **1.3. Superfamília de seqüências relacionadas à SAG-1 (SAG-1 related sequences – SRS)**

Este grupo de proteínas foi inicialmente caracterizado bioquimicamente pelos trabalhos de Kasper e Couvreur que analisaram os antígenos principais p22, p23, p30, p35 e p43 da forma taquizoíta de *T. gondii*, utilizando anticorpos monoclonais (mAbs) (KASPER et al., 1982; COUVREUR et al., 1988). A seguir, os trabalhos de Grinwood e Mineo demonstraram que mAbs direcionados a p30, o componente principal da superfície de taquizoítas de *T. gondii*, produziam marcante redução na adesão parasitária à célula hospedeira e conseqüente redução da infecção (GRINWOOD e SMITH. 1992, MINEO et al. 1993 e 1994). Resultados contrastantes aos obtidos com os mAbs anti-p30 foram descritos por Grinwood e Smith, demonstrando que o emprego de dois mAbs (T4.3G11 e T4.1F4) aumentava significativamente a adesão parasitária à célula hospedeira (GRIMWOOD; SMITH, 1996). Estes dados indicaram que membros distintos de SAG pudessem apresentar funções distintas durante a invasão parasitária.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, os três primeiros membros da família SAG foram inicialmente clonados, p30 (SAG1), p22 (SAG2) e p43 (SAG3) (BURG et al., 1988; PRINCE et al., 1990; CESBRON-DELAUW et al. 1994) e logo um número crescente de seqüências homólogas à SAG1 foram identificadas (OLBERG-FERRAGUT et al., 1996; HEL et al. 1997, MANGER, et al. 1998; KNOLL; BOOTHROYD, 1998). As

seqüências descritas na literatura apresentavam motivos consensos característicos que definem a superfamília de seqüências relacionadas à SAG1 (SRS), sendo estes: 1- o motivo de inserção de âncoras de GPI; 2- a manutenção de 12 resíduos de cisteínas conservados presentes em SAG1; e 3- a presença de um peptídeo sinal (LEKUTIS et al., 2001). Adicionalmente, novos membros similares a SAG2 que são expressos em diferentes fases do parasito foram identificados e renomeados de SAG2A (p22), SAG2B, SAG2C e SAG2D por Lekutis (LEKUTIS et al., 2000). Estes membros compartilham um número limitado de cisteínas e são menos similares entre si que as seqüências relacionadas à SAG1 (LEKUTIS et al., 2001). Spano e colaboradores demonstraram mais quatro seqüências similares a SAG1 denominadas de SAG5 (SAG5A, SAG5B, SAG5C e SAG5D), as quais são diferencialmente expressas nas fases taquizoíta e bradizoíta de *T. gondii* (SPANO et al., 2002). Mais recentemente, Jung e colaboradores analisando seqüências extensas (*contigs*) disponíveis no projeto genoma de *T. gondii* expandiram a superfamília de SRS para um total de 161 seqüências semelhantes à SAG1 e SAG2 (JUNG et al., 2004). A razão da grande diversidade alcançada por esta família permanece obscura, mas membros com SAG1 e SAG2A altamente imunogênicos aparentemente atraem a resposta imune para si favorecendo a sobrevivência do parasito que se transforma nas formas encistadas formadas por bradizoítas (LEKUTIS et al., 2001; JUNG et al., 2004). A figura 3 demonstra a árvore filogenética construída a partir de seqüências de membros de SRS de *T. gondii* e alguns ortólogos de *Neospora caninum*, *Neospora hughesi* e *Sarcocystis muris*.

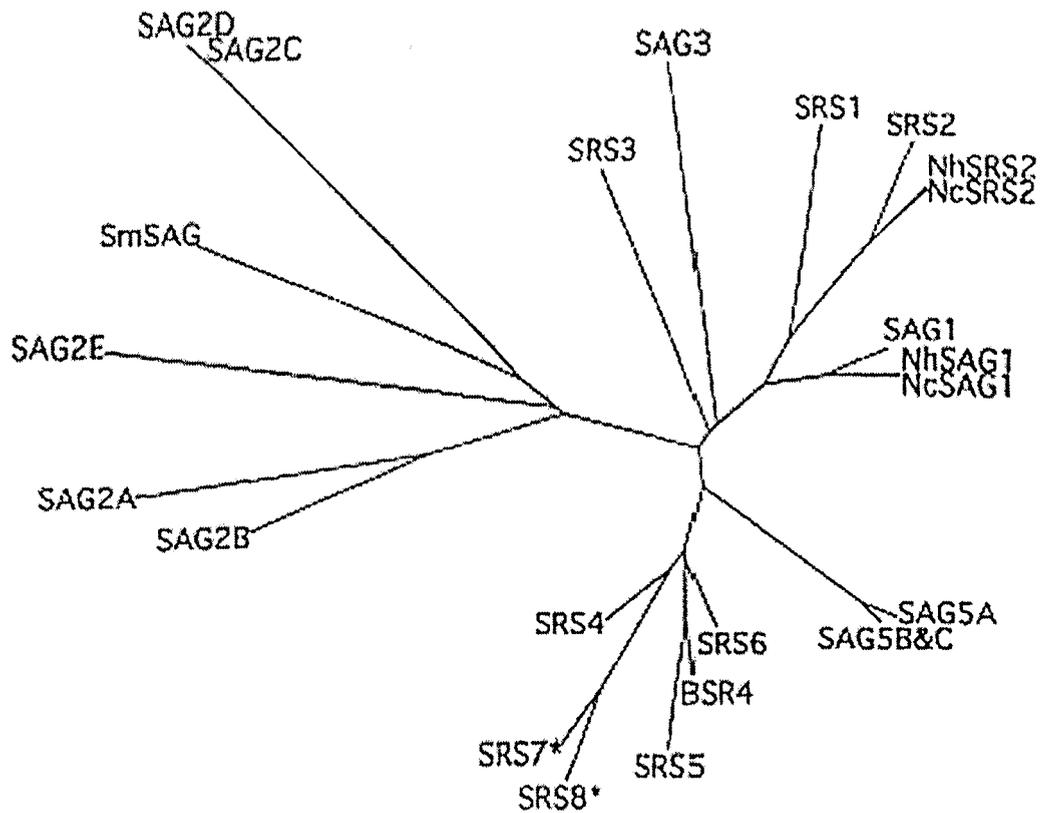


Figura 3: Árvore filogenética de membros da superfamília de SRS de *T. gondii* e alguns ortólogos de *Neospora caninum*, *Neospora hughesi* e *Sarcocystis muris*. O asterisco indica seqüências correspondentes a pseudogenes (Lekutis et al., 2001).

#### 1.4. A tecnologia de seleção de peptídeos randômicos a partir de biblioteca de fagos (“*phage display*”).

A técnica de *phage display* foi inicialmente descrita por Smith para a expressão de peptídeos da enzima de restrição EcoRI em fusão com a proteína pVIII do capsídeo viral do fago M13 (fECO1) (SMITH et al., 1985). A técnica consiste da expressão e seleção por afinidade de proteínas ou peptídeos expressos em fusão com proteínas virais presentes em capsídeo de bacteriófagos. Assim, os fagos recombinantes expressando peptídeos randômicos podem ser selecionados por afinidade e a seguir expandidos em ciclos adicionais de crescimento em bactérias *E. coli* hospedeiras apropriadas (PARMLEY; SMITH, 1988).

O fago amplamente utilizado para esta finalidade é o bacteriófago M13 que é um microrganismo filamentosos e que infecta bactérias Gram negativas que apresentam pilus F. O bacteriófago M13 é uma partícula viral formada por uma capa protéica constituída por onze proteínas (pI-pXI) que envolvem o genoma viral constituído por um DNA de fita simples de aproximadamente 6,4 kb.

A construção genética é geralmente realizada em vetores M13KE (derivado do vetor de fagos m13mp19) que possuem rápida propagação e não necessitam de sistema seleção por antibióticos ou coinfeção por fagos de tipo auxiliares. Além disto, o gene *lacZ*, presente neste vetor, facilita a distinção entre colônias bacterianas infectadas com fagos que carregam seqüências exógenas (colônias azuis) e colônias não infectadas por partículas virais ou mesmo infectadas com fagos selvagens resultantes de contaminação do ambiente laboratorial (colônias brancas) (MESSING et al., 1983). Das onze

proteínas presentes na partícula viral, duas proteínas são mais utilizadas para o sistema de expressão de peptídeos recombinantes, a pVIII representada em aproximadamente 2800 cópias constituindo o principal componente do capsídeo viral e a pIII expressa em cinco cópias. Neste sistema, fragmentos de DNA codificando peptídeos ou proteínas aleatórias são geralmente inseridos nos genes de pIII ou pVIII (PHIZICKY; FIELDS, 1995), resultando na expressão N-terminal dos peptídeos ou proteínas em fusão com as proteínas pIII ou pVIII. A característica de baixa representatividade da pIII em relação a pVIII nas partículas de fago M13 pode ser explorada para descoberta de ligantes com alta afinidade presentes em bibliotecas de expressão peptídeos em pIII ao invés de bibliotecas de expressão baseadas no gene codificante de pVIII (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2000). Como a proteína pIII exerce um papel na infecção viral via interação com pilus F presentes em bactérias hospedeiras, o sistema baseado em expressão de peptídeos de fusão com todas as cinco pIII expressas em fago M13 devem conter insertos pequenos, não excedendo 30 aminoácidos, para não comprometerem a infectividade de fagos M13 e desta forma a viabilidade da biblioteca gerada (PHIZICKY; FIELDS, 1995). Como o sistema de *phage display* é baseado em modificações genéticas aleatórias que são inseridas em sítios específicos do genoma dos fagos, novos variantes recém selecionados por afinidade ou imunoafinidade podem ser rapidamente identificados pela dedução de aminoácidos da seqüência de DNA obtida de cada fago (SMITH ; SCOTT, 1993).

Desta forma, as bibliotecas de expressão de peptídeos randômicos em fagos constituem-se em ferramentas de alta relevância para aplicações proteômicas, incluindo mapeamento de ligantes proteína-proteína, identificação

de ligantes em receptores, identificação de peptídeos miméticos a ligantes não  
protéicos e mapeamento de epitopos (SCOTT; SMITH, 1990; FELICI et  
al.,1991; DEVLIN, et al., 1990; O'NELL et al., 1992).

## 2. OBJETIVOS

- 1- Caracterizar por *immunoblotting* e imunofluorescência os antígenos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais A4D12 e A3A4.
- 2- Verificar a natureza dos epitopos (conformacional ou linear) reconhecidos por estes anticorpos monoclonais.
- 3- Identificar o número de isoformas protéicas reconhecidas por estes anticorpos monoclonais.
- 4- Mapear por tecnologia de *phage display* os epitopos reconhecidos por estes anticorpos monoclonais.
- 5- Avaliar se os anticorpos monoclonais apresentam reatividade às diferentes cepas de *T. gondii* e a outros parasitos do filo Apicomplexa, *Neospora caninum* e *Eimeria acervulina*.
- 6- Verificar se bloqueio dos epitopos reconhecidos pelos anticorpos monoclonais A4D12 e A3A4 afeta a infectividade de taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH em camundongos C57BL6.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Parasitos e preparação de antígenos

Taquizoítas da cepa RH foram mantidos por passagens intraperitoniais em camundongos Swiss em intervalos de 2 a 3 dias (MINEO et al., 1980). Para colheita dos parasitos, o exsudato peritoneal dos animais foi colhido e centrifugado a 45 x g por 1 minuto, para a remoção de células e debris. A seguir, o sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 1000 x g por 10 minutos. O sedimento enriquecido em parasitos foi lavado por mais duas vezes em solução salina tamponada com fosfato 0,01 M pH 7.2 (PBS) e, quando necessário para a remoção de hemácias, tratado com solução tampão de lise (14 mM de NH<sub>4</sub>Cl e 17 mM de TRIS-HCl pH 7,2) por 1 minuto a temperatura ambiente. Terminado os ciclos de centrifugação, os taquizoítas foram contados em câmara de Neubauer e lisados por adição de tampão contendo SDS (TRIS-HCl 0.1M pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, bromophenol blue 0.2%). A concentração dos parasitos foi ajustada, com mesmo tampão, para a concentração final de  $1 \times 10^8$  parasitos.mL<sup>-1</sup>.

Os parasitos solubilizados foram novamente submetidos à centrifugação (1500 x g, 10 min.) e a fração sobrenadante foi recolhida e usada como antígeno de taquizoítas de *T. gondii* (SDSTgRH) para os ensaios de *immunoblotting*. Alternativamente, a suspensão de parasitos foi ressuspendida em PBS suplementado com inibidores de proteases, aprotinina 10 µg.mL<sup>-1</sup>, leupeptina 50 µg.mL<sup>-1</sup> e PMSF (fenil-metilsulfonil fluoreto) 1,6 mM e submetida a seis ciclos de congelamento/descongelamento (N<sub>2</sub> líquido/ 37°C) e sonicação (SCOTT et al., 1987). Após este tratamento os parasitos lisados foram

submetidos à centrifugação a 1000 x g, por 15 min a 4°C e a fração sobrenadante resultante foi coletada e o seu conteúdo protéico quantificado utilizando o método de dosagem de Lowry (LOWRY et al., 1951). Antígenos solúveis de *T. gondii* (TSA) preparados e quantificados foram utilizados para os ensaios de ELISA.

Já os antígenos de taquizoítas da cepa ME49 foram obtidos inicialmente de encéfalos de camundongos C57BL6 infectados por 30 dias. Os cérebros foram removidos da cavidade craniana e homogeneizados em solução PBS com o auxílio de uma seringa com agulha de calibre de 25G. Posteriormente, o homogeneizado foi acrescido de dextran 30% (v/v) e centrifugado 4000 x g (duas vezes) para purificação dos cistos. Os cistos obtidos foram tratados com solução de digestão composta de 1% de NaCl, 1,4% de HCl e 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina (atividade 1:60.000) por 1 minuto a 37°C. A suspensão de bradizoítas assim obtida foi neutralizada com uma solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1 % e a seguir utilizada para infecção de monocamadas de células de linhagem de fibroblastos humanos (ATCC CRL 1635, Hs68), cultivados em meio RPMI completo suplementado com soro fetal bovino 10% (FREYRE, 1995). Após o cultivo de 2-3 semanas as formas taquizoítas foram coletadas dos frascos de cultura e purificadas como descrito para a cepa RH. A fração sedimentada foi ressuspensa em tampão contendo SDS e centrifugada a 1500 x g, durante 10 min, a 4°C. A fração sobrenadante foi coletada (antígeno - SDSTgME) e utilizada em ensaios de *immunoblotting*. Outros parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa, *Neospora caninum* e *Eimeria acervulina* foram preparados por lise na presença de SDS como descrito para SDSTgRH e SDSTgME.

### 3.2. Produção de anticorpos monoclonais (mAbs)

Taquizoítas de *T. gondii* (RH) foram coletados de exudato peritoneal e parcialmente purificados como descrito na seção anterior, fixados com acetona 30% em PBS por 4°C durante 72 horas. Após a fixação, os parasitos foram lavados em solução PBS e utilizados para imunização de camundongos BALB/C. Os animais foram imunizados por via intraperitoneal utilizando um volume de 100 µl de uma suspensão de  $1 \times 10^7$  parasitos.mL<sup>-1</sup> em intervalos regulares de 15 dias em três inoculações sucessivas. Sete dias antes da realização do processo de fusão, os animais foram inoculados com a mesma concentração de parasitos, porém por via endovenosa. A produção dos hibridomas foi conduzida como previamente descrito por Kohler e Milstein, com pequenas modificações (KOHLE E MILSTEIN, 1975). Após o término do esquema de imunização, o baço dos animais foi coletado e divulsionado em meio DMEM estéril sem soro fetal bovino. Os esplenócitos obtidos foram adicionados à suspensão de células de mieloma murino SP2O/Ag14 na proporção de 1:1 e a seguir, as populações mistas de células foram centrifugadas a 1.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao sedimento de células adicionou-se lentamente polietilenoglicol 1500 na concentração de 50%, sob agitação constante a 37°C durante um minuto, quando então o volume foi completado para 50 ml com DMEM sem soro fetal bovino. As células foram lavadas por duas vezes em meio DMEM e semeadas em meio HAT/HT (Sigma Chemical Co) contendo 20% de soro fetal bovino para a seleção das células fusionadas (hibridomas) por período de 21 dias.

Hibridomas secretando anticorpos foram selecionados por ELISA indireto e clonados por diluição limitante em placas de 96 orifícios. Os hibridomas

clonados formam amplificados em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, 2 mM de glutamina, 50  $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol e 40  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> de gentamicina e estocados em nitrogênio líquido.

### **3.3. Eletroforese uni- e bi-dimensional (SDS-PAGE 1D E 2D)**

Os antígenos de *T. gondii* foram resolvidos em sistema unidimensional utilizando tampão descontínuo como descrito por Laemmli (LAEMMLI, 1970) e sistema de placas de vidro descrito por Studier (STUDIER, 1973). Os géis de poliacrilamida nas concentrações de 8 e 10% foram montados em placas do sistema de eletroforese SE250 (Amersham Biosciences, UK) de dimensões 8 x 10 x 0,075 cm e as amostras foram preparadas como descrito no item 3.1. Antígenos de *T. gondii* solubilizados em SDS foram tratados na presença e ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) a 95°C por 5 minutos e utilizados para eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). As proteínas foram eletroforeticamente separadas utilizando uma corrente de 20 mA.

