



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR,
EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM TAQUIZOÍTOS
IRRADIADOS DE *Toxoplasma gondii***

ROBERTO MITSUYOSHI HIRAMOTO

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.

Orientador:
Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

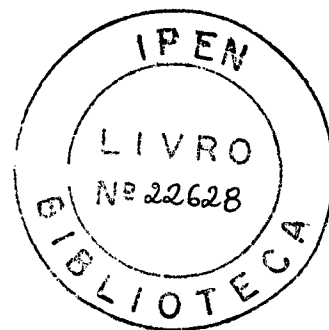
**São Paulo
2002**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR,
EM CAMUNDONGOS INOCULADOS COM TAQUIZOÍTOS
IRRADIADOS DE *Toxoplasma gondii***

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto



Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientador:

Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr.

São Paulo

2002

*Dedico este trabalho a minha esposa
Erika Hellen Esther Hoffmann,
companheira inseparável que sempre
me incentivou e auxiliou, em todos
os momentos de nossa maravilhosa
convivência, com muito amor e
carinho.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr pelo apoio constante, ensinamentos e amizade durante toda a minha vida científica. Agradeço pela confiança e por sempre ter acreditado no meu trabalho, desde o momento que me aceitou como aluno de iniciação científica.
- Ao Andrés Jimenez Galisteo Jr. pela amizade, sugestões, apoio e participação em todas as fases deste trabalho.
- A Roselaine Pereira Alvim Cardoso pela amizade, convivência e auxílio técnico constante, durante vários anos, que permitiram o bom desenvolvimento deste projeto.
- A Dona Francisca Lucio de Oliveira pela amizade e por manter os materiais e o laboratório sempre organizados para a boa realização deste projeto.
- Ao Luciano Monteiro da Silva pelo auxílio e esforço em obter todos os recursos e materiais necessários para a realização deste projeto.
- Ao amigo Daniel Perez Vieira pelo auxílio em vários ensaios e na correção final da tese.
- A Isabel C. Alves pela amizade e apoio durante as fases iniciais deste trabalho.
- A Dra. Eufrosina S. Umesawa pelos muitos empréstimos de aparelhos e materiais utilizados neste projeto.
- A Solange Fernandes Ferreira dos Santos pela amizade e pelo auxílio principalmente no fornecimento de materiais.

- A Marilda S. Nascimento grande amizade e pelo ajuda nas culturas celulares.
- Ao Henrique César K. Terentowicz pelo auxílio durante os ensaios de proliferação celular e citocinas.
- Aos amigos do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo pela convivência durante todos os períodos do projeto.
- A todos os amigos do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo que conviveram comigo durante todas as fases do projeto.
- A Dra. Kayo Okazaki pelas sugestões apresentadas durante o Seminário de Área.
- A Dra. Lígia Ely Morganti Ferreira Dias pelas sugestões apresentadas durante o Seminário de Área.
- A Dra. Monamaris M. Borges pelas sugestões apresentadas durante a Qualificação.
- Ao Dr. Luiz Guilherme Stark Aroeira pelas sugestões apresentadas durante a Qualificação.
- Ao Carlos G. da Silveira e Elizabeth S. R. Somessari por possibilitarem e acompanharem por inúmeras vezes a irradiação dos taquizoítos de *T. gondii* utilizados neste projeto.

Aos amigos do IPEN pela convivência e apoio durante o decorrer do projeto.

- Ao Cleiton Alves pelas preparações histológicas.
- A Dra Telma S. Okay (Instituto da Criança) pelos ensaios de "PCR".
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.

- A FAPESP por financiar este projeto.
- Ao LIMFMUSP49 e a Supervisão de Radiobiologia/IPEN pelo suporte ao projeto.
- A todos que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste projeto.

ABSTRACT

Evaluation of the cellular and humoral response in mice inoculated with irradiated tachyzoites of *Toxoplasma gondii*

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

Objectives: Evaluate the cellular, humoral immune response and the protection against oral challenge in mice, induced by 255 Gy *T. gondii* irradiated tachyzoites in a source of ^{60}Co γ -rays.

