

TAQUIZOÍTOS DE *Toxoplasma gondii* IRRADIADOS COM 255 Gy INDUZEM DIMINUIÇÃO DE CISTOS E LESÕES CEREBRAIS, EM CAMUNDONGOS DESAFIADOS COM CISTOS DA CEPA ME-49

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto¹, Andrés Jimenez Galisteo Jr.², Nanci do Nascimento¹ & Heitor Franco de Andrade Jr.²

1-Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Travessa R, 400, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brasil. 2-Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470 – 05403-000 - São Paulo, SP, BRAZIL. email: rmhiramoto@bol.com.br, hfandrad@usp.br

RESUMO

A toxoplasmose pode causar lesões oculares em indivíduos imunocompetentes e doença grave em fetos, pacientes infectados pelo vírus HIV e transplantados. O *Toxoplasma gondii* tem um ciclo de vida complexo, envolvendo gatos, como hospedeiros definitivos e animais de sangue quente, como hospedeiros intermediários. A infecção ocorre pela ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de felinos infectados, leite e queijo contaminado ou carnes cruas ou mal cozidas. Até o momento, não existem vacinas comerciais para o uso em humanos. Neste trabalho, taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foram irradiados com 255 Gy e inoculados em camundongos C57Bl/6j (3 doses), em seguida foram desafiados com 1, 5, 10, 20 e 25 cistos da cepa ME-49 por via oral. As lesões e o número de cistos no cérebro de todos os animais foram analisados, após 4 semanas do desafio. A mortalidade foi de 20% no grupo controle e inexistente nos animais imunizados. O número de cistos encontrados no grupo controle foi elevado, mas em pequeno número nos camundongos imunizados. Os camundongos imunizados apresentaram pouca patologia cerebral. A radiação ionizante é uma importante ferramenta no estudo da toxoplasmose e no desenvolvimento de uma vacina.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis and ionizing radiation.

I. INTRODUÇÃO

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita de importância humana e veterinária. A toxoplasmose apesar de geralmente ser uma doença benigna, pode ser uma importante causa de doença ocular em indivíduos imunocomprometidos e imunocompetentes [1], como vista na cidade de Erechim, Sul do Brasil, onde a prevalência de lesões oculares é cerca de 21% [2]. A doença pode ser severa, quando ocorrem infecções agudas em mulheres grávidas, sendo o organismo transmitido através da placenta para o feto (toxoplasmose congênita), podendo causar lesões oculares, retardamento mental, hidrocefalia, calcificações intracranianas ou até mesmo levar a morte [3]. Outros grupos gravemente afetados pela doença são os infectados pelo vírus HIV que sofrem principalmente lesões cerebrais (encefalite), os transplantados devido à imunossupressão e os portadores de câncer que estão submetidos a quimioterapias [4, 5 e 6].

O *T. gondii* apresenta um ciclo complexo, no qual os felinos são os hospedeiros definitivos e os demais animais de sangue quente, como aves e mamíferos, são os hospedeiros intermediários. O homem adquire a toxoplasmose pela ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos provenientes das fezes de felinos, pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos ou pela ingestão de leite e derivados não devidamente pasteurizados [7, 8].

Até o momento não existe nenhuma vacina comercial para a toxoplasmose humana e somente uma para uso veterinário, mas que apresenta baixa eficiência [9]. Vários modelos foram desenvolvidos utilizando diferentes antígenos e esquemas de imunização, mas com resultados conflitantes. A radiação foi utilizada no *T. gondii* com dados promissores quando utilizado desafio intraperitoneal, pois os taquizoítos irradiados mantêm os processos metabólicos e de invasão, mas perdem a capacidade de se multiplicarem [10]. Neste trabalho foram irradiados taquizoítos de *T. gondii*, seguindo-se imunização grupos de

camundongos e desafio dos animais com cistos (via oral) da cepa ME-49 com análise da sobrevida, lesões cerebrais e quantificação do número de cistos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró-análise, sendo a água utilizada purificada em sistema Milli Q, apresentando resistividade de 18 mega Ω .