Após a corrida, os géis foram corados com solução de coomassie (0,5 g Coomassie brilliant blue R-250 dissolvido em metanol 50% e ácido acético 10%) e descorados em solução de 10% de ácido acético e 50% de metanol. Uma vez descorados foram mantidos em ácido acético 7% até a digitalização das imagens. Já a eletroforese bidimensional foi conduzida em aparelho Mini Protean Cell (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) utilizando como de primeira dimensão tampões NaOH 0,08% (cátodo) e ácido fosfórico (0,07%). Os capilares foram preenchidos com solução de poliacrilamida a 9% e submetidos à pré-corrída de 200 V (10 min), 300 V (15 min) e 450 volts (15min)

respectivamente. Terminada a pré-corrída 20 µl das amostras de taquizoítas da cepa RH ( $1 \times 10^8$  parasitos.mL<sup>-1</sup>) diretamente solubilizados em solução de focalização isoeétrica (9M de uréia, 2% de Triton X-100 e 1% de anfólitos com gradiente de pH 3,5-10) foram focalizados por 4 horas utilizando voltagens de 750 volts. Terminada a focalização isoeétrica das proteínas, o gel foi excisado do tubo capilar e estocado a -20°C. A segunda dimensão foi realizada como descrito anteriormente para SDS-PAGE 1D. Alternativamente os antígenos resolvidos em SDS-PAGE 1D e 2D foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito a seguir.

### **3.4. Immunoblotting**

Os antígenos separados em SDS-PAGE de uma ou duas dimensões foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose como descrito por (TOWBIN *et al.*, 1979). Para o *immunoblotting*, membranas de SDS-PAGE 1D cortadas em tiras de 3-4 mm ou membranas totais de SDS-PAGE 2D foram bloqueadas com solução salina fosfato tamponada acrescida de TWEEN 20 a 0,05% (PBST) e suplementada com leite desnatado 5% durante 1 hora e a 37°C. Terminado este tempo, as membranas totais ou em tiras foram incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas de interesse 1B8 (anti-p97), A4D12 (anti-p22), A3A4 (anti-p30) ou E9 (anti p30) por período de 1 hora e a 37°C. A seguir, a detecção da ligação dos mAbs aos antígenos imobilizados em nitrocelulose foi realizada pela subsequente incubação das membranas com o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongos conjugado à peroxidase (1:1000; Sigma Chemical Co.). Posteriormente, as membranas foram novamente lavadas em PBST e reveladas com tabletes de

3, 3'diaminobenzidina (Sigma Fast™; Sigma Chemical Co.) ou por kit de quimioluminescência (ECL, Amersham Biosciences, UK) como descrito pelo fabricante.

### **3.5. Purificação de anti-P30 por imunoadsorção**

Antígeno total de *T. gondii* foi preparado em SDS como descrito no item 3.1. e eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose. Membranas de nitrocelulose foram cortadas na altura do componente de 30 kDa, utilizando como referência proteína padrão de 29 kDa. As membranas contendo p30 foram submetidas ao bloqueio em solução PBS suplementada com leite desnatado a 5%, lavadas em PBST e incubadas por 16 horas com sobrenadantes de cultura dos hibridomas A3A4 e E9 para ligação dos anticorpos P30 específicos. Terminado este tempo, as membranas foram novamente lavadas e os anticorpos ligados foram eluídos com tampão 0,1 M de glicina em pH 2,6. O eluído foi rapidamente neutralizado e estocado a 4°C para posterior reação de *immunoblotting*.

### **3.6. Imunofluorescência**

Taquizoítas (RH) foram coletados e fixados com solução de formaldeído a 1% durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a fixação, os parasitos foram lavados duas vezes em PBS e semeados sobre lâminas de vidros, previamente limpas em solução álcool-éter, na densidade de 50 parasitos por campo. O excesso da suspensão foi removido e os parasitos aderidos nas lâminas foram preservados até uso sob refrigeração a -20°C. Para a reação de

imunofluorescência, as lâminas contendo taquizoítas foram incubadas com os sobrenadantes de cultura dos hibridomas de interesse (mAbs) por período 45 minutos e a temperatura de 37°C. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes (5 minutos cada) em solução de PBS e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fluoresceína (FITC) na diluição de 1:50 (v/v), durante 30 minutos a 37°C. Terminado este tempo, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e montadas utilizando glicerina tamponada carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9,5. As lâminas foram analisadas em microscópio de epifluorescência (Olympus BH2, Tokyo, Japan). A aquisição das imagens foi realizada em filme fotográfico asa 400 utilizando abertura do diafragma da câmera (módulo automático) por período de exposição de 2-4 minutos.

### **3.7. Ensaio de secreção**

Para os ensaios de secreção, taquizoítas da cepa RH foram rapidamente coletados em banho de gelo e lavados por duas vezes com solução PBS gelada. A seguir os parasitos foram ressuspendidos em solução salina balanceada de Hank (140 mM de NaCl, 1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 5 mM de KCl, 0,2% de Glicose, 0,7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,5 mM de NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em pH. 7,5) e ajustados para a concentração de  $4 \times 10^8$  parasites.mL<sup>-1</sup> e incubados em banho-maria a 37°C em períodos de 0, 15, 30 e 45 minutos. Ao final de cada tempo, os parasitos foram removidos por centrifugação a 1500 x g, 10 minutos a 4°C. As frações contendo os antígenos excretados/secretados (ESA) pelos parasitos nos tempos 0, 15, 30 e 45 minutos foram resolvidas em SDS-PAGE 10%, eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences,

UK) e sondadas com os mAbs 1B8, A3A4 e A4D12. Como controle interno da reação de *immunoblotting*, padrões de parasitos lisados por SDS (STDs) na concentração ( $1 \times 10^6$  parasitos/poço) foram utilizados nas diluições de 1:50 (2%), 1:10 (10%) ou puro (100%).

### **3.8. Ensaio de detecção das trilhas de deslizamento (“Gliding”) deixadas por taquizoítas de *T. gondii***

Taquizoítas (RH) foram coletados e lavados 2 vezes em solução de Hank suplementada com HEPES 10 mM e EGTA 1mM e imediatamente ajustado para  $2,5 \times 10^6$  parasitos.mL<sup>-1</sup>. Os parasitos foram depositados sobre lamínulas de vidro, previamente tratadas com soro albumina bovina 50 µg.mL<sup>-1</sup> durante 30 minutos e incubados por 15 minutos a 37°C em atmosfera úmida de CO<sub>2</sub> a 5%. Ao final deste tempo, as lamínulas foram lavadas em PBS e fixadas em solução de formalina a 2% por 10 minutos a temperatura ambiente. Para a detecção das trilhas de antígenos liberados por taquizoítas durante a movimentação sobre o substrato, as lamínulas foram processadas como previamente descrito para imunofluorescência (HAKANSSON, et al. 1999).

### **3.9. Purificação de anticorpos for afinidade**

Para purificação dos anticorpos monoclonais A4D12 e A3A4 a partir de sobrenadantes de cultura de hibridomas, resina de imunoafinidade de proteína G-sepharose (Amersham Biosciences, UK) foi pré equilibrada com 50 ml de solução fosfato a 100 mM em pH 8,0 (10 volumes da resina). A seguir, 20 ml de cada sobrenadante de cada hibridoma foram diluídos 1:1 (v/v) com tampão fosfato e aplicado à resina com fluxo de 0,5 ml.min<sup>-1</sup>. Ao final da aplicação, a

resina foi lavada com o mesmo tampão utilizado no equilíbrio e a densidade óptica (OD) do lavado foi monitorada a 280 nm até atingir a linha de base (OD mensurada antes da aplicação). As imunoglobulinas (mAbs) retidas na resina foram eluídas por adição de tampão 0,2 M de glicina em pH 2,6 e coletadas em frações de 3-5 ml. As frações que apresentavam maiores absorbâncias a 280 nm foram reunidas e neutralizadas com solução tampão de TRIS-HCl 1 M, pH 7.5. Posteriormente, a fração purificada de mAbs foi dialisada em PBS e concentrada em equipamento Amicon™ (Milipore, Billerica, MA, USA) utilizando membranas com limite de filtração de 30 kDa. O conteúdo protéico de cada mAb purificado foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951).

### **3.10. Seleção de peptídeos através de biblioteca de fagos (“phage display”)**

Para a seleção de peptídeos, placas de microtitulação (NUNC maxisorp<sup>RT</sup>-Nalge Nunc International Co., Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com 15 µg.poço<sup>-1</sup> dos mAb de interesses diluídos em tampão com 0,06 M de carbonato-bicarbonato em pH 9,6 por 16 horas a 4°C (SILVA JR, et al., 2002). Ao final da sensibilização, as placas foram bloqueadas (100 µl.poço<sup>-1</sup>) com solução tampão de 50 mM de TRIS-HCl em pH 7.5 e NaCl 150 mM (TBS), contendo 5 mg.ml<sup>-1</sup> de soro albumina bovina (BSA) por um período de 1 hora a temperatura ambiente. Terminado o bloqueio, as placas foram lavadas por seis vezes em TBS contendo 0,1% de TWEEN 20 (TBST) e incubadas com 4 x 10<sup>10</sup> partículas de fagos por poço previamente diluídos em PBS e oriundos da biblioteca de peptídios expressos em fagos M13 (Ph.D.-12 Peptide Library Kit, New England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA). Fagos não ligados à placa

foram removidos por mais um ciclo de lavagens com TBST. As partículas de fagos especificamente ligados à placa foram eluídas com a adição de tampão glicina a 0,2 M com pH 2,2 acrescido de  $1\text{mg.mL}^{-1}$  de BSA, durante 10 minutos. A fração eluída enriquecida em fagos foi imediatamente neutralizada com 1 M de TRIS-HCl, pH 9.0. Os fagos recuperados na eluição foram amplificados em *E. coli* ER2537 por um período de 4 horas e parcialmente purificados utilizando 20% de polietileno glicol 8000 (PEG) e 2,5 M de NaCl (Sigma Chemical Co.), conforme os procedimentos descritos no kit de biblioteca de peptídios (Ph.D.-12 Peptide Library Kit).

Após titulação em placas de meio LB-ágar semeadas com *E. coli* ER2537, os fagos foram submetidos a mais três ciclos de ligação-amplificação. Os fagos isolados do terceiro ciclo (*3<sup>o</sup> round*) foram analisados por ELISA indireto para a seleção de fagos específicos aos mAbs A4D12 e A3A4.

### **3.11. ELISA fago**

Placas de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foram sensibilizadas com fagos isolados diluídos em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06 M em pH 9,6, na concentração de  $1 \times 10^{10}$  partículas.orifício<sup>-1</sup>, durante 16 horas a 4°C (Manoutcharian et al., 2004). Como controles, orifícios foram sensibilizados nas mesmas condições descritas acima com antígeno TSA (0,5  $\mu\text{g.orifício}^{-1}$ ) ou fago M13 tipo selvagem a ( $1 \times 10^{10}$  partículas.orifício<sup>-1</sup>). A seguir as placas foram lavadas por três vezes em PBST e incubadas com os mAbs A4D12, A3A4 ou IgG1, como controle negativo, por período de 90 minutos a 37°C. Posteriormente as placas foram lavadas em PBST (6x) e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:1000) por 1 hora

a 37°C. Terminada a incubação, as placas foram novamente lavadas em PBS e a reação foi desenvolvida pela adição de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0 suplementado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03% e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 2N (25 µL.orifício<sup>-1</sup>) e a OD obtida monitorada em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm.

O índice de reatividade (EI) foi determinado como sendo a OD média obtida por cada fago individual dividida pela OD média obtida pelo fago selvagem (designado de *helper*). O linear de positividade foi arbitrariamente definido como sendo 3 vezes o valor de EI do fago *helper*, portanto, valores superiores a 3 foram considerados positivos.

### **3.12. ELISA inibição**

Semelhante ao observado nos procedimentos de ELISA fago, placas de alta afinidade (Costar-Corning 3590, NY, USA) foram sensibilizadas com os fagos B12, A12 e A36 previamente diluídos em 0,06 M de tampão carbonato-bicarbonato em pH 9,6 e na concentração de  $1 \times 10^{10}$  partículas.orifício<sup>-1</sup>, por 16 horas a 4°C. Para realização do ensaio de inibição, o mAb A3A4 foi previamente incubado com diluições crescentes decimais de TSA, variando de 0 a 100 µg.mL<sup>-1</sup>, por um período também de 16 horas e a 4°C. Ao término das 16 horas, as placas foram lavadas em PBST (3x) e incubada com o mAb A3A4 preparado com as diferentes concentrações do TSA, por 90 minutos a 37°C. A seguir, as placas foram lavadas em PBST (6x) e incubadas com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:1000) por 1 hora a 37°C. As placas foram novamente lavadas em PBS e a reação foi desenvolvida pela

adição de tampão citrato-fosfato a 0,1 M em pH 5.0 suplementado com 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e orto-fenilenodiamina (OPD) a 1 mg.mL<sup>-1</sup>. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 2N (25 µL.orifício<sup>-1</sup>) e as OD obtidas foram monitoradas em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, USA) a 492 nm. A porcentagem de inibição do TSA para cada fago foi calculada pela OD média das diferentes concentrações do inibidor (TSA) dividida pela OD média obtida na ausência do inibidor (zero µg.mL<sup>-1</sup>) multiplicada por 100.

### **3.13. Seqüenciamento de DNA e dedução de aminácidos.**

Os fagos isolados durante a seleção de peptídeos reativos aos mAbs de interesse foram amplificados em cultivo de *E. coli* ER2537 em meio LB líquido por período de 5 horas e parcialmente purificados por PEG 8000/ NaCl como descrito no item 3.10. Após purificação, o DNA de fita simples dos fagos foi extraído pela adição de solução tampão de iodeto de sódio (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaI 4 M) e etanol PA por 10 minutos, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O DNA de fagos contido no precipitado foi lavado com etanol 70%, solubilizado em água Milli-Q e avaliado em gel de agarose a 2% quanto a pureza e qualidade. A reação de sequenciamento foi executada com 200-500 ng de DNA de fagos e "primer" – 96 M13 (5' HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG 3'), utilizando o Kit de marcação DYEnamic ET Dye Terminator™ (Amersham Biosciences) para seqüenciador automático MegaBace (Amersham Biosciences, UK). As seqüências de DNA obtidas foram deduzidas em seqüências de aminoácidos utilizando a plataforma RELIC como descrito por Mandava (MANDAVA et al., 2004).

### **3.14. Análises das seqüências e visualização tridimensional da molécula de SAG1.**

As seqüências obtidas dos fagos foram analisadas utilizando BLASTP (Search for short, nearly exact matches) disponíveis no site ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) delimitando a procura ao organismo *Toxoplasma gondii*. A estrutura tridimensional da molécula de SAG1 (He et al., 2002) foi obtida em formato PDB (pdb:1KZQ, mmdb:20210) disponível no site ([www.ncbi.nlm.nih.gov/structure](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure)).

As seqüências que alinharam parcialmente com os peptídeos identificados foram destacadas na estrutura tridimensional de SAG1 usando o programa Cn3D versão 4.1 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.shtml/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/CN3D/cn3d.shtml/)).

### **3.15. Ensaio de bloqueio epitópico por monoclonais A4D12 e A3A4**

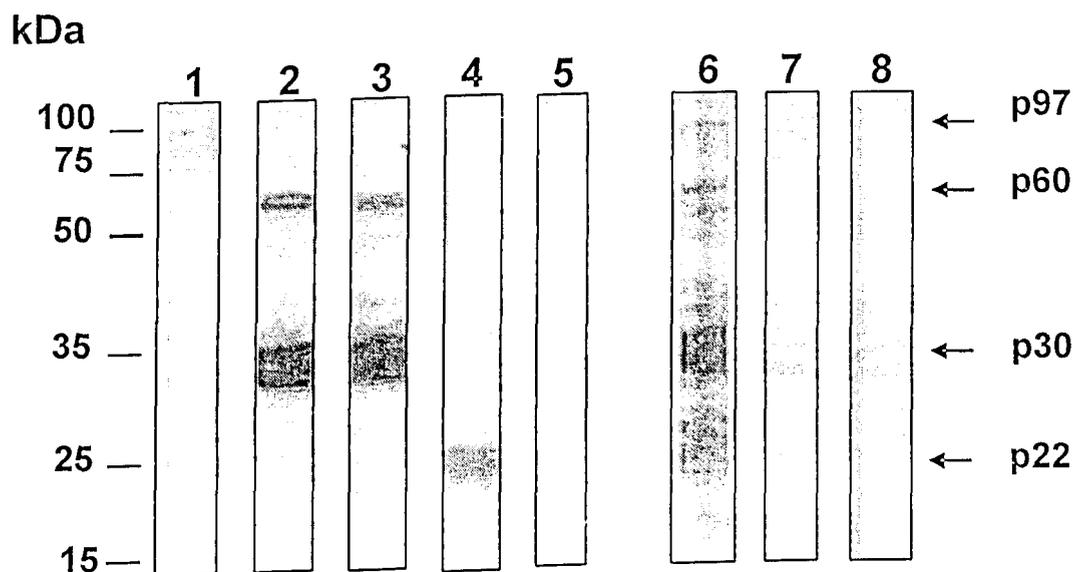
Para o ensaio de bloqueio epitópico, camundongos C57BL6 foram divididos em três grupos, um contendo 4 animais e dois outros com 5 animais cada um. Cada animal de cada grupo foi infectado por via intraperitoneal com  $10^3$  taquizoítas da cepa RH previamente tratados com os mAbs A4D12, A3A4, ou IgG irrelevante na concentração de  $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$  durante 30 minutos, a  $37^\circ\text{C}$  e em atmosfera úmida de  $\text{CO}_2$  a 5%. Os animais foram observados diariamente e a mortalidade em cada grupo foi registrada e comparada usando o método de Kaplan-Meyer utilizando o software GraphPad Prism, versão 4.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. mAbs produzidos reconhecem proteínas de 30/60 (p30/60) e 22 kDa (p22) em antígenos de *T. gondii*

Com o intuito de caracterizarmos os anticorpos monoclonais produzidos no laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia realizamos ensaios de *immunoblotting* com tiras de membranas de nitrocelulose preparadas com antígenos de *T. gondii* da cepa RH e sondados com os mAbs de interesse 1B8, A4D12, A3A4, E9. Como demonstrado na Figura 4, o mAb A3A4 (tira 2) e E9 (tira 3) reconhecem dois polipeptídios principais, um com mobilidade eletroforética estimada em 30kDa (p30) e outro de aproximadamente 60 kDa (p60). Diferentemente deste perfil de reação observado, o mAb A4D12 (tira 4) reconhece um único polipeptídeo de 22kDa. Como controle positivo para a reação dos monoclonais, os antígenos foram também sondados com o mAb 1B8, gentilmente cedido pelo Dr. Loyd Kasper (Dartmouth Medical School, Lebanon, NH, USA), como podemos observar na tira 1 somente um único polipeptídeo 97 kDa foi reconhecido por este monoclonal (MINEO et al. 1994). O controle negativo realizado com a incubação da fita com meio de cultura de hibridomas não revelou nenhum polipeptídeo de *T. gondii* (tira 5). Adicionalmente, outras três tiras foram utilizadas como controle da reação. Na tira 6 polipeptídeos de 20-100 kDa foram reconhecidos por soro de camundongos imunizados com *T. gondii*. Na tira 7 nenhuma reatividade foi detectada com o soro de camundongo pré imunização e na tira 8 o controle foi realizado somente com a incubação com o

anticorpo conjugado. Como podemos verificar nesta tira nenhuma banda foi revelada.