Material and Methods: *T. gondii* tachyzoites were irradiated with 255 Gy, maintained in nitrogen and freezer. C57Bl/6j mice were immunized with irradiated tachyzoites (3 doses). The humoral and cellular response in immunized mice was analyzed. The immunized mice with 255 Gy irradiated tachyzoites (3 doses) were challenged, by oral route, with ME-49 *T. gondii* strain, mortality and quantification of cysts number was analyzed.

Results: The mice immunized with irradiated tachyzoites presents right levels of IgG antibody specifics, which recognized *T. gondii* proteins. The mice spleen cells presents lymphoproliferative response and cytokine profiles similar to those produced by chronic infection. The mice immunized with irradiated tachyzoites displayed minimal cerebral pathology and low cysts numbers after oral challenged with ME-49 strain.

Conclusions: The 255 Gy γ -rays irradiated *T. gondii* tachyzoites induce immune response in mice, similar chronic infection, with partial protection after challenge with ME-49 strain, presenting decrease of the cerebral pathology and cysts numbers.

RESUMO

Avaliação da resposta imune humoral e celular, em camundongos inoculados com taquizoítos irradiados de *Toxoplasma gondii*

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

Objetivos: Avaliar a resposta imune celular, humoral e a proteção contra desafios orais, em camundongos, induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy com raios γ de uma fonte de ^{60}Co .

Material e Métodos: Taquizoítos de *T. gondii* foram irradiados a 255 Gy, preservados em nitrogênio líquido ou freezer. Camundongos C57Bl/6j foram imunizados com taquizoítos irradiados (3 doses). A resposta imune humoral e celular nos animais imunizados com taquizoítos irradiados foram analisadas. Os camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy (3 doses) foram desafiados, via oral, com a cepa ME-49, sendo a mortalidade e quantificação do número de cistos foi analisada.

Resultados: Os animais imunizados com taquizoítos irradiados apresentam níveis elevados de IgG específicos, que reconhecem diversas proteínas do *T. gondii*. Os esplenócitos dos animais apresentam resposta linfo-proliferativa e produção de citocinas similares aos animais com infecção crônica. Camundongos imunizados com taquizoítos irradiados manifestam pouca patologia cerebral e reduzido número de cistos após desafio com via oral com a cepa ME-49.

Conclusões: Os taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy com raios γ induzem resposta imune em camundongos, semelhante a infecção crônica, com proteção parcial, quando os animais são desafiados com a cepa ME-49, apresentando diminuição da patologia cerebral e do número de cistos.

SUMÁRIO

	Página
1 – INTRODUÇÃO	1
Toxoplasmose	1
Ciclo de vida	10
Fontes de infecção	17
Tratamento	18
Aspectos gerais da imunidade	19
Vacinas	23
Radiação ionizante	25
2 – OBJETIVOS	33
3 - MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1. Parasitas	35
3.2. Animais experimentais	36
3.3. Purificação dos parasitas	36
3.4. Imunofluorescência Indireta (IFI)	37
3.4.1. Antígenos	37
3.4.2. Descrição da reação	38
3.5. Irradiação	39
3.6. Estabilato de nitrogênio líquido	39
3.7. Resfriamento -17°C com Glicerol	40
3.8. Testes de viabilidade dos parasitas	40
3.9. Imunizações dos camundongos	40
3.10. Coleta de sangue e soro	41
3.11. Obtenção de antígeno de <i>T. gondii</i>	41
3.12. Ensaio Imunoenzimático – ELISA	41
3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS	42
3.14. Western Blot	44