Parasitas

Foram utilizados taquizoítos de *T. gondii* cepa RH que são mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia dos Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, através de sucessivas passagens intraperitoneais (i.p.) em camundongos Swiss. *T. gondii* cepa ME-49 (cistogênica), que foi cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Ricardo T. Gazzinelli (UFMG), sendo mantida por passagens seriadas por sonda oral do macerado cerebral em novos animais.

Camundongos

Camundongos machos isogênicos C57Bl/6j e não isogênicos Swiss obtidos da colônia da Faculdade de Medicina de São Paulo foram mantidos em gaiolas plásticas com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial e água *ad libitum*. A manipulação dos animais, antes e durante os ensaios, foi conduzida de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório [11] e com os "Princípios de Ética em Experimentação Animal" (COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Purificação dos Parasitas

Os parasitas da cepa RH utilizados foram retirados por lavagem peritoneal de animais previamente infectados, com salina ou PBS de maneira estéril, os quais posteriormente foram passados em coluna com SEPHADEX® G 50-80, hidratada 4 horas do momento de uso em PBS estéril e montada sobre coluna de cromatografia com filtro de teflon poroso como meio de retenção. Após lavagem da coluna com dois volumes de PBS estéril, 2 volumes de exsudato peritoneal foram aplicados, seguidos de lavagem com PBS estéril. As frações recolhidas foram reunidas e centrifugadas a 800 g por 10 min a 4° C e posteriormente ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640. A preparação foi observada por microscopia de contraste de fase para contagem dos parasitas e de eventuais células contaminantes. Preparações com contaminações maiores que 1 célula do hospedeiro para 100 taquizoítos foram desprezadas.

Irradiação

As suspensões de taquizoítos foram mantidas em banho de gelo e então submetidos à irradiação na dose de 255 Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios γ de uma fonte Cobalto-60 (GAMMACELL, Atomic Energy of

Canada, Ltd.), de forma homogênea, na presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 7,91 kGy. Os controles permaneceram na parte externa da fonte. Após a irradiação, a viabilidade de todas as amostras foi determinada pelo corante Azul de Tripiano.

Imunização dos animais

Grupos de 5 camundongos C57Bl/6j foram imunizados com três doses de 1×10^7 taquizoítos irradiados por camundongo a intervalos de 15 dias cada dose.

Desafio dos animais imunizados

Os grupos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy após 15 dias do último inoculo foram desafiados com 1, 5, 10, 20 e 25 cistos da cepa ME-49 por sonda oral. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente. Após 4 semanas do desafio os camundongos foram sacrificados e o cérebro dos animais removido e fixado (10% formaldeído/PBS pH 7,2) e emblocados em parafina. Cortes do cérebro 7 μ m foram corados com hematoxilina-eosina (H.E.) e examinados quanto à presença de cistos e lesões em um fotomicroscópio Axiophot. Partes do cérebro fresco foram homogeneizadas em 5 volumes de PBS (mg/ml) e contados em volume fixo na câmara de Neubauer.

III. RESULTADOS

Viabilidade

A viabilidade dos taquizoítos foi acompanhada durante o processo de irradiação, por meio da afinidade tintorial pelo Azul de Tripiano, dos taquizoítos mortos. Nas doses de 255 Gy com blindagem de 90%, a proporção corada (morta) foi sempre inferior a 5%. Em cada preparação pelo menos 1000 taquizoítos eram analisados.

Mortalidade

Não houve mortalidade em nenhum dos grupos de animais previamente imunizados e desafiados com cistos da cepa ME-49. Nos animais dos grupos controle, camundongos somente desafiados com cistos da cepa ME-49, a mortalidade de 20% ocorreu somente nos grupos de animais que receberam 10, 20 e 25 cistos.