**Figura 4: Identificação de p97, p30/60 e p22 em antígenos de *T. gondii* sondados com os mAbs 1B8, A3A4, E9 e A4D12.**

1D-immunoblotting (10% SDS-PAGE) de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS e sondados com os mAbs 1B8 (anti-p97), tira 1; A3A4 e E9 (anti-p30/60), tiras 2 e 3; e A4D12 (anti-p22), tira 4. A tira 5 corresponde a incubação somente com meio de cultura. As tiras 6, 7 e 8 correspondem aos controles realizados com o soro imune de camundongo, soro de camundongo normal e o anticorpo conjugado, respectivamente. As setas à direita indicam os polipeptídeos de 97, 30, 60 e 22 kDa. Onde indicado à esquerda, padrão de peso molecular.

#### **4.2. Os componentes de 30 e 22 kDa estão presentes na superfície de**

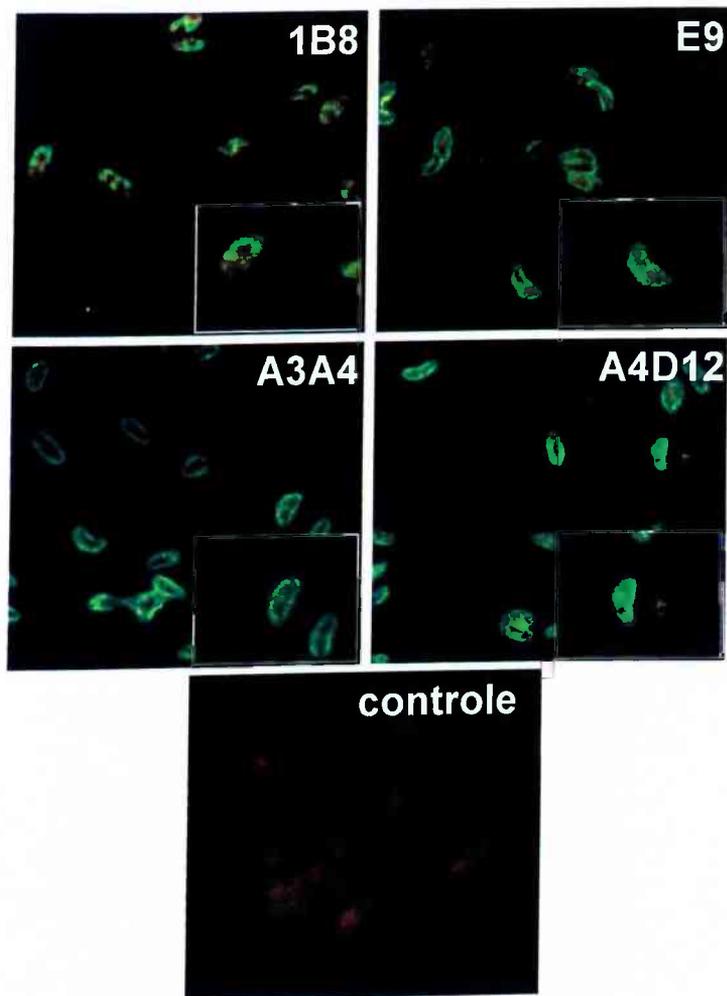
##### ***T. gondii***

Uma vez que os anticorpos A3A4, E9 e A4D12 revelaram componentes de 30/60 e 22 kDa, respectivamente, resolvemos investigar a localização celular destes componentes através de técnica de imunofluorescência indireta. Observando a Figura 5 podemos verificar que, os mAbs A3A4, E9 e A4D12 reagem fortemente com taquizoítas de *T. gondii* e em especial com a superfície do parasito. Contrastando com o perfil dos demais mAbs, o mAb 1B8, como esperado, produz uma coloração intracelular heterogênea e granular. Como controle, taquizoítas foram incubados somente com anticorpo conjugado com FITC, e como evidenciado nenhuma marcação foi observada. Estes dados sugerem que diferente da p97 intracelular as proteínas de 30/60 e 22 kDa são antígenos de superfície do parasito *T. gondii*.

#### **4.3. Anticorpos específicos contra p30 reconhecem componentes de 30 e 60 kDa em antígeno de *T. gondii***

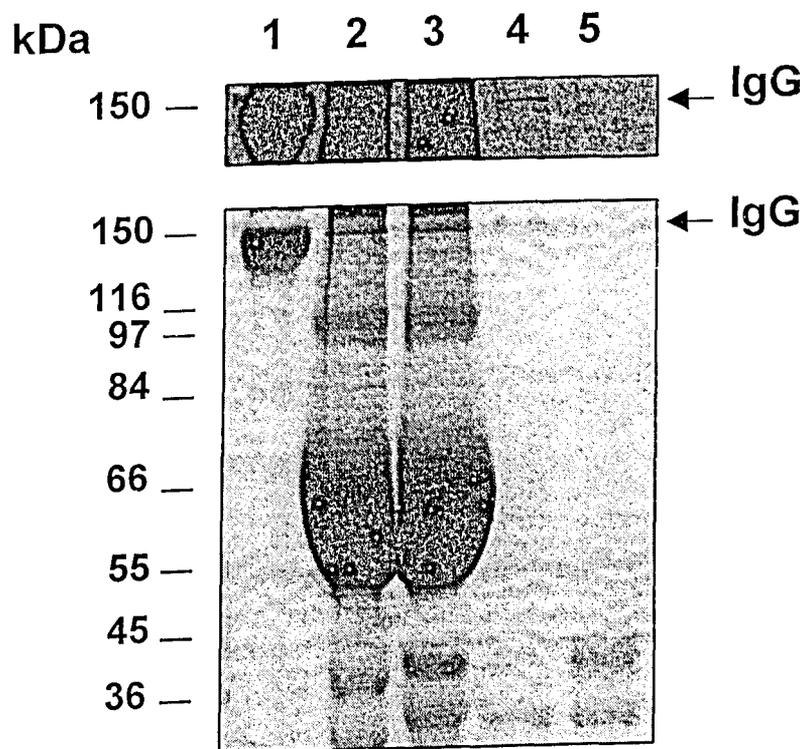
Com o objetivo de verificarmos se as marcações encontradas com os anticorpos monoclonais A3A4 e E9 correspondiam ao reconhecimento de epítomos comuns compartilhados por p30 e p60, preparamos um ensaio de imunoabsorção baseado na purificação de anticorpos monoclonais anti-p30; visando posterior avaliação da reatividade deste anticorpo ao antígeno total de *T. gondii* por *immunoblotting*. A Figura 6 mostra o perfil eletroforético em SDS-PAGE das frações obtidas do processo de purificação de anticorpos anti-p30. Na raia 01, banda controle de 150 kDa de IgG de camundongo purificada. As

raias 2 e 3 demonstram o perfil eletroforético dos componentes presentes nos sobrenadantes de cultura do hibridoma A3A4, variando de 36-205 kDa. Nestas raias, chamam a atenção as bandas de 150 kDa, possivelmente de mAb, e a grande quantidade de albumina (66 kDa) proveniente do soro fetal bovino. Na raia 4, podemos observar uma banda de IgG tênue eluída das membranas de nitrocelulose (anti-p30) e outras proteínas de menor peso molecular oriundas do bloqueio com leite desnatado. A raia 5 mostra o perfil eletroforético de proteínas de leite desnatado preparado a 0,1%. Dados similares foram obtidos com a preparação do mAbE9 (dado não mostrado). A fração enriquecida com os anticorpos monoclonais anti-p30 (Figura 6, raia 4) foi a seguir ensaiada por *immunoblotting*. Como observado na Figura 7, as IgGs anti-p30 foram reativas a ambos os componentes de 30 e 60 kDa (tiras 3). Dados similares foram obtidos com os sobrenadantes de cultura dos mAbs A3A4 e E9, tanto pré quanto pós-adsorção, tiras 1 e 2. Nenhuma reatividade foi observada na tira 4, incubada somente com meio de cultura. Duas tiras adicionais foram utilizadas como controle da reação. Na tira 5, antígenos de *T. gondii* de 20-100 kDa foram revelados com soro imune de camundongos imunizados. Como esperado, nenhuma reatividade foi detectada com o soro de camundongo pré imunização, tira 6. Estes dados em conjunto, sugerem fortemente que p30 e p60 compartilham um epítopo comum reconhecido pelos mAbs A3A4 e E9.



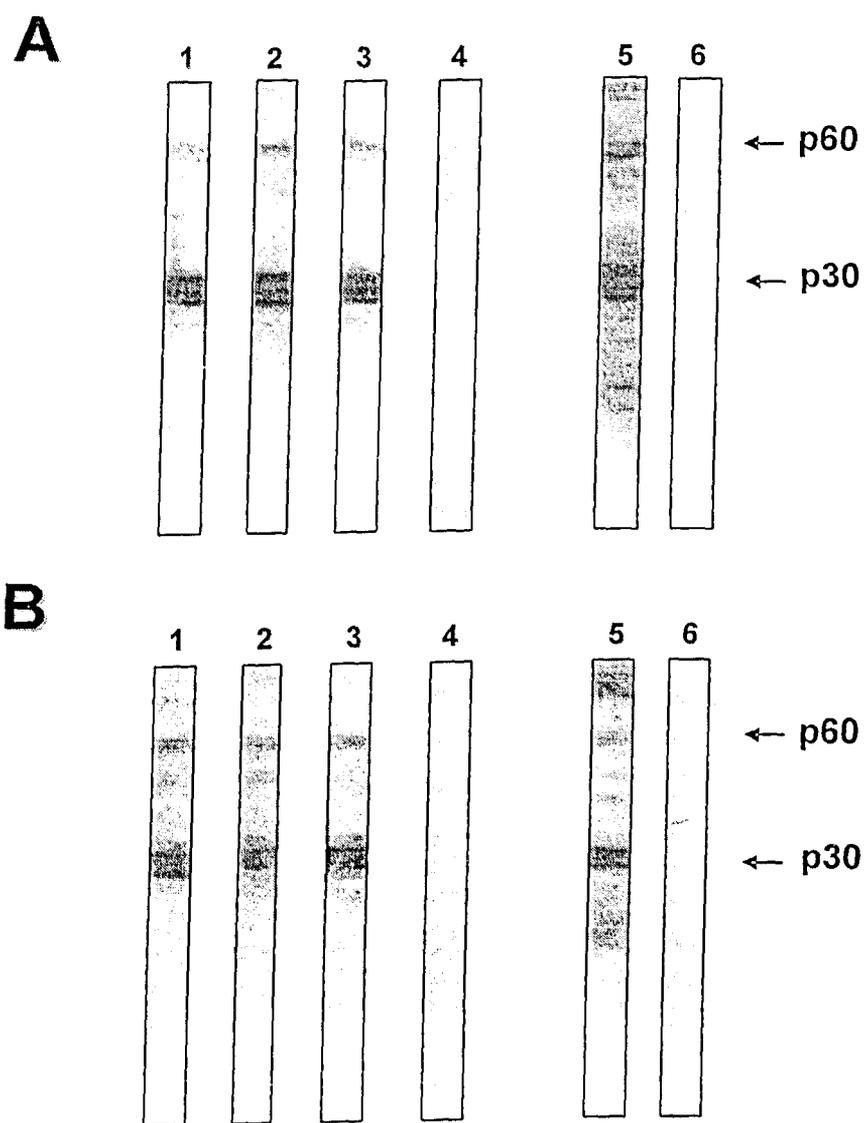
**Figura 5: Imunolocalização de p97, p30/60 e p22 em taquizoítas da cepa RH de *T. gondii***

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram coletados de exudato peritoneal, fixados em solução de formaldeído, lavados e incubados com os mAbs 1B8, A3A4, E9 and A4D12. A seguir para a detecção da reação, os taquizoítas foram incubados com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à FITC. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 x (Olympus BH2, Tokyo, Japan). As fotos foram realizadas em filme fotográfico asa 400 utilizando período de exposição de 2 minutos. O mAb utilizado em cada preparação ou o controle realizado somente com a incubação de meio de cultura está indicado no canto superior direito de cada imagem. O inserto mostra um parasito típico de cada preparação digitalmente ampliado 1,4 x.



**Figura 6: Perfil eletroforético da purificação de anti-p30 em membranas de nitrocelulose.**

SDS-PAGE 8% da purificação de anti-p30 obtido da eluição em membranas de nitrocelulose. Onde indicado, raia 1 apresenta polipeptídeo de 150 kDa de IgG de camundongo utilizada como controle. Raia 2, sobrenadante de cultura do hibridoma A3A4 antes da adsorção em nitrocelulose impregnada com p30; raia 3 sobrenadante de cultura do hibridoma A3A4 após adsorção em nitrocelulose e raia 4, IgG anti-p30 eluida da nitrocelulose. Na raia 5, solução de leite desnatado preparado a 0,1%. Onde indicado à esquerda padrão de peso molecular. O inserto no topo da figura corresponde a um fragmento do gel digitalmente manipulado em brilho e contraste para realçar a banda IgG anti-p30 purificada.



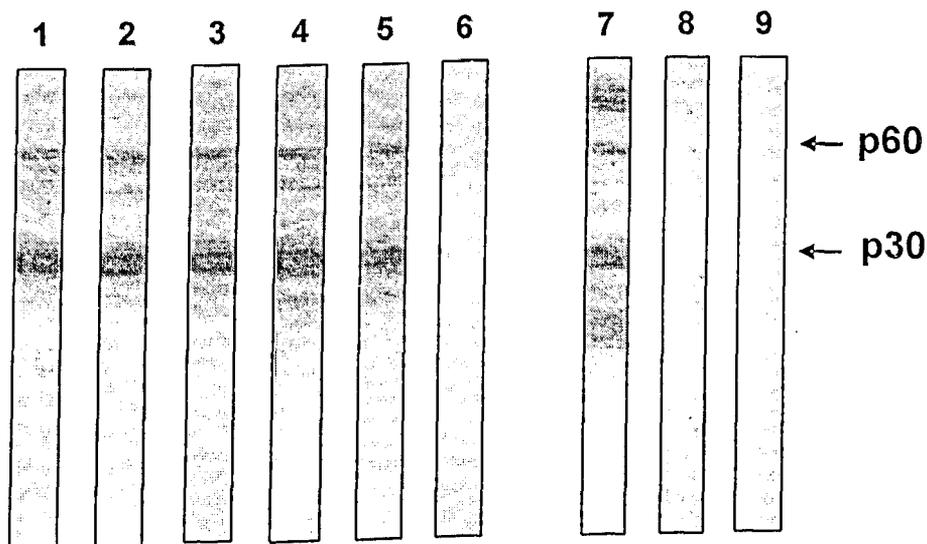
**Figura 7: Anti-p30 reconhece componentes de 30 e 60 kDa em antígenos de taquizoítas de *T. gondii*.**

1D-immunoblotting de antígenos de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS e sondados com os mAbs E9 (Painel A) e A3A4 (Painel B). Onde indicado pela tira 01 reação realizada com mAb E9 ou A3A4 antes da adsorção em nitrocelulose, tira 2, reação com mAbs pós adsorção em nitrocelulose e tira 3, mAb anti-p30 (E9 ou A3A4) eluído de nitrocelulose. A tira 04 corresponde à incubação somente com meio de cultura. As tiras 5 e 6 correspondem aos controles realizados com o soro imune de camundongo, soro de camundongo normal, respectivamente. As setas à direita indicam os polipeptídeos 30 e 60 kDa.