3.15. Invasividade dos taquizoítos de <i>T. gondii</i> cultivados com soro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy	45
3.16. Criopreservação com DMSO x resfriamento com Glicerol	46
3.17. Desafio dos camundongos	47
3.18. Quantificação do número de cistos	47
3.19. Exame histo-patológico	48
3.20. "Polymerase Chain Reaction" (PCR)	48
3.21. "In vitro Induced Antibody Production – IVIAP"	49
3.21.1. Sensibilização das placas de 96 poços	49
3.21.2. Obtenção de células esplênicas e cultura	50
3.22. Proliferação de células esplênicas e detecção de citocinas	51
3.22.1. Obtenção de células esplênicas	51
3.22.2. Proliferação das células esplênicas	52
3.22.3. Detecção de citocinas no sobrenadante de cultura	53
3.22.4. Análise estatística	54
4 – RESULTADOS	55
4.1. Viabilidade dos taquizoítos controle e irradiados após criopreservação	55
4.2. Viabilidade dos taquizoítos irradiados e mantidos no freezer com glicerol	55
4.3. Sobrevida dos camundongos após a imunização	56
4.4. Imunogenicidade em camundongos C57Bl/6j inoculados com taquizoítos irradiados com dose de 255 Gy	57
4.5. Invasividade dos taquizoítos incubados com soro de camundongo imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy	59
4.6. Anticorpos IgG específicos em camundongos inoculados com taquizoítos irradiados mantidos em DMSO ou Glicerol	61
4.7. Desafiados com a cepa cystogênica de <i>T.gondii</i> ME-49	63
4.7.1. Mortalidade	63
4.7.2. Exame histo-patológico	64
4.7.3. Quantificação do número de cistos	72
4.7.4. PCR	73

4.8. IVIAP	75
4.9. Respostas proliferativas das células do baço	76
4.10. Citocinas	78
5 – DISCUSSÃO	81
6 – CONCLUSÕES	99
7 – BIBLIOGRAFIA	101

Anexo – Aprovação do Comitê de ética

Anexo I – **HIRAMOTO, R.M.**, Galisteo Jr., A.J., Nascimento, N. & Andrade Jr., H.F. (2002). 200 Gy Sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice. *Vaccine*, **20**: 2072-2081.

Anexo II – **HIRAMOTO, R.M.**, Mayrbauri-Borges, M., Galisteo Jr., A.J., Meireles, L.R., Macre, M.S. & Andrade Jr., H.F. (2001). Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev. Saúde Pública*, **35**: 113-118.

Anexo III – Suaréz-Aranda, F., Galisteo Jr., A.J., **HIRAMOTO, R.M.**, Cardoso, R.P.A., Meireles, L.R., Miguel, O. & Andrade Jr., H.F. (2000). The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology*, **91**: 23-32.

Anexo IV – VII CGEN Congresso Geral de Energia Nuclear (1998)

Anexo V – 50th Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene (2001)

Anexo VI – 48th Annual Meeting American Society of Tropical Medicine and Hygiene (1999)

Anexo VII – XVII Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2001)

Anexo VIII – XVI Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (2000)

Anexo IX – XV Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (1999)

Anexo X – XIV Annual Meeting of Brazilian Society of Protozoology (1998)

Anexo XI – XIII ENFIR /VI ENAN (2002)

Anexo XII – Folha de São Paulo, Página A10, 20/05/02

1 – INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório e pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidia (Ravdin, 1995) que pode infectar o homem e uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens (Dubey, 1993). Os protozoários deste filo caracterizam-se por apresentar o Complexo Apical, estrutura responsável pelos processos de invasão celular. Outros representantes do filo são *Plasmodium* spp, *Cryptosporidium* spp, *Isospora* spp, *Sarcocystis* spp e *Babesia* spp (Ravdin, 1995). O *T. gondii* foi descoberto por Nicolle and Manceaux em 1908 em um roedor *Ctenodactylus gundi* e, ao mesmo tempo, por Splendore em um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil.

Toxoplasmose

Toxoplasmose em imunocompetentes

O *Toxoplasma gondii*, apesar de infectar com frequência o homem, causa geralmente doença benigna, pois raramente provoca distúrbios no seu hospedeiro e, quando isto ocorre, as perturbações são em geral, leves e temporárias (Remington *et al*, 1995). O *T. gondii* é uma importante causa de doença ocular no mundo em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. A retinocoroidite toxoplasmica é uma das maiores causas de danos visuais nos EUA, sendo responsável por 30-50% de todos os casos de uveíte posterior (McCannel *et al*, 1996). Em uma epidemia de