Análise histo-patológica

A histologia dos animais imunizados com taquizoítos irradiados apresentou poucas patologias cerebrais e pequeno número de cistos quando desafiados com cistos da cepa ME-49, enquanto nos animais do grupo controle foram detectados inúmeros cistos e lesões cerebrais (Figura 1).

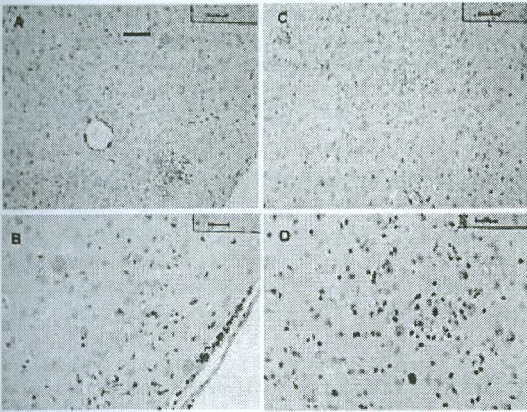


Figura 1. Histologia do cérebro de camundongos C57Bl/6 desafiados com 25 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. (A e B) camundongos normais; (C e D) imunizados com três doses i.p. a cada 15 dias com 1×10^7 taquizoítos irradiados a 255 Gy. As setas pretas indicam cistos de *T. gondii* e as setas brancas focos inflamatórios nos cérebros.

Quantificação do número de cistos

Quando grupos de camundongos foram inoculados com diferentes quantidades de cistos (1, 5, 10, 20 e 25), os animais do grupo controle apresentaram sempre uma grande quantidade de cistos cerebrais, enquanto os camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy apresentaram poucos cistos, mesmo com os desafios maiores (Inoculo 25 cistos, número de cistos grupo controle >1000; grupo imunizado $n < 100$) (Figura 2).

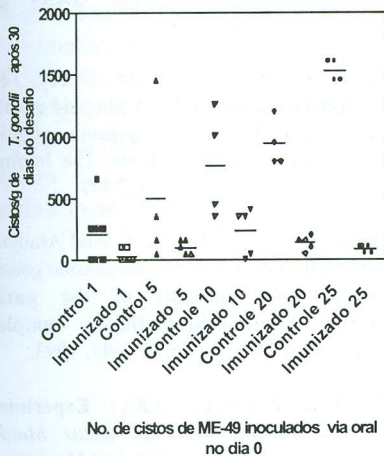


Figura 2. Quantificação do número de cistos encontrados no cérebro de camundongos inoculados via oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, 30 dias após o desafio. As barras indicam a média. Controle, camundongos normais; Imunizado, camundongos imunizados com com três doses i.p. a cada 15 dias com 1×10^7 taquizoítos irradiados a 255 Gy.

IV. DISCUSSÃO

Trabalhos prévios demonstraram que os taquizoítos de *T. gondii* irradiados perdem a habilidade de se reproduzir, sem interferência com as outras funções celulares como as funções metabólicas, proteínas, síntese de ácidos nucléicos e quando animais são imunizados com taquizoítos irradiados há produção de anticorpos específicos e aumento na sobrevida ao desafio contra inoculo i.p. [11, 12, 13]. Neste trabalho utilizou-se desafio oral, pois esta é principal fonte de infecção de humanos e animais, pela ingestão de oocistos e cistos teciduais.

Suzuki e colaboradores [14] utilizando camundongos CBA/Ca infectados com a cepa ME-49, encontraram mortalidade de 60% após 30 dias de infecção, no presente ensaio, no grupo controle a mortalidade foi de 20%, enquanto que entre os camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy e posteriormente inoculados com cistos da cepa ME-49 não houve mortalidade. Estes autores, encontraram também área de lesão, necrose e grande número de cistos nos cérebros dos animais por histologia, semelhantes aos encontrados no grupo controle, o que não ocorreu nos animais previamente imunizados, demonstrando que a imunização induz um aumento na sobrevida dos animais, e protege contra grande número de lesões e cistos cerebrais.