#### **4.4. Clones obtidos a partir dos hibridomas A3A4 e E9 apresentam perfil de reatividade similar ao observado com os hibridomas parentais.**

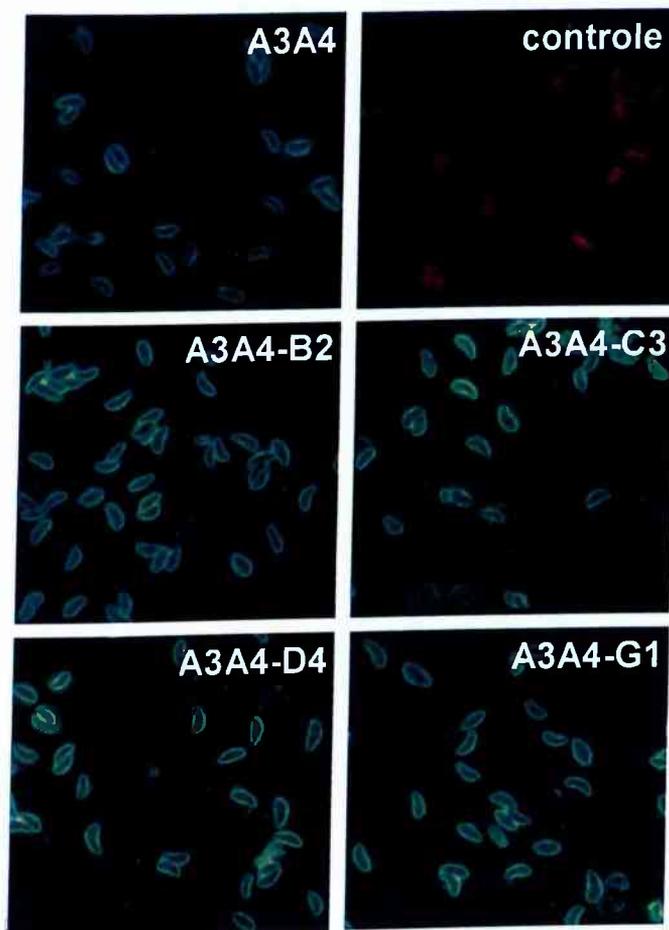
Apesar dos ensaios conduzidos com anti-p30 apontarem que p30 e p60 compartilham epitopos comuns, resolvemos realizar nova clonagem dos hibridomas de interesse. O perfil de reatividade anticórpica de cada novo clone obtido (denominados por nós de subclones) foi avaliado por técnicas de *immunoblotting* e imunofluorescência. Como mostrado na Figura 8, mAbs produzidos dos subclones (B2, C3, D4, G1) reconheceram ambas as bandas de 30 e 60 kDa (tiras 2-5), similar ao observado mAb parental A3A4 (tira1). Interessantemente, o mesmo perfil de reação foi observado para os subclones do hibridoma E9 (A3, A6, E5, E12, F9, G4, H3, H3) reconhecendo também componentes de 30 e 60 kDa em antígenos de *T. gondii* (Figura 7). Como controle, nenhuma reatividade foi obtida quando as tiras foram incubadas somente com meio (Figura 8, tira 6; Figura 10, tira 10), soro de camundongo normal (Figura 8, tira 8; Figura 10, tira 12) ou somente com anticorpo conjugado (Figura 8, tira 9; Figura 10, tira 13). O controle positivo da reação realizado com soro policlonal imune de camundongos revelou proteínas de peso molecular variando entre 100 e 22 kDa (Figura 8, tira 7; Figura 10, tira 11).

Já quando analisados pela imunofluorescência, todos os mAbs oriundos dos clones A3A4 e E9 apresentaram uma forte marcação associada à membrana do parasito, Figuras 9 e 11. Estes achados são similares aos previamente descritos nas Figuras 4 e 5 e indicam que todos os subclones isolados são idênticos em especificidade aos hibridomas parentais E9 e A3A4.



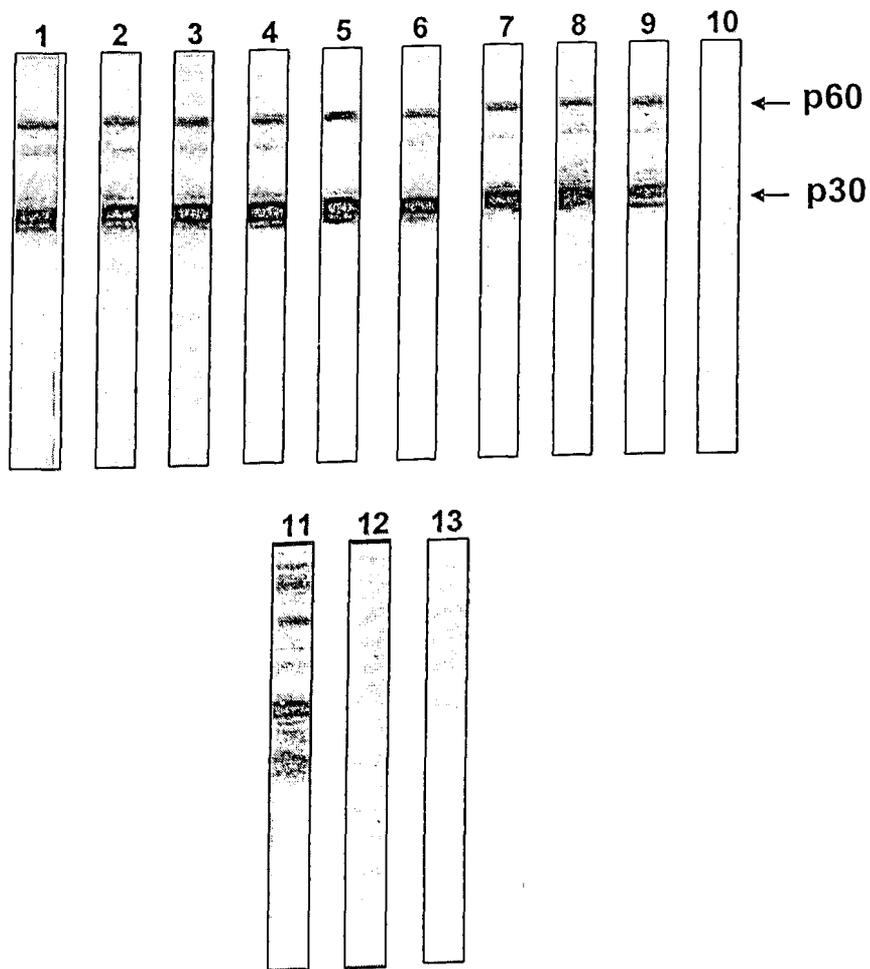
**Figura 8: Immunoblotting dos mAbs produzidos pelos clones oriundos do hibridoma A3A4.**

1D-immunoblotting de antígenos de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS e sondados com os mAbs produzidos pelo hibridoma A3A4 e seus subclones. A tira 1 corresponde a reação realizada com o mAb parental A3A4 e as tiras 2-5 aos mAbs produzidos pelo subclones A3A4-B2, A3A4-C3, A3A4-D4 e A3A4-G1. A tira 6 é um controle preparado com meio de cultura. As tiras 7, 8 e 9 correspondem respectivamente aos controles realizados com o soro imune de camundongo, soro de camundongo normal e o anticorpo secundário conjugado. As setas à direita indicam os polipeptídeos 30 e 60 kDa.



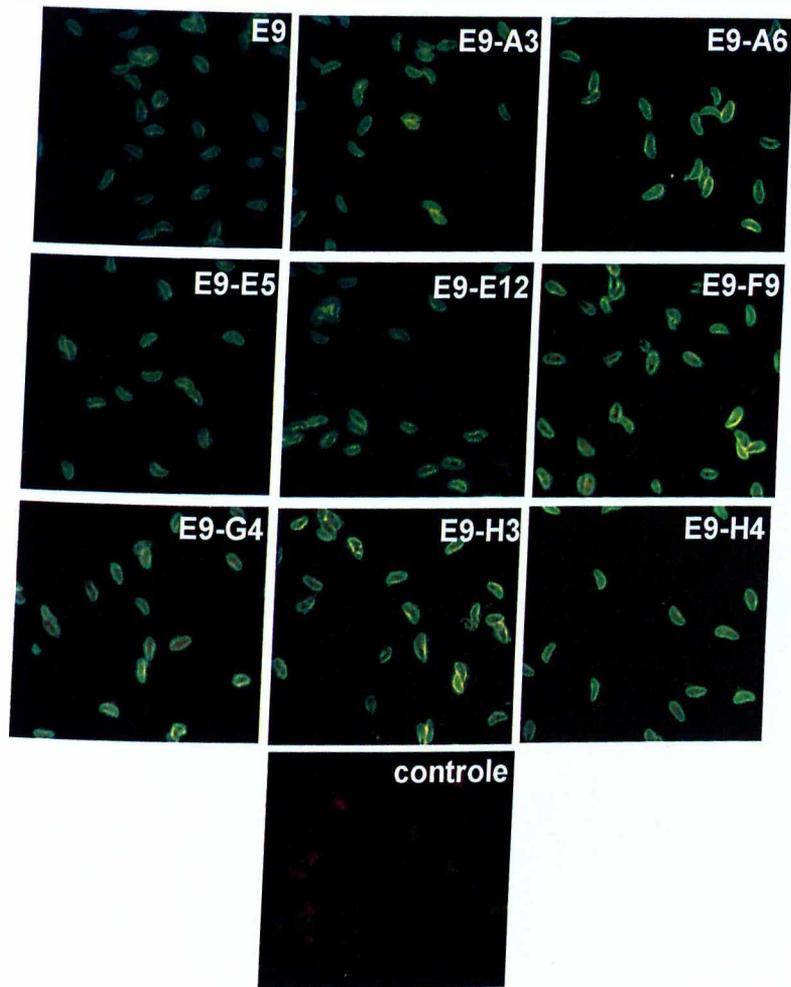
**Figura 9: Perfil de reatividade dos mAbs produzidos pelo hibridoma A3A4 e seus subclones em imunofluorescência**

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram fixados em solução de formaldeído, lavados e incubados com os mAbs A3A4 e seus subclones A3A4-B2-A3A4G1. A seguir para a detecção da reação, os taquizoítas foram incubados com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à FITC. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 x (Olympus BH2, Tokyo, Japan). As fotos foram realizadas em filme fotográfico asa 400 por exposição a 2 minutos. O mAb utilizado em cada preparação ou o controle realizado somente com a incubação de meio de cultura está indicado no canto superior direito de cada imagem.



**Figura 10: Immunoblotting dos mAbs produzidos pelos clones oriundos do hibridoma E9.**

1D-immunoblotting de antígenos de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS e sondados com os mAbs produzido pelo hibridoma E9 e seus subclones. A tira 1 corresponde a reação realizada com o mAb parental E9 e as tiras 2-9 aos mAbs produzidos pelo subclones E9-A3, E9-A6, E9-E5, E9-E12, E9-F9, E9-G4, E9-H3 e E9-H4, respectivamente. A tira 10 é um controle preparado com meio de cultura. As tiras 11,12 e 13 correspondem respectivamente aos controles realizados com o soro imune de camundongo, soro de camundongo normal e o anticorpo secundário conjugado. As setas à direita indicam os polipeptídeos 30 e 60 kDa.

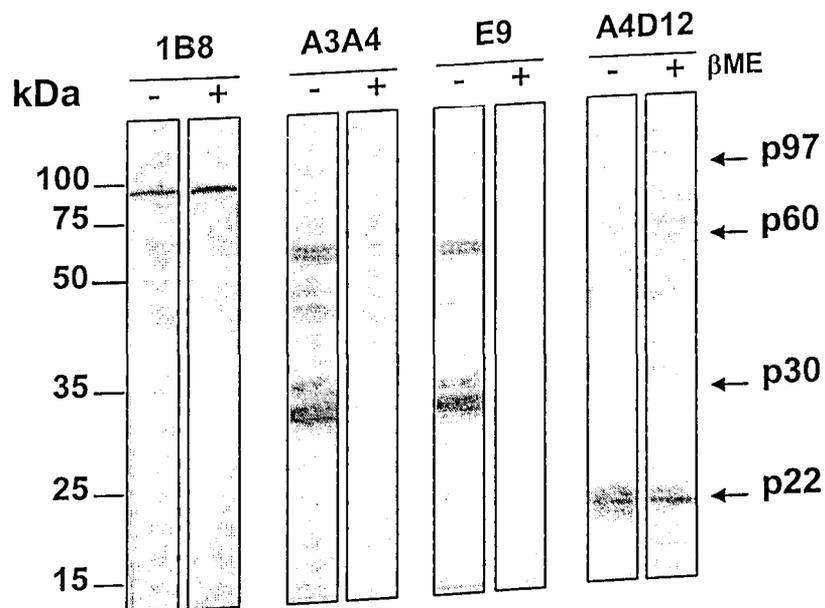


**Figura 11: Perfil de reatividade dos mAbs produzidos pelo hibridoma E9 e seus subclones por imunofluorescência.**

Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram fixados em solução de formaldeído, lavados e incubados com os mAbs E9 e seus subclones E9A3-E9H4. A seguir para a detecção da reação, os taquizoítas foram incubados com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à FITC. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 x (Olympus BH2, Tokyo, Japan). As fotos foram realizadas em filme fotográfico asa 400 por exposição a 2 minutos. O mAb utilizado em cada preparação ou o controle realizado somente com a incubação de meio de cultura está indicado no canto superior direito de cada imagem.

#### **4.5. mAb A4D12 reconhece epítipo linear enquanto mAbs A3A4 e E9 reconhecem epítipos conformacionais presentes em antígenos de *Toxoplasma gondii***

Com o objetivo de verificar a natureza dos epítipos reconhecidos pelos mAbs A3A4, E9 e A4D12 produzidos em nosso laboratório, foi realizado um ensaio de *immunoblotting* conformacional. Para esse ensaio, antígenos de *T. gondii* (SDStgRH) foram submetidos a tratamento na presença ou ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol por 5 minutos a 90°C. Como demonstrado na Figura 12, o mAb A4D12 reconheceu um polipeptídeo de 22 kDa tanto em antígenos tratados como não tratados com o agente redutor. Perfil similar de reatividade foi observado para o anticorpo não sensível a conformação 1B8, que em ambas as condições de tratamento manteve o reconhecimento a um componente de 97 kDa de *T. gondii*. Interessantemente, os mAbs A3A4 e E9 falharam em reconhecer os componentes de 30/60 kDa em antígenos submetidos a condições redutoras. Sendo assim, estes dados claramente demonstram que o mAb A4D12 interage com um epítipo linear de p22, enquanto os mAbs A3A4 e E9 reconhecem epítipos conformacionais presentes em p30. A similaridade das reações observadas nestes resultados e ensaios prévios demonstrados nas Figuras 4, 8 e 10 indica que A3A4 e E9 podem reconhecer um mesmo epítipo comum imunodominante. Desta forma, o trabalho foi continuado utilizando um único mAb direcionado a p30/60. Arbitrariamente, foi utilizado o mAb A3A4 nos ensaios subseqüentes.



**Figura 12: Immunoblotting conformacional preparado com antígenos de *T. gondii* sondados com os mAbs 1B8, A3A4, E9 e A4D12.**

1D-immunoblotting de antígenos de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) solubilizados em SDS, separados em SDS-PAGE na presença e ausência de 10% de β-mercaptoetanol (βME) e sondados com os mAbs 1B8 (anti-p97), A3A4 (anti-p30/60), E9 (anti-p30/60) e A4D12 (anti-p22). As setas à direita indicam os polipeptídeos 97, 60, 30 e 22 kDa. À esquerda, padrão de peso molecular.

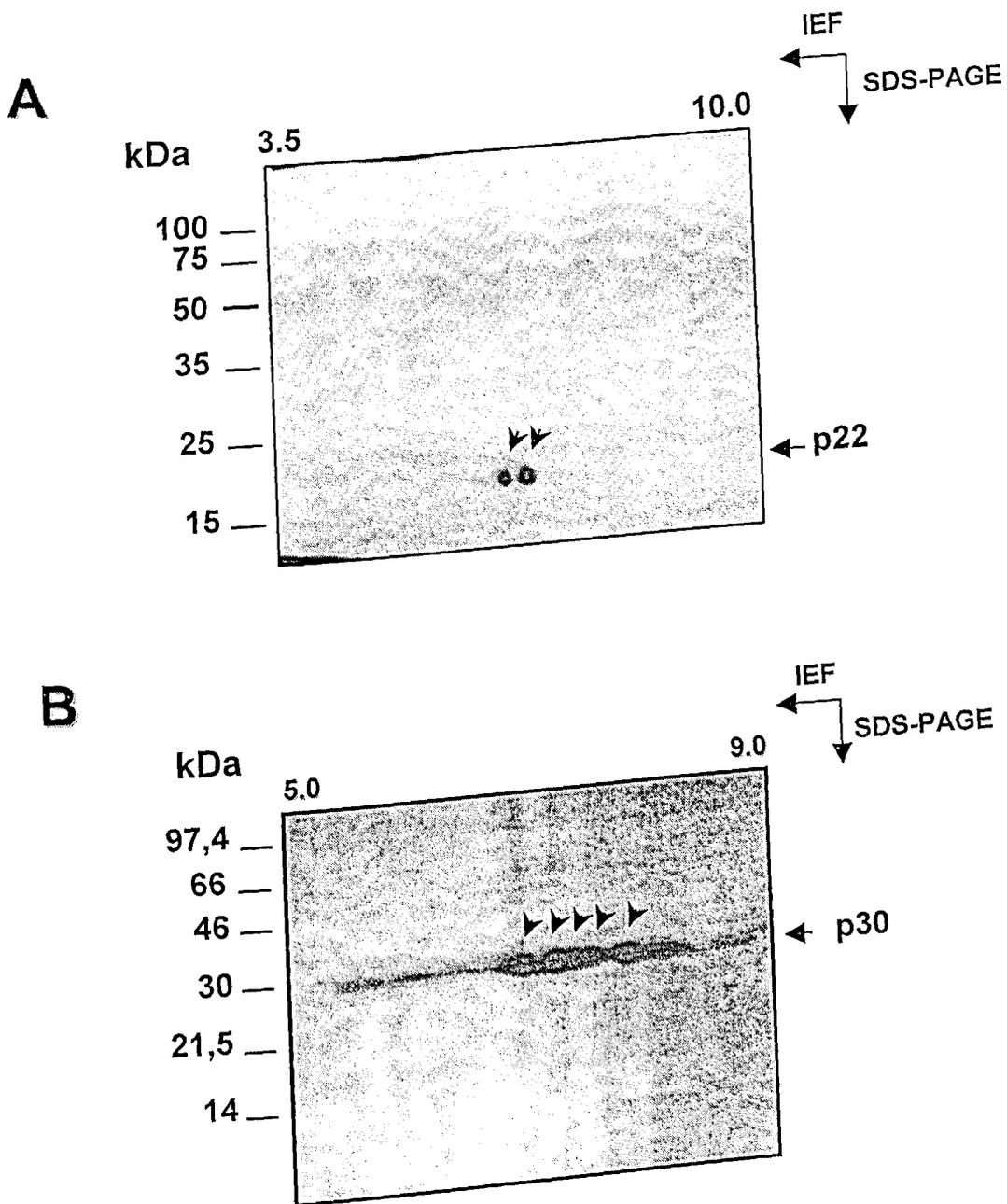
#### **4.6. mAb A4D12 reconhece duas isoformas de p22 enquanto o mAb A3A4 reconhece cinco formas variantes de p30.**

No intuito de ampliarmos a resolução e fornecer uma caracterização imunoquímica mais apurada dos mAbs A4D12 e A3A4 foi realizado um *immunoblotting* 2D com antígenos de *T. gondii*. Como demonstrado na Figura 13, o mAb A4D12 reconheceu duas isoformas de p22 apresentando ponto isoelétrico variando entre 6,4-7,4. Já a análise em 2D PAGE com o mAb A3A4 demonstrou que, pelo menos cinco variantes de p30 que se distribuem entre os pIs de 6,75 a 8,2.