toxoplasmose adquirida que ocorreu em Atlanta (EUA), 3,6% dos indivíduos infectados e examinados após 4 anos da infecção inicial tiveram lesões oculares pelo *T. gondii* (Akstein *et al*, 1982), enquanto em outro surto de toxoplasmose que ocorreu no Canadá, 20,6% de todos os indivíduos apresentaram doença ocular (Burnett *et al*, 1998). Na cidade de Erechin, sul do Brasil, a retinocoroidite tem ocorrido freqüentemente, de 1042 indivíduos examinados, 184 (17,7%) apresentavam a doença, sendo que a prevalência desta foi baixa em crianças e aumentou com a idade, sugerindo que nesta população, a toxoplasmose ocular é uma seqüela da infecção aguda adquirida (Glasner *et al*, 1992). Estudos recentes na mesma população demonstraram que de 109 indivíduos soronegativos em 1990, 21 (19,5%) foram encontrados soropositivos em 1997, e destes, 2 indivíduos (9,5%) apresentaram lesões oculares típicas de toxoplasmose, dos 131 indivíduos soropositivos que não apresentaram lesões oculares em 1990, 11 (8,3%) tiveram lesões por toxoplasma em 1997 (Silveira *et al*, 2001). Na cidade de Jaguapitã estado do Paraná, 82,9% dos indivíduos examinados foram positivos para toxoplasmose e 26,8% relataram algum tipo de lesão ocular (Garcia *et al*, 1999). Em Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, a prevalência de toxoplasmose ocular foi 14% na área rural e 8% na área urbana (Petersen *et al*, 2001).

Utilizando modelos experimentais com roedores (hamsteres e *Calomys callosus*) com ingestão oral de cistos, demonstrou-se que a toxoplasmose aguda é uma das importantes causas de lesões oculares (Pereira *et al*, 1999; Gormley *et al*, 1999). A incidência de retinocoroidite toxoplásmica aguda sintomática foi realizada na Grã Bretanha sendo estimada em 0,4/100000/ano para pessoas nascidas na Inglaterra e 57/100000/ano para negros nascidos no

oeste da África (Gilbert *et al*, 1995). Outro problema grave causado pela toxoplasmose ocular é o descolamento da retina, em estudo recente com 150 pacientes que apresentavam toxoplasmose ocular, 9 (6%) tiveram descolamento da retina (Bosh-Driessen *et al*, 2000).

Embora a toxoplasmose seja considerada uma infecção assintomática, estudos têm demonstrado que o *T. gondii* pode modificar o comportamento de seus hospedeiros intermediários para aumentar a chance destes serem predados por felinos e assim completar o seu ciclo de vida (Berday *et al*, 1995; Webster, 2001). Mudanças de comportamento têm sido demonstrados em ratos, camundongos infectados com *T. gondii* (Berday *et al*, 2000; Hrdá *et al*, 2000; Webster *et al*, 1994) e inclusive em humanos (Fleg *et al*, 1996; Havlicek *et al*, 2001).

Toxoplasmose congênita

Mulheres infectadas com *T. gondii* antes da concepção raramente transmitem a infecção para seus fetos, no entanto, quando a infecção aguda ocorre durante a gravidez, os parasitas podem infectar o feto através da placenta, causando sérios problemas de saúde. O risco de doença congênita é baixo quando a infecção é adquirida durante o primeiro semestre e alto quando ocorre durante o terceiro trimestre, entretanto a gravidade da doença é pior se a infecção é adquirida no primeiro semestre (Jones *et al*, 2001). Os sinais clássicos da toxoplasmose congênita são: hidrocefalia; coriorretinite; calcificações cranianas e retardamento mental (Sabin, 1941).

Muitos dos recém-nascidos infectados pelo *T. gondii* não apresentam

sintomas no nascimento, mas podem ter sérios problemas durante a infância ou adolescência. Cerca de 80% dos indivíduos infectados congenitamente e não tratados desenvolvem lesões oculares na adolescência ou na fase adulta, alguns com perda da visão (Carter & Frank, 1986; Wilson *et al*, 1980). No ano de 1992 nos Estados Unidos, 100 de 635.000 recém nascidos examinados tiveram resultado positivo e a infecção congênita foi confirmada em 52 destes, no qual 19 apresentaram anormalidades no sistema nervoso central ou retina (Guerrina *et al*, 1994). Na Noruega, 47 de 35.940 mulheres analisadas demonstraram evidências de infecção primária durante a gravidez (Jenum *et al*, 1998).

No Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, um total de 140.914 recém nascidos, com média de idade em torno de 18 dias, foram testados para anticorpos IgM, sendo detectados 47 casos de toxoplasmose e calculada uma prevalência de 1 para 3000 nascidos vivos (Neto *et al*, 2000). Estes autores acompanharam os indivíduos infectados num período que varia de 6 meses a 3 anos e 7 meses, observando que 39 (83%) dos pacientes foram assintomáticos durante o período e que 8 (17%) apresentaram manifestações clínicas da doença. Em Campos de Goytacazes, estado do Rio de Janeiro, um estudo realizado entre 1999 e 2000, detectou 5 de 2550 recém nascidos com toxoplasmose congênita (Petersen *et al*, 2001).

Na região metropolitana de São Paulo, Brasil, estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano (Guimarães *et al*, 1993). Nos E.U.A ocorrem cerca 400 a 4.000 casos ano, com gastos em torno de 0,4 e 8,8 bilhões de dólares anualmente com serviços médicos e queda de produtividade atribuíveis a toxoplasmose (Roberts & Frenkel, 1990; Hsu *et al*,

1992). Na França e Áustria, a incidência de toxoplasmose congênita é de 3-4 casos por cada 1000 nascimentos (Smyth, 1994).

Toxoplasmose em imunodeprimidos

Em aidéticos, o parasita é responsável pelo desenvolvimento de uma variedade de sintomas, mas o mais freqüente é a encefalite, onde a rápida multiplicação dos taquizoítos resulta na destruição dos tecidos neurais. Cerca de 95% da encefalite por toxoplasma é devido a reativação da infecção latente, como um resultado da perda progressiva da imunidade celular (Luft & Remington, 1992). Cerca de 10 a 40% dos adultos com AIDS nos EUA tem infecção latente pelo *T. gondii* e um terço destes pacientes devem desenvolver encefalite por toxoplasma (Luft & Remington, 1992). Na África, onde a infecção latente é maior, o número de indivíduos com AIDS que desenvolvem encefalite por toxoplasma é cerca de 25-50% dos infectados (Clumeck *et al*, 1984). Estudos realizados em São Paulo demonstraram que 21% no ano de 1988 e 46% no ano de 1991 dos pacientes analisados com AIDS apresentaram encefalite por toxoplasma (Passos *et al*, 2000). Os custos do tratamento de encefalite toxoplásmica em aidéticos são estimados em US\$ 10.379/por caso, causando um gasto total anual de 23 a 106 milhões de dólares por ano (Roberts *et al*, 1994).

Estima-se que nos EUA entre 18 a 25% dos pacientes com AIDS possam sofrer toxoplasmose sintomática durante o curso de sua doença (Kasper & Buzoni-Gatel, 1998), na primeira década da epidemia 20.000 a 40.000 pacientes infectados apresentaram as formas clínicas da toxoplasmose

(Gellin & Soave, 1992) e cerca de 3-20% de todos os pacientes mortos com AIDS foram devido ao *T. gondii* (Luft *et al*, 1994). Levantamento realizado no Estado de São Paulo, Brasil, sobre as principais causas associadas em mortes por AIDS demonstraram que a toxoplasmose foi responsável por 12,2% das mortes (Santo *et al*, 2000).

Em transplante de órgãos sólidos, a toxoplasmose ocorre mais freqüentemente em receptor soro negativo de um órgão transplantado de um doador soro positivo (Michaels *et al*, 1992). Quando se trata de transplantes de fígado, coração e medula óssea o *T. gondii* pode causar sérios problemas, inclusive levando a óbito (Mayes *et al*, 1995; Derouin *et al*, 1986; Michaels *et al*, 1992). Sem profilaxia, cerca de 50% dos receptores de transplante cardíaco soronegativos, 20% dos receptores de fígado e <1% dos receptores de rim adquirem toxoplasmose através do órgão de um doador soropositivo (Schaffner, 2001).

Em São Paulo, no período de 1996 a 1998, 97 transplantados cardíacos que sobreviveram por período superior a uma semana após o transplante foram analisados, destes ocorreram quatro casos de infecção pelo *Toxoplasma gondii*, levando a morte um dos pacientes (Couto *et al*, 2001). Estudos experimentais utilizando gatos e cães em transplantes renais demonstraram que a toxoplasmose pode ser uma complicação fatal para quem recebe o transplante (Bernsteen *et al*, 1999).