O número de cistos nos cérebros dos animais desafiados com a cepa ME-49 contados em PBS foi extremamente elevados no grupo controle, dados semelhantes ao encontrados quando animais foram desafiados com 10 cistos i.p. [14], mas no experimento presente, no grupo imunizado mesmo quando desafiado com 25 cistos o número de cistos contados foi extremamente baixo, corroborando com os dados histológicos, demonstrando que a imunização foi eficiente para induzir a diminuição do número de cistos nos animais.

Proteínas recombinantes foram utilizadas para imunizar camundongos, mas não foram totalmente eficientes, proporcionando proteção parcial, sem diminuição no número de cistos ou aumento da sobrevida dos animais, quando desafiados [15, 16, 17]. Outros esquemas de imunizações utilizaram antígenos purificados, mas apesar de induzir aumento de sobrevida nos animais contra taquizoítos i.p. e oocisto administrados via oral, não houve diminuição significativa no número de cistos comparados com o grupo controle [18]. Parasitas intactos, que não produzem cistos, também foram utilizados [19, 20], no entanto estas cepas podem matar os animais, caso estes apresentem algum problema no sistema imune [21], o que não ocorre com os taquizoítos irradiados, pois foi demonstrado que estes não tem capacidade de se reproduzir, apesar de manterem intactas as funções metabólicas [10].

Taquizoítos irradiados podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de esquemas de imunizações ou serem utilizados como ferramenta no estudo de reinfeção, da toxoplasmose.

AGRADECIMENTOS

Roselaine P.A. Cardoso, pela assistência técnica durante todos as fases do experimento e Cleiton Alves pelas preparações histológicas. CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro. IPEN/CNEN-SP Divisão de Radibiologia e LIMHCFMUSP pelo suporte indireto.