#### **4.7. Os antígenos de p22 e p30 são enriquecidos na fração ESA e são liberados por taquizoítas de *T. gondii* durante os eventos de motilidade sobre o substrato.**

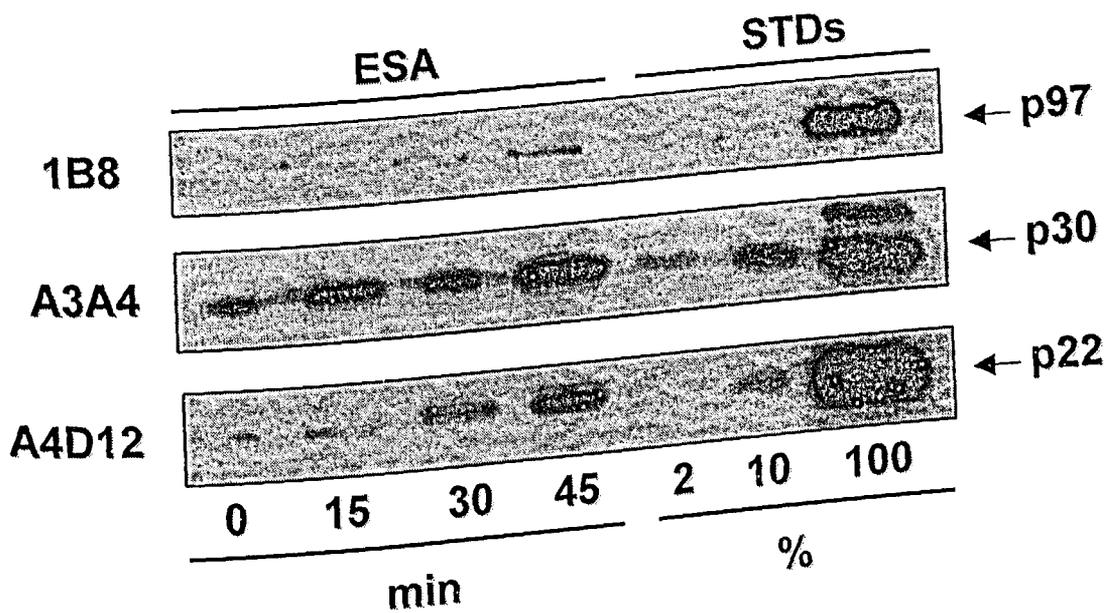
Com o objetivo de verificar se p22 e p30 são antígenos excretados/secretados de *T. gondii*, um ensaio de secreção foi preparado utilizando amostras de antígenos ESA em diferentes tempos de secreção e analisados por *immunoblotting* com os mAbs 1B8 (p97), A3A4 (p30) e A4D12 (p22). Como demonstrado na Figura 14, diferente de p97 que apresenta uma sutil marcação ao longo do tempo, p22 e p30 foram gradualmente enriquecidas na fração ESA, mostrando máxima detecção no tempo de 45 minutos. Como controle da reação, padrões de antígenos de *T. gondii* preparados em SDS foram utilizados (STDs), sendo verificado um aumento da detecção dos antígenos p97, p30 and p22 com o aumento da concentração.

Considerando que os resultados apresentados até o momento apontam que p22 e p30 são proteínas de superfície e estão enriquecidas nos antígenos excreção/secreção foi analisado por imunofluorescência indireta a presença destes componentes nas trilhas de deslizamento produzidas pelo parasito durante a movimentação sobre o substrato utilizado. Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que as trilhas de deslizamento foram fortemente marcadas pelos mAbs A4D12 e A3A4, revelando respectivamente p22 e p30 nas trilhas. Diferentemente dos resultados observados com A4D12 e A3A4, o mAb 1B8 que, como esperado, reconheceu uma proteína intracelular não secretada em taquizoítas de *T. gondii*. Estes resultados em conjunto, indicam claramente que p22 e p30, reconhecidas pelos mAbs A4D12 e A3A4 respectivamente, estão presentes na superfície do taquizoítas de *T. gondii* e são liberadas no substrato durante o processo de movimentação do parasito.



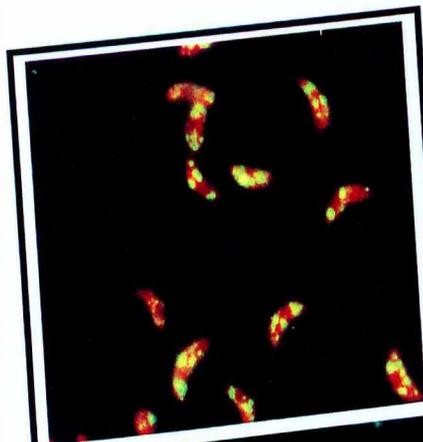
**Figura 13: Immunoblotting bidimensional de antígenos de *T. gondii* sondados com os mAbs A4D12 e A3A4.**

2D-immunoblotting de antígenos de taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) sondados com os mAbs A4D12 (anti-p22) e A3A4 (anti-p30/60). As setas à direita indicam os polipeptídeos 22 e 30 kDa. À esquerda, padrão de peso molecular. No topo da figura os números indicam o gradiente de pH dos anfólitos utilizado em cada preparação.

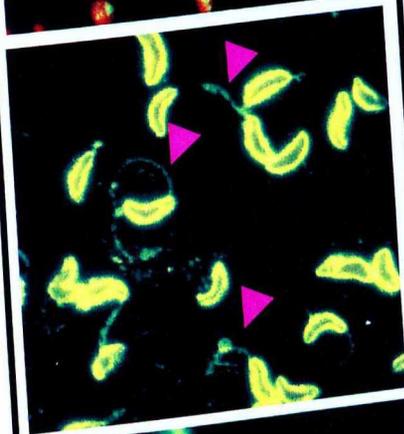


**Figura 14: Ensaio de secreção**  
 1D-immunoblotting de antígenos secretados/excretados de taquizoítas de *T. gondii* (ESA) obtidos nos tempos de 0, 15, 30 e 45 minutos, separados em SDS-PAGE não redutor e sondados com os mAbs 1B8 (anti-p97), A3A4 (anti-p30/60) e A4D12 (anti-p22). Diferentes quantidades de padrões de taquizoítas lisados por SDS (STDs), representando não diluído (100%), diluído 1:10 (10%) e 1:50 (2%) são mostrados no canto direito da figura. As setas à direita indicam os polipeptídeos de 97, 30 e 22 kDa. À esquerda, o mAb utilizado em cada immunoblotting.

1B8  
(p97)



A3A4  
(p30)



A4D12  
(p22)

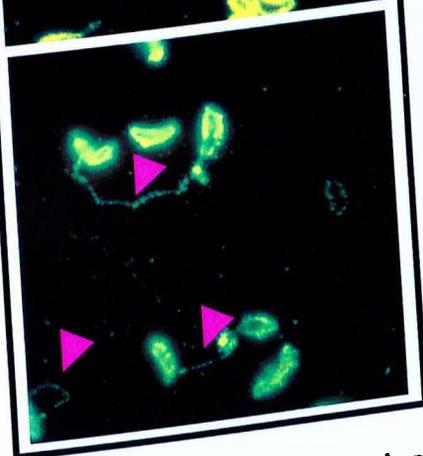


Figura 15: Ensaio de detecção de trilhas liberadas por taquizoítas de *T. gondii* durante o processo de motilidade sobre o substrato. Taquizoítas da cepa RH de *T. gondii* foram fixados em solução de formaldeído, lavados e incubados com os mAbs 1B8, A3A4 e A4D12. A seguir para a detecção da reação, os taquizoítas foram incubados com IgG de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à FITC. As amostras foram analisadas em microscópio de epifluorescência no aumento de 400 x (Olympus BH2, Tokyo, Japan). As fotos foram realizadas em filme fotográfico asa 400 por exposição de 2 minutos. O mAb utilizado em cada preparação está indicado no canto esquerdo de cada imagem. As setas em lilás indicam as trilhas liberadas por taquizoítas de *T. gondii* reveladas com os mAbs A4D12 (p22) e A3A4 (p30).

#### **4.8. Purificação de mAbs para emprego em técnica de seleção de peptídeos a partir de bibliotecas de expressão em fagos ("phage display")**

As Figuras 16 e 17 demonstram a purificação dos mAbs A4D12 e A3A4 de interesse. Como demonstrado pelo cromatogramas, podemos notar dois picos registrados a 280 nm, sendo o primeiro correspondendo à aplicação da amostra, no nosso caso sobrenadante de cultura de cada hibridoma e um segundo pico correspondendo a fração purificada com os mAbs de interesse eluídos em pH 2,7 (Figuras 16A e 17A). Como demonstrado nas Figuras 16B e Figura 17B, raias 4, a análise eletroforética em gel de poliacrilamida 8% revelou uma única banda de 150 kDa consistente com peso estimado para IgG.

#### **4.9. mAb A4D12 reconhece um peptídeo similar a molécula de superfície**

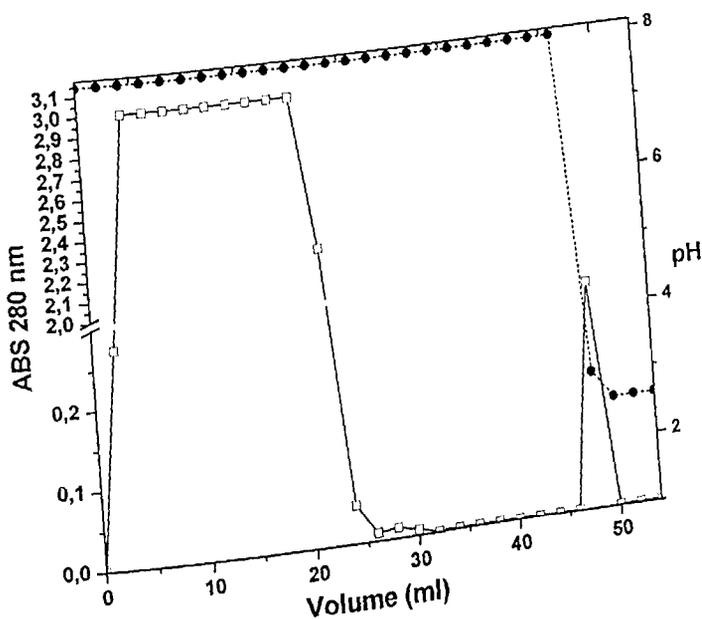
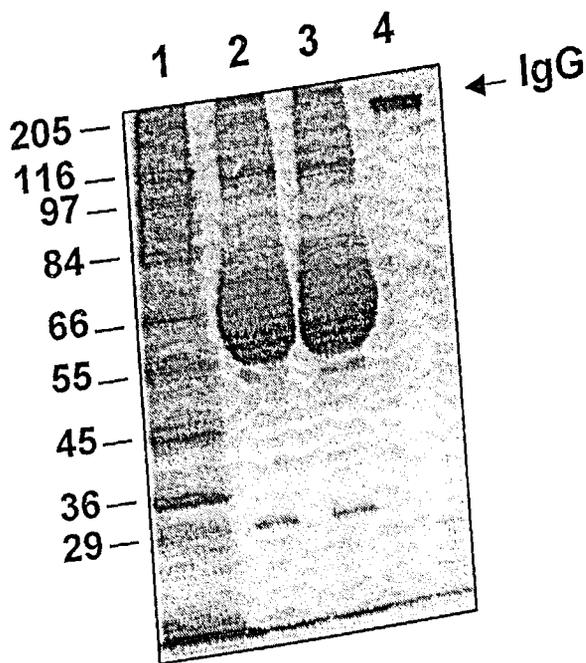
##### **SAG2A**

Com a finalidade de refinamento da caracterização imunoquímica dos mAbs A4D12 e A3A4 foi realizado o mapeamento epitópico destes anticorpos utilizando a técnica de seleção de peptídeos a partir de biblioteca de expressão de fagos ("phage display").

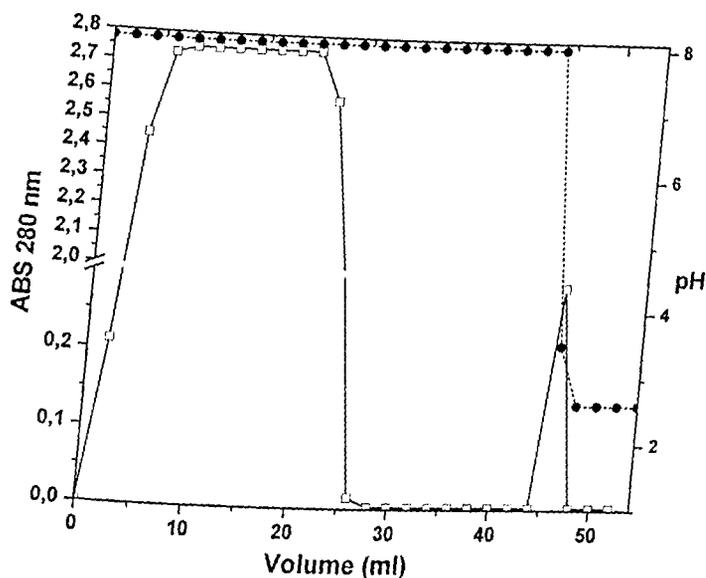
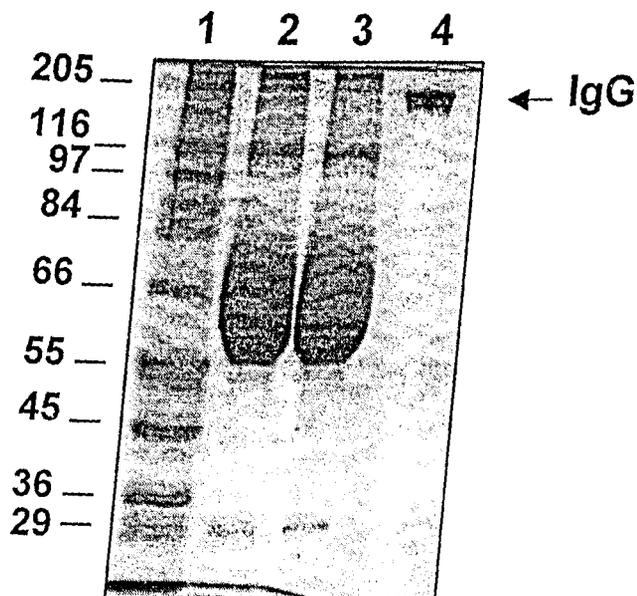
Do grande número de partículas de fagos isoladas do 3º ciclo de seleção e amplificação, oito fagos foram arbitrariamente escolhidos e testados em ELISA para avaliação da reatividade ao mAb A4D12 (Figura 18). Sete dos oito fagos individualmente isolados (A2-H2) foram fortemente reativos ao mAb A4D12, apresentando índices de reatividades (EI) variando entre 6.6 e 32.3. Para nossa surpresa, os sete (A2, B2, D2, E2, F2, G2 e H2) clones reativos ao mAb

A4D12 mostraram valores de EI superiores ao obtido como próprio TSA (EI=9,5). O fago H2 apresentou o maior índice de reatividade (EI=32,3) seguido pelos fagos F2 e E2, ambos apresentando EI= 27,9. Como controle, os fagos isolados e TSA foram avaliados em paralelo com IgG irrelevante de camundongo. Como demonstrado na Figura 18, nem o TSA ou fagos foram reativos à IgG irrelevante e não apresentaram valores de EI superiores ao do limite de positividade estabelecido (cut off = 3 x EI do fago helper). Estes dados sugerem fortemente que os fagos reativos ao mAb A4D12 são produtos de interações específicas entre mAb e fagos durante o curso da seleção dos peptídeos.