Na Europa, vários casos de toxoplasmose foram relatados em pacientes que foram submetidos a transplantes de células mães hematopoiéticas, com lesões severas e óbito (Martino *et al*, 2000). Em autópsia de 180 pacientes que se submeteram a transplante de medula, 8 apresentaram neuro-toxoplasmose

(Bleggi-Torres *et al*, 2000) e em estudo retrospectivo em 655 pacientes transplantados de medula óssea, 4% desenvolveram infecções no sistema nervoso central, sendo a encefalite por toxoplasma responsável por 74% dos casos (Maschke *et al*, 1999).

Toxoplasmose em pacientes com câncer

A toxoplasmose também tem sido freqüentemente descrita em pacientes com câncer, como linfoma e leucemia, e pacientes com tumores sólidos que estão em processo de quimioterapia, podendo estes, muitas vezes, apresentar coriorretinite associada com encefalite, além de problemas em outros órgãos como fígado, baço, pâncreas, rins, medula óssea, músculos, adrenal e linfonodos (Dagher & Lucas, 1996; Israelski & Remington, 1993).

Prevalência da toxoplasmose humana

A infecção pelo *T. gondii* é comum entre os seres humanos e a sua prevalência varia amplamente de país para país (Dubey & Beattie, 1988). Vários fatores influenciam na epidemiologia da toxoplasmose, como clima, hábito alimentar, o consumo de carnes cruas ou mal cozidas e condições de higiene (Amato Neto, 1995). Nos Estados Unidos e Reino Unido estima-se que cerca de 16 a 40% das pessoas são infectadas, enquanto que, na América Central, do Sul e continente europeu, estas estimativas de infecção variam entre 50 a 80% (Dubey, 1993). Em estudos recentes nos EUA demonstraram que a soro-prevalência da toxoplasmose varia de acordo com as regiões,

sendo de no nordeste de 29,2%, no sul 22,8%, no meio-oeste 20,5% e no oeste 17,5% (Jones *et al*, 2001). No Brasil estima-se que cerca de 60% da população já tenha sido infectada até a idade adulta (Guimarães *et al*, 1993). A soro-prevalência detectada no Ceará, Brasil, variou com a idade: de 2 a 9 anos: 40.0%; 10-19 anos: 60.4%; 20-29 anos: 73,4%; e 30-39 anos: 70,3% (Rey & Ramalho, 1999).

Toxoplasmose em animais

A maioria dos mamíferos pode ser infectada pelo *T. gondii*, existindo até relatos de mamíferos marinhos, como golfinhos e baleias, parasitados, sendo encontradas formas do parasita através de histologia (Inskeep *et al*, 1990; Mikaelian *et al*, 2000). Em cavalos a taxa de infecção foi 13,1% na Argentina (Dubey *et al*, 1999), em camelos foi 17,4% e em jumentos 65,5% no Egito (Hilali *et al*, 1998; El-Ghaysh, 1998).

Os animais utilizados para consumo humano também são atingidos pelo parasita, podendo ser fontes de infecção ou causar prejuízos econômicos nas criações. As ovelhas são susceptíveis a infecção pelo *T.gondii*, sendo que estes animais podem sofrer abortos ou mortes neonatal (Buxton, 1998), tornando a toxoplasmose um importante problema econômico na criação destes animais, devido aos prejuízos causados nos criadouros, principalmente na Nova Zelândia e Inglaterra (Dubey & Sharma, 1980). No Uruguai, a perda durante a gestação dos animais é de 1,4-3,9% com um prejuízo financeiro em torno de US\$ 1,4-4,7 milhões de dólares para o país (Freyre *et al*, 1999). No Brasil, inquéritos realizados no Estado da Bahia demonstraram que de um total