REFÊRENCIAS

- [1] Roberts, F. And McLeod, R., **Pathogenesis of Toxoplasmic retinochoroiditis**, Parasitology Today, vol. 15, p 51-57, 1999.
- [2] Glasner, P.D., Silveira, C., Kruszon-Moran, D., Martins, M.C., Burnier Junior, M., Silveira, S., Camargo, M.E., Nussenblatt, R.B., Kaslow, R.A. And Belfort Junior, R., **An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil**, American Journal of Ophthalmology, vol. 114, p 136-144, 1992.
- [3] Jones, J.L., Lopez, A., Wilson, M., Schulkin, J. And Gibbs, R., **Congenital toxoplasmosis: A review**, Obstetrical and Gynecological Survey, vol. 58, p 296-305, 2001.
- [4] Luft, B.J. And Remington, J.S., **Toxoplasmic encephalitis in AIDS**, Clinical Infectious Diseases, vol. 15, p 211-222, 1992.
- [5] Michaels, M.G., Wald, E.R., Fricker, F.J., del Nido, P.J. And Armitage, J., **Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants**, Clinical Infectious Diseases, vol. 14, p 847-851.
- [6] Dagher R. And Lucas, K., **Toxoplasmosis in the patients with cancer**, Infection in Medicine, vol. 13, p 998-1000, 1993.
- [7] Frenkel, J.K., Dubey, J.P. And Miller, N.L., **Toxoplasma gondii in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts**, Science, vol. 167, p 893-896.
- [8] Hiramoto, R.M., Mayrbaur-Borges, M., Galisteo Jr., A.J., Meireles, L.R., Macre, M.S. And Andrade Jr., H.F., **Infectivity of cysts of the ME-49 Toxoplasma gondii strain in bovine milk and homemade cheese**, Revista de Saúde Pública, vol. 35, p 113-118, 2001.
- [9] Buxton, D., **Toxoplasmosis: the first commercial vaccine**, Parasitology Today, vol. 9, p 335-337, 1993.
- [10] Hiramoto, R.M., Galisteo Jr., A.J. And Andrade Jr., H.F. **Effects of Cobalt 60 ionizing radiation on the metabolism and infectivity of a parasitic protozoa, Toxoplasma gondii**. In: VII - CGEN General Conference on Nuclear Energy, Belo Horizonte, MG, 1999.
- [11] Hiramoto, R.M., Almeida, B.S.V., Cardoso, R.P.A. And Andrade Jr. H.F., **Toxoplasma gondii effects of ⁶⁰Co ionizing radiation in its viability and infectivity, detected in vitro in LLC-MK2 cells and in vivo on C57Bl/6j mice**, In: XI ENFIR / IV ENAN JOINT NUCLEAR CONFERENCES, Poços de Caldas, MG, 1997.
- [12] Hiramoto, R.M., Galisteo Jr, A.J., Cardoso, R.P.A. And Andrade Jr, H.F., **⁶⁰Co ionizing radiation effects in the physiology and cellular invasion of Toxoplasma gondii tachyzoites**, In: XIV-Reunião anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, Caxambú, MG, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 93, Suppl.II, p 94, 1998.
- [13] Hiramoto, R.M., Almeida, B.S.V, Alves, I.C. & Andrade Jr, H.F. **Immune response to Toxoplasma gondii tachyzoites submitted to ⁶⁰Cobalto irradiation, formaldehyde and chemotherapy**, In: XIV-Reunião anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, Caxambú, MG, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, vol. 92, Suppl.I, p 253, 1997.
- [14] Suzuki, Y., Conley, F.K. And Remington, J.S., **Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of Toxoplasma gondii**, The Journal of Infectious Diseases, vol. 159: p 790-794, 1989.
- [15] Leyva, R., Herion, P. And Saavedra, R. **Genetic immunization with plasmid DNA for the ROP2 protein of Toxoplasma gondii**, Parasitology Research, vol. 87, p 170-179, 2001.
- [16] Desolme, B., Mevelec, M.N., Buzoni-Gatel, D. And Bout, D., **Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding Toxoplasma gondii GRA4 gene**. Vaccine, vol. 18, p 2512-2521, 2001.
- [17] Angus, C.W., Klivington-Evans, D., Dubey, J.P. & Kovacs, A., **Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (p30) protein of Toxoplasma gondii is immunogenic and protective in rodents**, The Journal of Infectious Diseases, vol. 181, p 317-324, 2000.
- [18] Lunden, A., Lovgren, K., Uggla, A. And Araujo, A., **Immune response and resistance to Toxoplasma gondii in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes**. Infection and Immunity, vol. 61, p 2639-2643, 1993.
- [19] Escadillo, A. And Frenkel, J.K., **Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus Monkeys**. American Journal of Tropical Medicine And Hygiene, vol. 44, p 382-389, 1991.

[20] Lindsay, D.S., Blagburn, B.L. And Dubey, J.P., **Safety and results of challenge of weaned pigs given a temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii***, The Journal of Parasitology, vol. 79, p 71-76, 1993.

[21] Sayles, P.C. & Johnson, L.L., **Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii***, Infection and Immunity, vol. 64, p 3088-3092, 1996.

ABSTRACT

Toxoplasmosis can cause ocular lesions in normal individuals and several diseases in foetus, HIV infection and transplants. *Toxoplasma gondii* has a complex life cycle, involving cats, as the definitive host, and warm blood species, as intermediated hosts. The infection occurs by ingestion of food and water contaminated with infected cat faeces, contaminated milk and cheese or raw and undercook meat of the intermediated hosts. To date, there is no commercial vaccine of use in humans. In this work, tachyzoites of *T. gondii* RH strain were irradiated with 255 Gy and inoculated in C57Bl/6j mice (3 doses, biweekly), after mice were challenged with 1, 5, 10, 20 and 25 cysts of ME-49 by oral gavage. The lesions and cysts in the brain were analyzed in all mice, after 4-week post infection. The mortality was 20% in control mice (ME-49 cysts only) and not one in immunized mice. The number of cysts was high in the control group, but low in immunized 255 Gy mice ($n < 100$). Immunized mice showed less cerebral pathology and necrosis foci. Ionizing radiation is an important tool in the study toxoplasmosis and vaccine development.