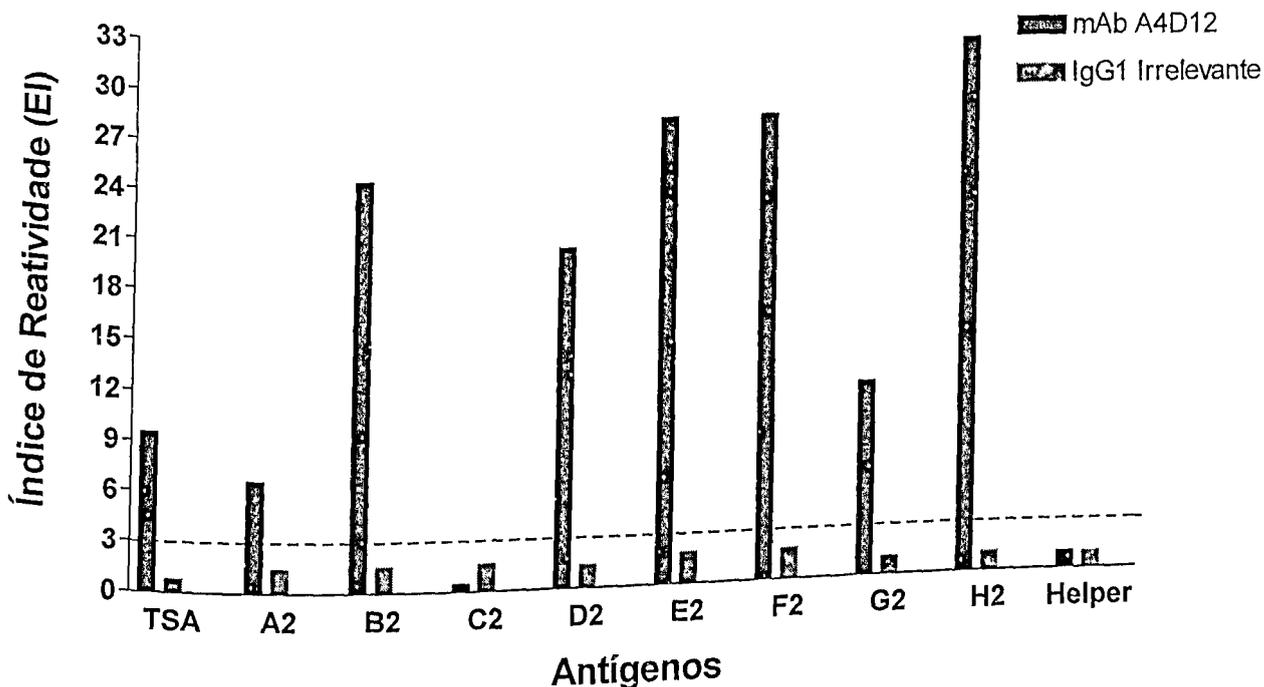
A dedução de aminoácidos a partir da seqüência de DNA dos fagos H2, F2 e E2 revelou uma seqüência consenso DGGSA reconhecida pelo mAb A4D12. Esta seqüência quando analisada em bancos de dados utilizando BLASTP e limitando ao organismo *T. gondii* resultou em considerável alinhamento (80% de identidade) com um antígeno de superfície de 22 kDa de *T. gondii* (SAG2A), como demonstrado na Figura 19A. A seqüência correspondendo ao epitopo reconhecido pelo mAb A4D12 está posicionado no domínio C-terminal da molécula de SAG2A compreendendo os aminoácidos 137 a 141. Interessantemente, nenhum alinhamento significativo foi detectado do motivo DGGSA com outros membros pertencentes à família SAG2.

**A****B**

**Figura 16: Purificação do mAb A4D12 em resina de proteína G-sepharose.**  
 No painel A, cromatograma da purificação do mAb A4D12 em coluna de afinidade de proteína G-sepharose. O primeiro pico corresponde a fração aplicada, no nosso caso o sobrenadante de cultura do hibridoma A4D12 e o segundo pico à fração purificada de IgG1 (mAb A4D12) obtida por eluição em pH 2,6. Em B, SDS-PAGE 8% das frações representativas da purificação. Na raia 2, a fração aplicada (sobrenadante de cultura do hibridoma A4D12), raia 3 fração excluída da resina de proteína G-Sepharose ("void") e raia 4, banda de IgG purificada (mAb A4D12).

**A****B**

**Figura 17: Purificação do mAb A3A4 em resina de proteína G-sepharose.**  
No painel A, cromatograma da purificação do mAb A3A4 em coluna de afinidade de proteína G-sepharose. O primeiro pico corresponde a fração aplicada, no nosso caso o sobrenadante de cultura do hibridoma A3A4 e o segundo pico à fração purificada de IgG1 (mAb A3A4) obtida por eluição em pH 2,6. Em B, SDS-PAGE 8% das frações representativas da purificação. Na raia 2, a fração aplicada (sobrenadante de cultura do hibridoma A3A4), raia 3 fração excluída da resina de proteína G-Sepharose ("void") e raia 4, banda de IgG purificada (mAb A3A4).



**Figura 18: ELISA para a seleção de fagos reativos ao mAb A4D12.**  
 Oito fagos selecionados arbitrariamente (A2-H2) foram testados por ELISA para avaliação à reatividade ao mAb A4D12. Antígeno solúvel de *T. gondii* (TSA) foi utilizado como controle positivo da reação. Fago M13 tipo selvagem (*helper*) foi utilizado como controle negativo de antígenos. Como controle de especificidade os mesmos antígenos ensaiados com o mAb A4D12 foram avaliados em paralelo com IgG irrelevante de camundongo.

**A**

Fagos	Seqüências
H2	FTQLNPTDGGSA----
E2	--GVDQHDNGSRAR--
F2	---WPLHDGG-AVNRR
Consenso	-----DGGSA-----
SAG2A	APAGRNN <b>DGSSA</b> PTPK

**B**

MSEFKTTSLASLALTGLFVVFKFALASTTETPAPIE	36
CTAGATKTVDAPSSGSVVFQCGDKLTISPSGEGDVF	72
YGKECTDSRKLTTVLPGAVLTAKVQQPAKGPATYTL	108
SYDGTPEKPVLCYKCVAEAGAPAGRNN <b>DGSSA</b> PTP	144
KDCKLIVRVPGADGRVTSGFDPVSLTGKVLAPGLAG	180
LLITFV	186

**Figura 19: Alinhamento das seqüências deduzidas em aminoácidos dos fagos H2, E2 e F2 e identificação do epitopo linear de SAG2A.**

Em A, seqüências dos peptídeos obtidos dos fagos, H2, E2 e F2 estão alinhados preservando a posição relativa do motivo DGGSA. A marcação em cor cinza indica aminoácidos idênticos compartilhados entre as seqüências expressas em fagos e SAG2A. O tracejado representa intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento. No painel B, epitopo linear reconhecido pelo mAb A4D12 na seqüência de SAG2A (número de acesso: AAO72427) é indicado em negrito.

#### **4.10. mAb A3A4 reconhece epitopo conformacional compartilhado entre membros da superfamília de SRS (SAG-1 related sequences).**

Para o mapeamento epitópico do mAb A3A4, dez fagos isolados no 3º ciclo de seleção e amplificação foram arbitrariamente escolhidos e analisados quanto a reatividade ao mAb A3A4 por técnica de ELISA indireto. Como demonstrado na Figura 20, dos dez fagos analisados (B12-A36), três foram reativos ao mAb A3A4 de interesse (B12, A12 e A36). Sendo que o fago B12 apresentou EI igual a 10,49 seguido pelos clones A36 e A12, com EI respectivos de 7,42 e 4,79. Semelhante ao descrito na reação ELISA anterior, como controle fagos selecionados e TSA foram avaliados em paralelo com IgG irrelevante de camundongo. Como demonstrado na Figura 20, nem o TSA ou fagos foram reativos ao IgG irrelevante e não apresentaram valores de EI superiores ao cut off estabelecido. Estes dados sugerem que os três fagos (B12, A36 e A12) reativos ao mAb A3A4 são produtos de interações específicas entre mAb A3A4 e fagos durante o curso da seleção dos peptídeos.

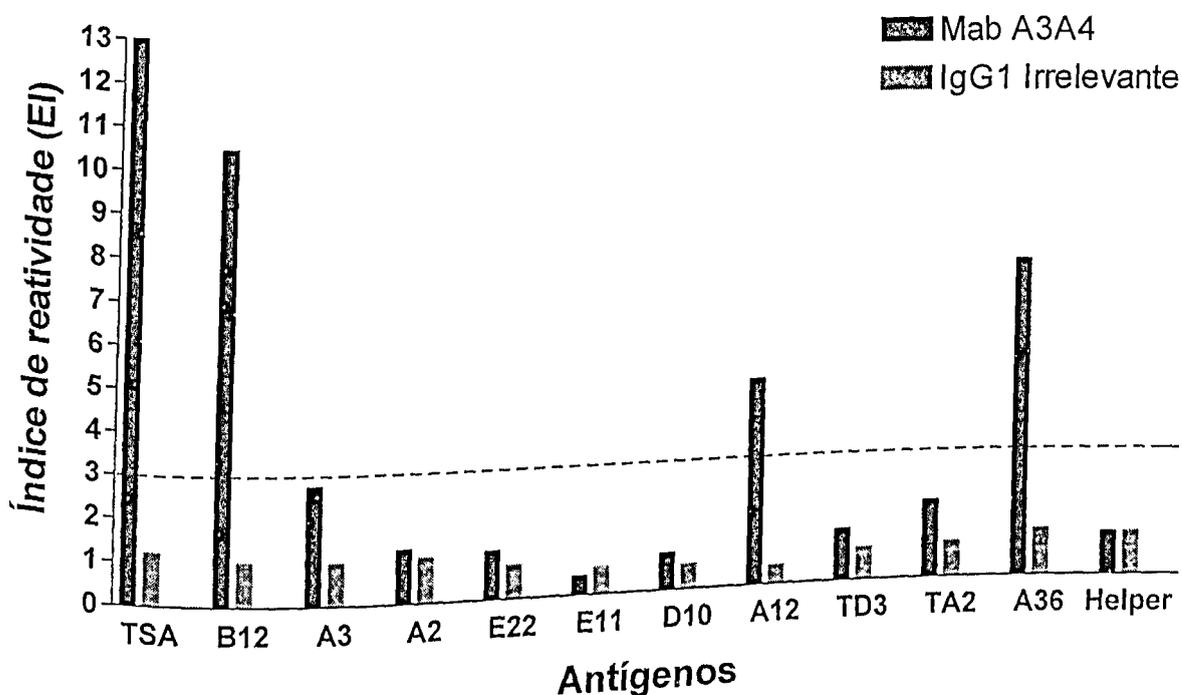
A dedução de aminoácidos a partir da seqüência de DNA dos fagos B12, A36 e A12 não revelou uma nítida seqüência consenso, no entanto, um padrão comum de aminoácidos foi observado nos peptídeos obtidos (Figura 21A). O alinhamento das seqüências dos peptídeos revelou aminoácidos comuns em pelo menos duas das três seqüências analisadas; iniciando com histidina e leucina nas posições 2 e 3, seguida de uma prolina na posição 7, glicina ou serina nas posições 8 e 9 e finalmente dois aminoácidos hidrofóbicos C-terminais. Já que as seqüências obtidas dos clones B12, A36 e A12 foram

reativas ao mAb de interesse, contudo, não produziram uma seqüência consenso claramente definida, resolvemos analisar especificidade de cada um destes três fagos por inibição com antígeno solúvel de *T. gondii* (TSA). Como demonstrado na Figura 21B, concentrações de TSA superiores a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de TSA produzem inibição gradativa da interação do mAb A3A4 com os fagos B12, A36 e A12. Esta inibição atinge o ponto máximo na concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  de TSA, apresentando porcentagem de inibição de 70% para o fago B12, 45 e 41% para os fagos A12 e A36, respectivamente. Estes dados sugerem que o fago B12, ao invés dos fagos A36 e A12, deve expressar uma seqüência muito similar em TSA.

Portanto com base nos dados previamente descritos na Figura 21B, utilizamos a seqüência do fago B12 para análise em bancos de dados delimitando o organismo ao parasito *T. gondii*. A análise computacional revelou um alinhamento parcial considerável com duas regiões distintas, separadas por 11 a 12 aminoácidos, de membros da superfamília de SRS, SRS6 (SAG-1 related sequence 6), BSR4, SAG5A, SAG5D, SAG5C e SAG1, Figura 22A. Estas regiões compreendem as seqüências PSWW e VI, a primeira posicionada entre os aminoácidos 268/288 a 272/292 e a segunda, entre os aminoácidos 283/313 a 285/315 das seqüências obtidas dos membros da superfamília de SRS.

Considerando que a estrutura tridimensional da molécula SAG1, um protótipo da superfamília de SRS, já está disponível, foi realizada a visualização tridimensional das duas regiões presentes em SAG1 similares a reconhecida pelo mAb A3A4 utilizando o programa C3nD. Como observado na Figura 22B, ambas as regiões destacadas, que são separadas por 11-12

aminoácidos na estrutura primária de SAG1, apresentam-se próximas quando arranjadas tridimensionalmente na molécula de SAG1. Estes dados sugerem que regiões descontínuas na estrutura primária, identificadas em membros da superfamília de SRS, podem similarmente ao observado com SAG1 adotarem um arranjo tridimensional próximo constituindo um epítipo conformacional reconhecido pelo mAb A3A4.



**Figura 20: ELISA para a seleção de fagos reativos ao mAb A3A4.** Oito fagos selecionados arbitrariamente (B12-A36) foram testados por ELISA para avaliação à reatividade ao mAb A3A4. Antígeno solúvel de *T. gondii* (TSA) foi utilizado como controle positivo da reação. Fago M13 tipo selvagem (*helper*) foi utilizado como controle negativo de antígenos. Como controle de especificidade os mesmos antígenos ensaiados com o mAb A3A4 foram avaliados em paralelo com IgG irrelevante de camundongo.

**A**

B12: EHLAEEPGWWVI  
 A12: WHTNMPPGSRLT  
 A36: KPLCSSTSGYCI  
 Consenso: -HL---P##-\*\*

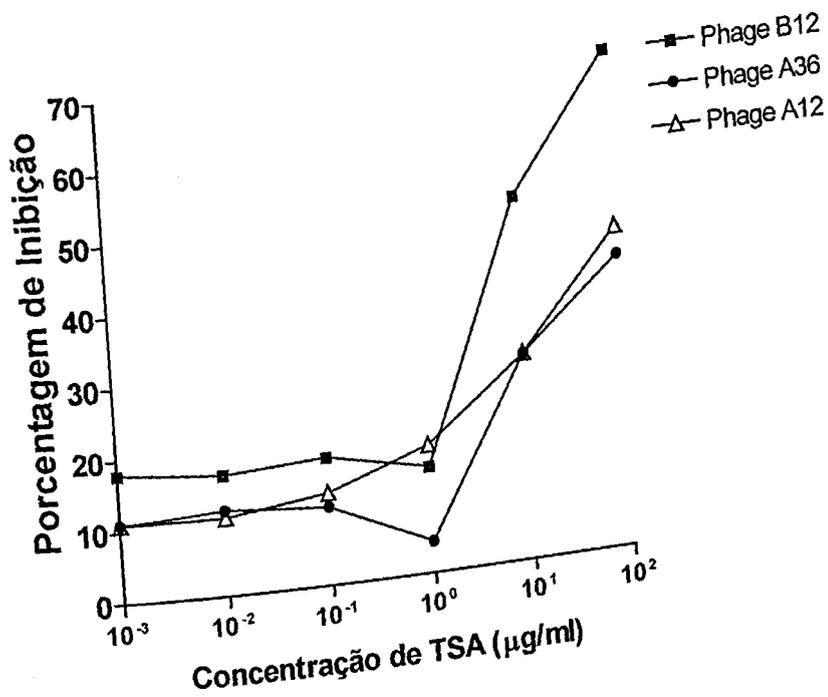
**B**

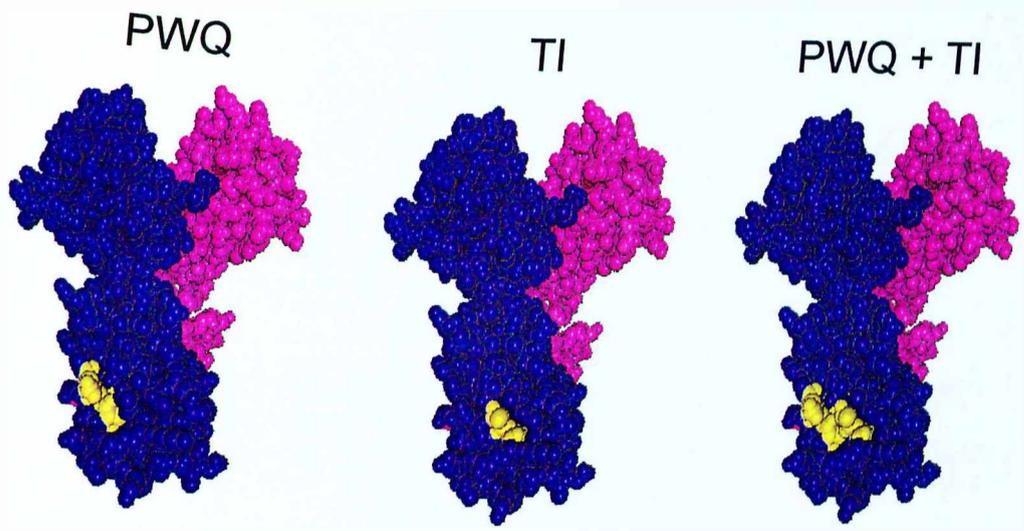
Figura 21: Alinhamento das seqüências deduzidas em aminoácidos dos fagos B12, A36 e A12 e ELISA inibição dos mesmos fagos com antígeno solúvel de *T. gondii* (TSA).

Em A, alinhamento das seqüências dos peptídeos obtidos dos fagos B12, A36 e A12. A marcação em cor cinza indica aminoácidos idênticos compartilhados entre as seqüências expressas em pelo menos dois fagos analisados. O tracejado representa intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento da seqüência consenso. Os asteriscos indicam aminoácidos hidrofóbicos em pelo menos duas seqüências. # representa glicina ou serina. No painel B, ELISA de inibição realizado com os fagos B12, A36 e A12 e concentrações crescentes de TSA.

**A**

<b>B12</b>	EHLAAEEPPGWW-----VI--
<b>SRS6</b>	-----PSWWVSDSQNGSAK-LTIPE
<b>BRS4</b>	-----KSWWVTETQKRNSATLTIPQ
<b>SAG5D</b>	-----SSWWAEDEKKNAPKLVIPK
<b>SAG5A</b>	-----SSWWTEDDKNGKAPKLVIPK
<b>SAG5C</b>	-----KSWWTQDDKNGKAPKLVIPK
<b>SAG1</b>	-----P-WQGNASSDNGAT-LTI <sup>TI</sup> NK
<b>Consenso</b>	-----PSWW-----VI--

**B**



**Figura 22: Alinhamento das seqüências de membros de superfamília SRS com o peptídeo expresso no fago B12 e visualização tridimensional do epítipo descontínuo (PWQ-TI) em SAG1.**

No painel A, alinhamento das seqüências do peptídeo obtido do fagos B12 e membros de SRS (SRS6, BSR4, SAG5D, SAG5A, SAG5C e SAG1). A marcação em cinza indica aminoácidos idênticos compartilhados entre as seqüências analisadas. O tracejado representa intervalos introduzidos para otimizar o alinhamento. Em B, estrutura tridimensional da molécula de SAG1. Cada cadeia da estrutura dimérica de SAG1 está representada em azul e lilás. Os resíduos PWQ, TI e PWQ+TI estão realçados em amarelo nas estruturas de SAG1, dispostas respectivamente da esquerda para a direita.