de 240 amostras, 18,75% foram positivas (Gondim *et al*, 1999), em animais de Uruguaiana (RS) e Bragança Paulista (SP) destinados ao consumo no município de São Paulo houve 39% de animais soropositivos (Larsson *et al*, 1980). Nas cabras a doença é mais severa do que em ovelhas (Dubey & Beattie, 1988) e os animais podem morrer de enterite e encefalite causada pelo *T.gondii*, cistos podem permanecer durante toda a vida dos caprinos, sendo que, nos animais naturalmente ou experimentalmente infectados, foram localizados em músculo esquelético, coração, diafragma, fígado, rins e cérebro (Dubey, 1987). Nos EUA em estudos realizados de 1982 a 1984 demonstraram que 22,1% das cabras são infectadas (Dubey & Adams, 1990), em Uganda (África) a soro-prevalência é de 31% (Bisson *et al*, 2000). No Brasil, Estado da Bahia, 28,93% das amostras de soro analisadas apresentavam anticorpos específicos para *T. gondii* (Gondim *et al*, 1999). A toxoplasmose em suínos foi descrita em diversos países, a mortalidade ocorre principalmente em animais jovens e as manifestações clínicas mais frequentes são pneumonia, miocardite, encefalite e necrose da placenta (Dubey, 1993) podendo provocar também abortos ou natimortos (Chang *et al*, 1991). A carne suína representa uma fonte de risco significativa de contaminação humana no Brasil (Camargo *et al*, 1995). Em trabalho recente realizado por nosso grupo, com amostras de animais do Brasil e Peru, foram encontrados respectivamente 9,6 e 32,3% dos animais analisados apresentando anticorpos anti-*T. gondii* (Suaréz-Aranda *et al*, 2000). No gado o *T.gondii* invade as células e forma cistos, mas estes não persistem por muito tempo nos tecidos, pois estes animais são relativamente resistentes a toxoplasmose em relação a outros animais (Dubey, 1986). Inquérito sorológico recente, realizado no estado da Bahia, demonstrou que 1,03% do

gado e 3,85% dos búfalos apresentavam anticorpos anti-*T. gondii* (Gondin *et al*, 1999).

O *T. gondii* é capaz de infectar inúmeras espécies de aves, inquéritos sorológicos realizados em frangos na Índia, mostraram que 39,5% dos animais apresentavam anticorpos contra *T. gondii* (Devada *et al*, 1998) e infecções experimentais nestes animais mostraram o parasita em diversos órgãos, como cérebro, pâncreas, baço, retina, fígado e coração (Kaneto *et al*, 1997). Toxoplasmose foi diagnosticada em perus selvagens de diversas regiões dos Estados Unidos, mostrando que a prevalência de anticorpos é de 10% (Quist *et al*, 1995). Outros grupos de aves como pombos (Biancifiori *et al*, 1986), codornas do Japão (Dubey *et al*, 1994a) e faisões (Dubey *et al*, 1994b) também demonstraram ser susceptíveis a infecção, quando experimentalmente inoculados. A prevalência de *T. gondii* em aves de rapina (falcões, gaviões e corujas) foi de 26,7%, utilizando a técnica de digestão ácida em porções do músculo e coração destes animais para a procura de cistos (Lindsay *et al*, 1999).

Ciclo de vida

Esse agente apresenta um ciclo vital complexo com múltiplos hospedeiros (Figura 1). Os felinos, em geral, são os hospedeiros definitivos de *T. gondii* (Frenkel *et al*, 1970). Os parasitas reproduzem-se sexualmente nas células epiteliais do intestino desses animais liberando oocistos em suas fezes, os quais apresentam estrutura muito resistente, podendo sobreviver meses ou

até um ano em condições ambientais severas ou, ainda, resistir a agentes químicos, como o cloro (Dubey, 1991), e físicos, como doses de radiação menores que 500 Gy (Dubey *et al*, 1998a). Em estudos experimentais, oocistos foram mantidos em condições de refrigeração (4° C) até 11 semanas, mesmo assim, foram capazes de infectar camundongos (Lindsay *et al*, 2002).