**4.11. mAb A4D12 e A3A4 reconhecem epítomos expressos em diferentes genótipos de *T. gondii* (cepas) mas não em outros parasitos do filo Apicomplexa.**

A habilidade dos mAbs A4D12 e A3A4 em reconhecer p22 e p30 em diferentes cepas de *T. gondii* e outros parasitos do filo Apicomplexa foi avaliada por *immunoblotting*, Figura 23. Como observado os mAbs A4D12 e A3A4 reconheceram em ambas as cepas de *T. gondii* (RH- tipo I e ME49 tipo II) os componentes de 22 e 30 kDa, respectivamente. Contudo, os mAbs A4D12 e A3A4 falharam em reconhecer os antígenos p22 e p30 em extratos de parasitos do filo Apicomplexa, incluindo o proximamente relacionado *N. caninum*.

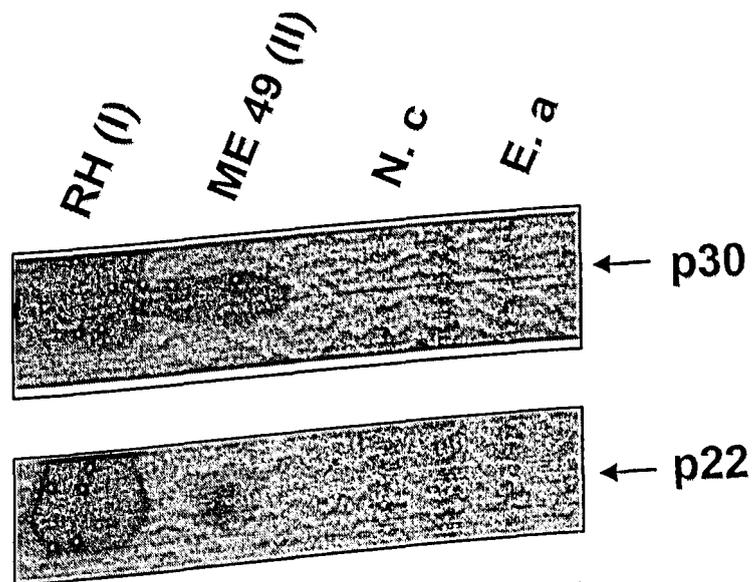


Figura 23: Expressão de p22 e p30 em cepas de *T. gondii* e outros parasitos do filo Apicomplexa. 1D-immunoblotting de antígenos de *T. gondii* das cepas RH (genótipo I) e ME49 (genótipo II) e outros parasitos do filo Apicomplexa, *Neospora caninum* (N.c) e *Eimeria acervulina* (E.a) sondados com os mAbs A3A4 (p30) e A4D12 (p22).

#### **4.12. Bloqueio de epítomos utilizando os mAb A4D12 e A3A4 não protege animais C57BL6 de infecção com parasitos da cepa RH.**

Com o intuito de obtermos informações funcionais dos epítomos mapeados pelos mAb A4D12 e A3A4 um ensaio de bloqueio de epítopo por anticorpos foi desenhado. Como esperado, os animais inoculados com taquizoítas de *T. gondii* pré-tratados com IgG irrelevante morreram após sete dias de infecção, enquanto o grupo tratado com mAb A4D12 teve 50% de mortalidade no sétimo dia, seguido por 75% de mortalidade no oitavo dia e finalmente 100% ao nono dia. A mortalidade obtida com o grupo tratado com mAb A3A4 foi semelhante ao alcançado pelo grupo controle, atingindo os 80% no sétimo dia. Os animais deste grupo tiveram 100% de mortalidade no décimo dia. Embora uma pequena diferença tenha sido observada entre os grupos IgG irrelevante, mAb A4D12 e mAb A3A4, os mesmos não apresentaram diferença estatística significativa na mortalidade.

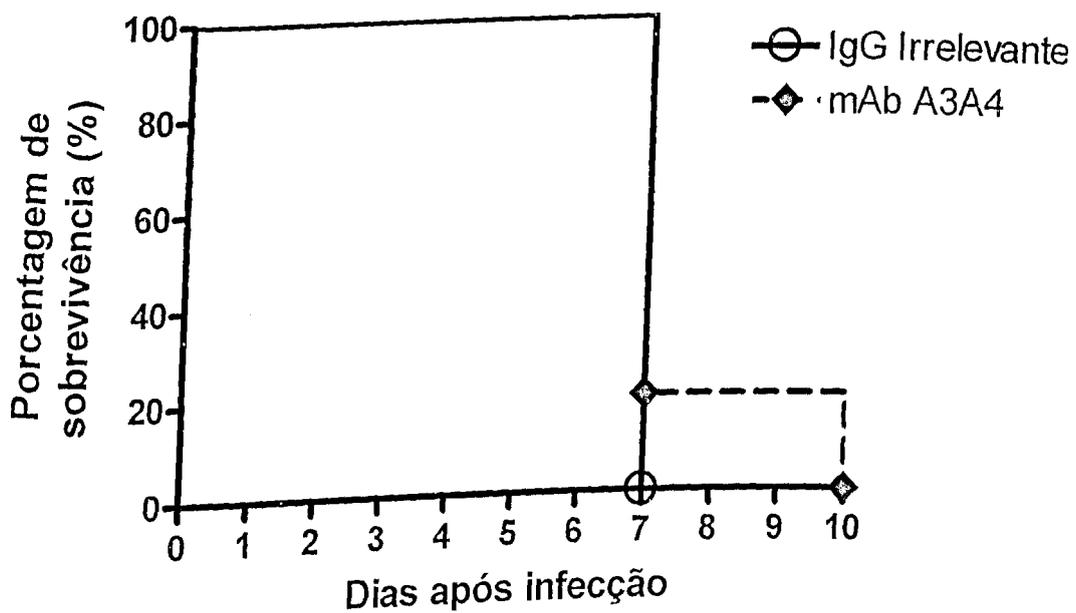
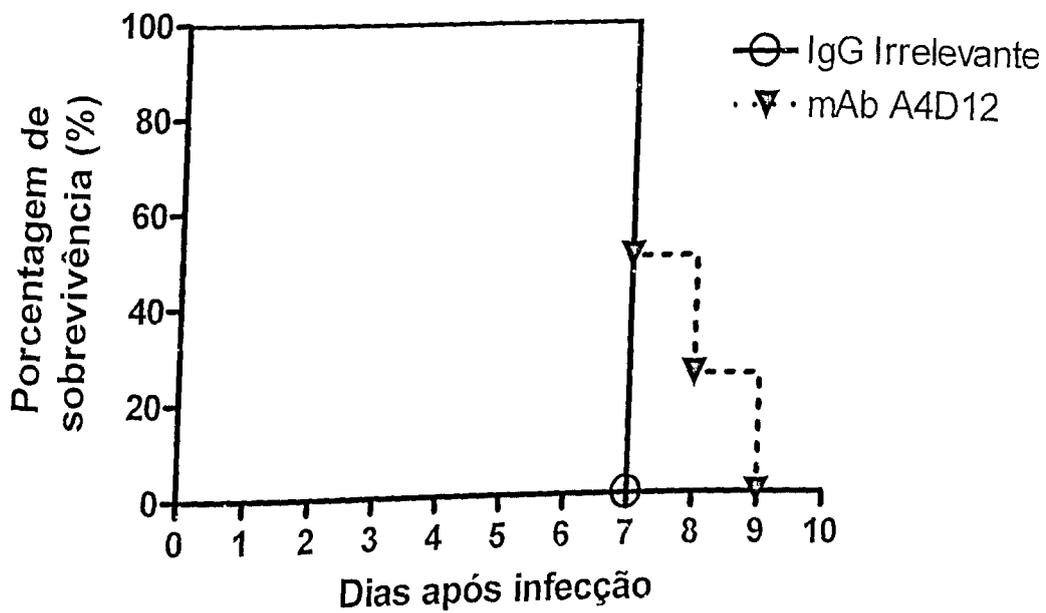


Figura 24: Curvas de sobrevivência de camundongos C57BL6 infectados com  $10^3$  taquizoítas de *T. gondii* (cepa RH) previamente tratados mAbs A4D12, A3A4 e IgG irrelevante.

## 5. DISCUSSÃO

As moléculas da superfamília SRS constituem um grupo redundante de 23 proteínas de superfície de *T. gondii* que são expressas em diferentes estágios do desenvolvimento deste parasito e que parecem exercer um papel crucial durante os eventos iniciais da infecção à célula hospedeira, provavelmente, participando como adesinas entre o parasito e a célula hospedeira (LEKUTIS et al., 2000 e 2001; TINTI et al., 2003). Além do papel na adesão parasitária, membros altamente imunogênicos de SRS, como SAG1 e SAG2, expressos em taquizoítas, aparentemente atraem a resposta imune hospedeira para esta fase de desenvolvimento, contribuindo assim para a modulação da virulência da infecção (BOOTHROYD et al., 1998).

Desta forma, membros de superfamília SRS podem tanto estar envolvidos nos mecanismos de invasão parasitária como de subversão da resposta imune hospedeira, indicando que moléculas SRS fornecem um arcabouço estrutural e funcional essencial à sobrevivência do parasito *T. gondii* (BOOTHROYD et al. 1998, JUNG et al., 2004).

Portanto, a caracterização de epitopos da superfamília de SRS pode contribuir com importantes informações referentes aos aspectos biológicos da infecção à célula hospedeira e ainda desvendar epitopos críticos envolvidos na evasão parasitária da resposta imune.

No presente trabalho, foram caracterizados por métodos imunoquímicos um epitopo linear de SAG2A e outro conformacional compartilhado entre SRS6, BSR4, SAG5A, SAG5C e SAG5D, utilizando dois mAbs dirigidos a p22 e p30 da superfamília de SRS. Os mAbs A4D12 e A3A4 analisados neste trabalho

reconheceram proteínas de 22 e 30 kDa, respectivamente. Estas proteínas estão enriquecidas na fração ESA e são depositadas nas trilhas de deslizamento deixadas pelos parasitos ao longo do substrato. Estes resultados comprovam as evidências que indicam que as proteínas de superfície do parasito p22 e p30 são liberadas sobre o substrato durante a motilidade de *T. gondii* em concordância com os achados previamente descritos que demonstram outras funções biológicas das moléculas imunodominantes de superfície em taquizoítas de *T. gondii*, com 22kDa (SAG2) e 30 kDa (SAG1) (MINEO et al., 1993 e 1994, PARMLEY et al., 1994, GRIMWOOD et al., 1996; HAKANSSON, et al. 1999; LEKUTIS, 2000). Interessantemente, o mAb A3A4 utilizado neste trabalho também reconhece um componente de 60 kDa, além de p30. Este achado nos levou a acreditar que este mAb poderia reconhecer um epitopo comum compartilhado entre p30 e p60.

Ensaio conduzido com mAb anti-p30, purificado em membranas de nitrocelulose, fortaleceu esta hipótese, no entanto, como existia a possibilidade de mais de uma proteína estar co-migrando com a p30 e portanto, que o anti-p30 purificado poderia apresentar diferentes especificidades, resolvemos realizar nova clonagem com os mAbs de interesse.

O perfil de reatividade obtido, tanto por *immunoblotting* quanto por imunofluorescência, dos clones oriundos dos hibridomas A3A4 e E9 foi muito similar ao obtido com os clones parentais, indicando que os clones obtidos apresentavam a mesma especificidade de seus parentais. Estes resultados indicam definitivamente que os clones obtidos no processo de nova clonagem

são oriundos de um mesmo clone celular e que p30 e p60 compartilham um epitopo comum reconhecido pelos mAbs A3A4 e E9.

Com o objetivo de verificarmos o tipo do epitopo reconhecido pelos mAbs A3A4, E9 e A4D12 produzidos em nosso laboratório, decidimos realizar um ensaio de *immunoblotting* conformacional. Nestes resultados verificamos que os mAbs A3A4 e E9 reconhecem epitopos conformacionais já que o tratamento com agente redutor aboliu completamente a reatividade aos componentes de 30 e 60 kDa. Este fenômeno pode ser explicado pela destruição, através do tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, dos epitopos conformacionais mantidos por pontes dissulfeto na estrutura secundária de antígenos de *T. gondii*.

Semelhantemente aos resultados observados com os mAbs A3A4 e E9 no presente trabalho, foi demonstrado na literatura que a extensiva redução com  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) de antígenos de *T. gondii* ou SAG1 recombinante com  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ ME) de antígenos de *T. gondii* ou SAG1 recombinante abolia completamente a reatividade do mAb DG52 a SAG1 monomérica (p30) e dimérica (p60) (HE et al., 2002). Desta forma, a similaridade observada entre nossos resultados e os dados apresentados por estes autores nos levaram a acreditar que p60, reconhecida pelos mAbs A3A4 e E9, seja uma forma dimérica de membros de SRS de 30 kDa, possivelmente correspondendo à molécula principal de superfície imunodominante de *T. gondii*, a SAG1. Contrastando com os resultados obtidos com os mAbs A3A4 e E9, o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol não afetou a reatividade do mAb A4D12 ao componente de 22 kDa, indicando que este mAb reconhece um epitopo linear presente em p22. Dados similares foram obtidos com os mAbs 3G11 (COUVREUR et al., 1988) e D10, 5A6 e 5B8 (PARMLEY et al., 1994) utilizando antígenos totais de *T. gondii* ou recombinates de p22.

Como o conjunto dos dados obtidos sugerem fortemente que os mAbs de interesse reconhecem moléculas da superfamília de SRS, possivelmente SAG1 de 30 kDa e SAG2A de 22 kDa, decidimos mapear os epitopos reconhecidos por este mAb por tecnologia de *phage display*.

Como esperado, a análise dos peptídeos expressos em fusão com proteínas pIII de fagos M13 e reativos ao mAb A4D12 revelou uma região consenso similar a seqüência de SAG2A inicialmente descrita por Prince (PRINCE, *et al.* 1990), enquanto a análise do peptídeo mais reativo e específico ao mAb A3A4 gerou um alinhamento parcial correspondendo a uma seqüência descontínua compartilhada entre membros de SRS (LEKUTIS *et al.*, 2001, HE *et al.* 2002, TINTI *et al.*, 2003). Curiosamente a análise computacional das seqüências descontínuas PSWW e VI reativas ao mAb A3A4 revelou seqüências correspondentes em SAG1 que podem adotar um arranjo tridimensional próximo (HE *et al.*, 2002). Desta forma, em semelhança a outras moléculas descritas na literatura (VANHOORELBEKE *et al.*, 2003), estes dados sugerem que as seqüências descontínuas encontradas na estrutura primária de membros de SRS possam constituir um epitopo conformacional reconhecido pelo mAb A3A4.

Interessantemente, ambas as regiões reconhecidas pelos mAbs A4D12 e A3A4 estão na região C-terminal das moléculas de SRS, correspondendo mais precisamente ao domínio D2 ou D2-like, no caso de SAG2A, do protótipo de SAG-1 (HE *et al.*, 2002). Este domínio é mais conservado que o domínio D1 entre os membros de SAG5 (SPANNO *et al.*, 2002; TINTI *et al.*, 2003 e JUNG *et al.*, 2004). Esta variação na similaridade entre os domínios D1 e D2 poderia ser um produto evolutivo resultante da força direcionadora da expansão dos

membros de SRS. Assim, as pressões evolutivas que criaram a superfamília de SRS tanto trabalharam no sentido de favorecer o crescimento da diversidade do domínio D1, aumentando as possibilidades de geração de novos ligantes de especificidades variadas, como também mantiveram um domínio mais conservado (D2) permitindo a construção de uma unidade dimérica estrutural e de sustentação do domínio de ligação à célula hospedeira, o D1 (TINTI et al., 2003).

Até o presente momento pouco é conhecido sobre epitopos de proteínas relacionadas à SAG e até onde conhecemos este é o primeiro trabalho utilizando tecnologia de *phage display* para descrever epitopos presentes no domínio D2, incluindo um epitopo conformacional compartilhado entre membros distintos da superfamília SRS de *T. gondii*. Assim, considerando que, os monoclonais produzidos neste trabalho estão direcionados ao domínio D2 ou D2-like de membros altamente imunogênicos de SRS (p22 e p30) e que ensaios de bloqueio destes epitopos não mostraram nenhuma proteção significativa em camundongos C57BL6 à infecção por *T. gondii*, acreditamos que novas questões devam ser levantadas quanto ao papel destes epitopos na infecção por *T. gondii*. Assim, se os epitopos apresentados neste trabalho são aquisições evolutivas utilizadas para a dissuasão da resposta imune hospedeira, permanece ainda por ser determinado.

Além do mapeamento epitópico, identificamos pelo menos duas formas de SAG2A reconhecidas pelos mAb A4D12 e 5 variantes de membros de SRS reativos ao mAb A3A4. A natureza destes variantes não foi examinada por nós, contudo, modificações pós-transducionais como fosforilação e ou inserção de diferentes glicanas podem ser factíveis, já que têm sido documentadas para

p30 (TOMAVO et al., 1992 e ZINECKER et al., 2001) e p22 (TOMAVO et al., 1992).

Recentemente, Jung et al. (JUNG et al., 2004) demonstraram a presença de quatro variantes eletroforéticas para p22 e três para p30 utilizando um anticorpo policlonal reativo a um determinante antigênico comum de SRS em 2D. Assim, estes autores apresentaram um novo questionamento argüindo se estas variantes eletroforéticas seriam isoformas de SAG2A e SAG1 ou seriam produtos de genes SRS ainda não caracterizados. Portanto, acreditamos que com os resultados apresentados no presente estudo respondemos parcialmente esta pergunta, já que, que pelo menos duas isoformas de SAG2A compartilham um motivo comum (DGGSA) reconhecida pelo mAb A4D12. Este dado é reforçado pela ausência do motivo DGGSA nos três genes adicionais relacionados à SAG2 (SAG2B, SAG2C, SAG2D) descritos por Lekutis (LEKUTIS et al., 2000). Contudo, se as duas isoformas de SAG2A apresentam ou não importância biológica similar, permanece ainda por ser examinado no futuro.

Diferentemente dos variantes identificados por Jung (JUNG et al., 2004) para p30, no presente trabalho identificamos cinco formas variantes de p30 (SAG1) em taquizoítas de *T. gondii* com o mAb A3A4. Estes variantes reforçam os resultados obtidos por *phage display* indicando que múltiplos membros de SRS podem compartilhar um epitopo conformacional comum. Evidentemente, a identificação precisa de cada membro e seus variantes só poderá ser determinada quando técnicas de seqüenciamento e/ou espectrometria de massa forem empregadas. No entanto, considerando que os cinco variantes são produtos de expressão da fase taquizoíta de *T. gondii*, nos parece claro

que BSR4 e SAG5A, que também compartilham o motivo conformacional reconhecido pelo mAb A3A4 não representem nenhuma destas formas identificadas. Isto pode ser explicado pela expressão exclusiva de BSR4 e SAG5A em bradizoítas do parasito *T. gondii* como previamente documentado pelos trabalhos de Boothroyd e Lekutis (BOOTHROYD et al. 1998; LEKUTIS, et al., 2001).

Interessantemente, o epitopo de SAG2A mapeado no presente estudo corresponde a uma seqüência polimórfica expressa em diferentes genótipos de *T. gondii* como previamente descrito (PARMLEY, et al., 1994). Segundo este autor, cepas do genótipo II apresentam um resíduo adicional de glicina (posição 139) na molécula de SAG2A quando comparado às expressas pelos genótipos I e III. Esta diferença sutil na composição de aminoácidos foi explorada em trabalhos prévios através da utilização de anticorpos sensíveis à configuração (PARMLEY et al., 1994; KONG et al., 2003). Diferentemente dos anticorpos monoclonais 5B10, 5A6, 6D10 e 2G11 previamente descritos para p22, (PARMLEY et al., 1994; KONG et al., 2003), o mAb A4D12 avaliado no presente trabalho reconhece ambas as seqüências polimórficas expressas em cepas de *T. gondii* do tipo I (RH) e II (ME49). Este resultado indica que o mAb A4D12 não é direcionado a um epitopo cepa específico. A diferença de reatividade observada entre o mAb A4D12 e demais mAbs descritos na literatura pode ser explicada como resultado das diferenças observadas durante o curso da produção dos monoclonais, e em especial, aquelas incluindo a maturação da afinidade de imunoglobulinas ao longo do esquema de imunização. Semelhante aos dados obtidos pelo mAb A4D12, o mAb A3A4 reconheceu indistintamente um componente de 30 kDa em ambos os genótipos

de *T. gondii* analisados. Entretanto a natureza conformacional do epitopo e os múltiplos membros de SRS identificados por *phage display* dificultaram uma análise mais detalhada desta região.

Adicionalmente, nenhuma reatividade para p22 e p30 foi identificada em lisados de *N. caninum* e *E. acervulina*, quando ensaiados com os mAbs A4D12 e A3A4. Estes achados indicam que os mAbs utilizados neste trabalho são espécie específicos e que parasitos do filo Apicomplexa que divergiram a pouco mais de 12 milhões de anos atrás como o *N. caninum* (SU, et al. 2003 e SIBLEY et al., 2003) já não compartilham mais os epitopos identificados neste trabalho.

No presente trabalho, identificamos e caracterizamos dois epitopos presentes de membros de SRS, incluindo avaliação do bloqueio destes epitopos na infectividade de parasitos da cepa RH de *T. gondii*. Apesar de nossos dados indicarem que o bloqueio destes epitopos não afeta a infectividade de taquizoítas de *T. gondii* em camundongos C57BL6 não podemos concluir que uma resposta imune direcionada a estes epitopos não possa intervir com os eventos de invasão parasitária. Assim, considerando que a proteção duradoura contra a infecção de *T. gondii* é fornecida por células T CD8+ específicas e pela produção persistente de IFN- $\gamma$  (GAZZINELLI et al. 1991), nós encorajamos esforços futuros para investigação dos epitopos mapeados neste trabalho como imunógenos, bem como, para a determinação do perfil de citocinas produzidas sob estes estímulos.

## 6. CONCLUSÕES

- 1- Os anticorpos monoclonais A3A4 e A4D12 analisados no presente trabalho reconhecem respectivamente as proteínas de 30/60 (p30/60) e 22 kDa (p22) de formas taquizoítas de *T. gondii*.
- 2- Os componentes p30 e p22 reconhecidos pelos mAbs A3A4 e A4D12 são expressos na superfície de taquizoítas de *T. gondii* e são secretados pelo parasito durante os eventos responsáveis pela motilidade do parasito.
- 3- Anticorpos purificados por imunoafinidade ao antígeno p30 reconhecem tanto a forma monomérica (p30) quanto a forma dimérica (p60) de membros de SRS presentes na superfície de formas taquizoítas de *T. gondii*.
- 4- Os clones isolados a partir dos hibridomas A3A4 e E9 apresentam as mesmas especificidades observadas nos hibridomas parentais.
- 5- O mAb A4D12 reconhece um motivo linear (DGGSA) compartilhado entre duas isoformas de SAG2A de *T. gondii*.
- 6- O mAb A3A4 reconhece epitopo conformacional identificado computacionalmente entre as proteínas SRS6, BSR4, SAG5A, SAG5C e SAG5D da superfamília de SRS (SAG-1 related sequences).
- 7- O mAb A3A4 reconhece cinco variantes eletroforéticas de membros de SRS em antígenos de taquizoítas de *T. gondii*.

- 8- Os anticorpos monoclonais A4D12 e A3A4 reconhecem epitopos expressos em cepas dos genótipos do tipo I e II de *T. gondii*, mas não em outros parasitos do filo Apicomplexa.
- 9- O bloqueio dos epitopos mapeados no presente trabalho, utilizando os mAb A4D12 e A3A4, não protege camundongos C57BL/6 da infecção com parasitos de *T. gondii* do genótipo tipo I.

- COUVREUR, G.; SADAK, A.; FORTIER, B.; DUBREMETZ, J. F. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. v. 97. p. 1-10, 1988.
- DEVLIN, J. J.; PANGANIBAN, L. C.; DEVLIN, P. E. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. **Science**. v. 249. p. 404-406, 1990.
- DOBROWOLSKI, J. M.; CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L. D. Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Molecular Microbiology**. v. 26. n. 1. p. 163-173, 1997.
- DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**. v. 84. p. 933-939, 1996.
- DUBEY J. P. Infectivity and pathogenicity of *Toxoplasma gondii* oocysts for cats. **Journal of Parasitology**. v. 82. p. 957-961, 1996.
- FELICI, F.; CASTAGNOLI, L.; MUSACCHIO, A.; JAPPELLI, R.; CESARENI, G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. **Journal of Molecular Biology**. v. 222. p. 301-310, 1991.
- GAZZINELLI, R. T.; HAKIIM, F. T.; HIENY, S.; SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in INF- $\gamma$  production and

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLACK, M. W.; BOOTHROYD, J. C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 64, n. 3. p. 607-623, 2000.
- BOOTHROYD, J. C.; HEHL, A.; KNOLL, L. J.; MANGER, I. D. The surface of *Toxoplasma*: more and less. *International Journal for Parasitology*. v. 28. p. 3-9, 1998.
- BOSSI, P.; BRICAIRE, F. Severe acute disseminated toxoplasmosis. *The Lancet*. v. 364. p. 579, 2004.
- BURG, J. L.; PERELMAN, D.; KASPER, L. H.; WARE, P. L.; BOOTHROYD, J. C. Molecular analysis of the gene encoding the major surface antigen of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*. v. 141, n. 10. p. 3584-3591, 1988.
- CARRUTHERS, V. B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*. v. 81. p. 111-122, 2002.
- CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S.; BEAUCHAMPS, P.; FOURMAUX, M. P.; CAMUS, D.; CAPRON, A.; DUBREMETZ, J. F. Similarities between the primary structures of two distinct major surface proteins of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry*. v. 269. p. 16217-16222, 1994.

protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **The Journal of Immunology**. v. 146, n. 4. p. 286-292, 1991.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular Toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 184. p. 633-639, 2001.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of a 30 kDa surface protein in host cell invasion. **Experimental Parasitology**. v. 74. p. 106-111, 1992.

GRIMWOOD, J.; SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. **International Journal for Parasitology**. v. 26, n. 2. p. 169-173, 1996.

HAKANSSON, S.; MORISAKI, H.; HEUSER, J.; SIBLEY, L. D. Time-Lapse video microscopy of gliding motility in *Toxoplasma gondii* reveals a novel biphasic mechanism of cell locomotion. **Molecular Biology of the Cell**. v. 10. p. 3539-3547, 1999.

HE, X.; GRIGG, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; GARCIA, K. C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. **Nature Structural Biology**. v. 9, n. 8. p. 606-611, 2002.

HEHL, A.; KRIEGER, T.; BOOTHROYD, J. C. Identification and characterization of SRS1, a *Toxoplasma gondii* surface antigen upstream of and related to SAG1. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 89. p. 271-282, 1997.

HEINTZELMAN, M. B.; SCHWARTZMAN, J. D. Myosin diversity in Apicomplexa. **Journal of Parasitology**. v. 87, n. 2. p. 429-432, 2001.

HETTMANN, C.; HERM, A.; GEITER, A.; FRANK, B.; ACHWARZ, E.; SOLDATI, T.; SOLDATI, D. A Dibasic motif in the tail of a class XIV Apicomplexan myosin is an essential determinant of plasma membrane localization. **Molecular Biology of the Cell**. v. 11. p. 1385-1400, 2000.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **Journal of Parasitology**. v. 26. p. 169-173, 1995.

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

KASPER, L. H.; CRABB, J. H.; PFEFFERKORN, E. R. Isolation and characterization of monoclonal antibody-resistant antigenic mutant of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**. v. 129. p. 1696-1699, 1982.

- KNOLL, L. J.; BOOTHROYD, J. C. Isolation of developmentally regulated genes from *Toxoplasma gondii* by a gene trap with the positive and negative selectable marker hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Molecular Cell Biology**. v. 18. p. 807-814, 1998.
- KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature** v. 256. p. 495-497, 1975.
- KONG, J.; GRIGG, M. E.; UYETAKE, L.; PARMLEY, S.; BOOTHROYD, J. C. Serotyping of *Toxoplasma gondii* infections in humans using synthetic peptides. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 187. p. 1484-1495, 2003.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227. p. 680-685, 1970.
- LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; BOOTHROYD, J. C. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. **Experimental Parasitology**. v. 96. p. 89-96, 2000.
- LEKUTIS, C.; FERGUSON, D. J. P.; GRIGG, M. E.; CAMPS, M.; BOOTHROYD, J. C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. **International Journal for Parasitology**. v. 31. p. 1285-1292, 2001.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. v. 193. p. 265-275, 1951.

LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. **Clinical Infection Disease**. v. 15. p. 211-222, 1992.

LYONS, R. E.; McLEOD, R.; ROBERTS, C. W. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. **Trends in Parasitology**. v. 18, n. 5. p. 198-201, 2002.

MANDAVA, S.; MAKOWSKI, L.; DEVARAPALLI, S.; UZUBELL, J.; RODI, D. J. RELIC – A bioinformatics server for combinatorial peptide analysis and identification of protein-ligand interaction sites. **Proteomics**. v. 4. p. 1439-1460, 2004.

MANGER, I. D.; HEHL, A. B.; BOOTHROYD, J. C. The surface of *Toxoplasma gondii* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. **Infection and Immunity**. v. 66. p. 2237-2244, 1998.

MANOUTCHARIAN, K.; DÍAZ-OREA, A.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, G.; GONZÁLEZ, E.; ALUJA, A.; VILLALOBOS, N.; GÓMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO, E. Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine

against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunoparasitology**. v. 99. p. 11-24, 2004.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Expression of anti-Z-Dna single chain antibody variable fragment on the filamentous phage surface. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**. v. 33. p. 569-579, 2000.

MESSING, J. New M13 vectors for cloning. **Methods in Enzymology**. v. 101. p. 20-78, 1983.

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

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

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Experimental Parasitology**. v. 79. p. 11-20, 1994.

- MINEO, J. R.; KHAN, I.A.; KASPER, L. H. *Toxoplasma gondii*: A monoclonal antibody that inhibits intracellular replication. *Experimental Parasitology*. v. 79. p. 351-361, 1994.
- MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. *The Lancet*. v. 363. p. 1965-1976, 2004.
- ODBERG-FERRAGUT, C.; SOETE, M.; ENGELS, A.; SAMYN, B.; LOYENS, A.; VAN BEEUMEN, J.; CAMUS, D.; DUBREMETZ, J. F. Molecular cloning of the *Toxoplasma gondii* sag4 gene encoding an 18 kDa bradyzoite specific surface protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 82. p. 237-244, 1996.
- O'NEIL K. T.; HOESS, R. H.; JACKSON, S. A.; RAMACHANDRAN, N. S.; MOUSA, S. A.; DEGRADO, W. F. Identification of novel peptide antagonists for GPIIb/IIIa from a conformationally constrained phage peptide library. *Proteins*. v. 14. p. 509-515, 1992.
- PARMELY, S. F.; SMITH, G. P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*. v. 73. p. 305-318, 1988.
- PARMELY, S. F.; GROSS, U.; SUCHARCZUK, A.; WINDEK, T.; SGARLATO, G. D.; REMINGTON, J. S. Two alleles of the gene encoding surface antigen P22 in 25 strains of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*. v. 80, n. 2. p. 293-301, 1994.

- PEZZELLA-D'ALESSANDRO, N.; MOAL, H. L.; BONHOMME, A.; VALERE, A.; KLEIN, C.; GOMEZ-MARIN, J.; PINON, J. Calmodulin distribution and the actomyosin cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v. 49, n. 4. p. 445-453, 2001.
- PHIZICKY, E. M.; FIELDS, S. Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. **Microbiology Reviews**. v. 59. p. 94-123, 1995.
- PRINCE, J. B.; AUER, K. L.; HUSKINSON, J.; PARMLEY, S. F.; ARAÚJO, F. G.; REMINGTON, J. S. Cloning, expression, and cDNA sequence of surface antigen P22 from *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 43. p. 97-106, 1990.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; NATOVITZ, P.; SHER, A. Vaccination against cutaneous leishmaniasis in murine model. Induction of protective immunity with a soluble extract of promastigotes. **Journal of Immunology**. v. 139. p. 221-227, 1987.
- SCOTT, J. K.; SMITH, G. P. Searching for peptide ligands with and epitope library. **Science**. v. 249. p. 386-390, 1990.
- SIBLEY, L. D. Recent origins among ancient parasites. **Veterinary Parasitology**. v. 115. p. 185-198, 2003.

SIEGEL, S. E.; LUNDE, M. N.; GELDERMAN, A. H. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. **Blood**. v. 37. p. 388-394, 1971.

SILVA JR, A.; KAWAZOE, U.; FREITAS, F. F. T.; GATTI, M. S. V.; DOLDER, H.; SCHUMACHER, R. I.; JULIANO, M. A.; SILVA, M. J.; LEITE, A. Avian anticoccidial activity of a novel membrane-interactive peptide selected from phage display libraries. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 120. p. 53-60, 2002.

SMITH, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**. v. 228. p. 1315-1317, 1985.

SMITH, G. P.; SCOTT, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. **Methods in Enzymology**. v. 217. p. 228-257, 1993.

SOLDATI, D.; BOOTHROYD, J. C. Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Science**. v. 260. p. 349-352, 1993.

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

SPANO, F.; RICCI, I.; CRISTINA, M. D.; POSSENTI, A.; TINTI, M.; DENDOUGA, N.; TOMAVO, S.; CRISANTI, A. The SAG5 locus of *Toxoplasma gondii* encodes three novel proteins belonging to the SAG1 family of surface antigens. **International Journal for Parasitology**. v. 32. p. 121-131, 2002.

STUDIER, F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of Molecular Biology**. v. 79. p. 237-248, 1973.

SU, C. L.; EVANS, D.; COLE R. H.; KISSINGER, J. C.; AJIOKA, J. W.; SIBLEY, L. D. Enhanced oral transmission acquired through recent recombination led to widespread expansion of *Toxoplasma*. **Science**. v. 299. p. 414-416, 2003.

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

TINTI, M.; POSSENTI, A.; CHERCHI, S.; BARCA, S.; SPANO, F. Analysis of the SAG5 locus reveals a distinct genomic organisation in virulent and avirulent strains of *Toxoplasma gondii*. **International Journal for Parasitology**. v. 33. p. 1605-1616, 2003.

TOMAVO, S.; SCHWARZ, R. T.; DUBREMETZ, J. F. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Molecular Cell Biology**. v. 9. p. 4576-4580, 1989.

TOMAVO, S.; MARTINAGE, A.; DUBREMETZ, J. F. Phosphorylation of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. **Parasitology Research**. v. 78. p. 541-544, 1992.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of National Academy of Science USA**. v. 76. p. 4350-4356, 1979.

VANHOORELBEKE, K.; DEPRAETERE, H.; ROMIJN, R. A. P.; HUIZINGA, E. G.; MAEYER, M. D.; DECKMYN, H. A consensus tetrapeptide selected by phage display adopts the conformation of a dominant discontinuous epitope of a monoclonal anti-VWF antibody that inhibits the von Willebrand factor-collagen interaction. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 39. p. 37815-37821, 2003.

ZINECKER, C. F.; STRIEPEN, B.; GEYER, H.; GEYER, R.; DUBREMETZ, J.; SCHWARZ, R. T. Two glycoforms are present in the GPI-membrane anchor of the surface antigen 1 (P30) of *Toxoplasma gondii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 116. p. 127-135, 2001.

FU00034837-1