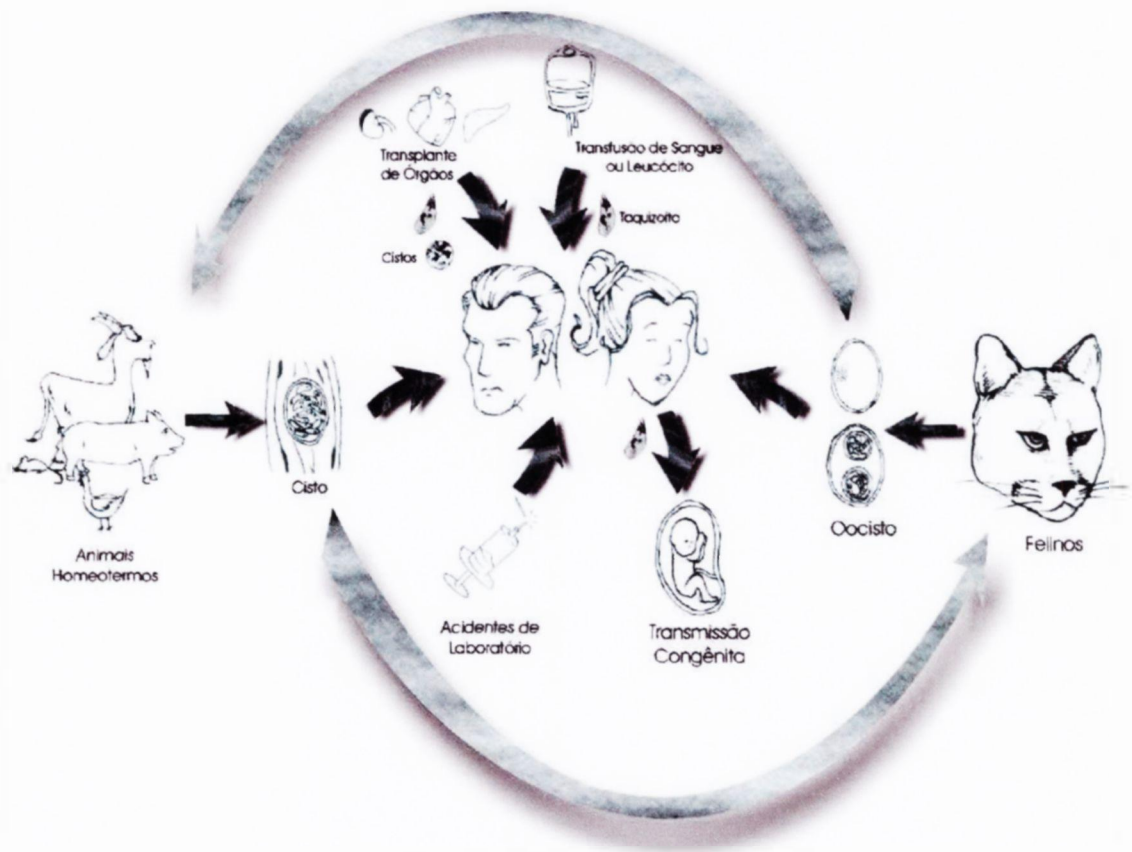


Figura 1 – Ciclo do *Toxoplasma gondii* mostrando os hospedeiros definitivos (felinos), hospedeiros intermediários e as vias de contaminação humanas (Roberto M. Hiramoto & Andrés J. Galisteo Jr.).

Quando os animais de sangue quente (hospedeiros intermediários) ingerem alimentos ou água contaminados com oocistos, estes liberam esporozoítos,

que se multiplicam nas células do intestino formando os taquizoítos, estruturas que são muito similares entre si, exceto pela abundância de micronemas, roptrias e grânulos de amilopectina presentes nos esporozoítos (Dubey *et al*, 1998b). Os taquizoítos (Figuras 2 e 3) apresentam diversas organelas características do filo, os anéis polares, conóide, roptrias, micronemas, além das estruturas comuns às demais células animais, como mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi. Essas formas de multiplicação rápida atingem o restante do corpo por meio do sangue e da linfa, multiplicando-se assexuadamente no interior das células (Figura 4) por repetidas endodiogenias, processo pelo qual ocorre formação de dois indivíduos – filhos dentro do citoplasma da célula da mãe, a divisão celular. Após a duplicação do DNA no núcleo, inicia-se a construção das células filhas pela região do conóide que duplica, segue para as roptrias, aparelho de Golgi, núcleo e finalmente são geradas duas células filhas (Dubey, 1991). A multiplicação continua até a ruptura da célula hospedeira, quando os organismos são liberados para invadir outras células. Este processo continua até o desenvolvimento de imunidade contra o parasita.

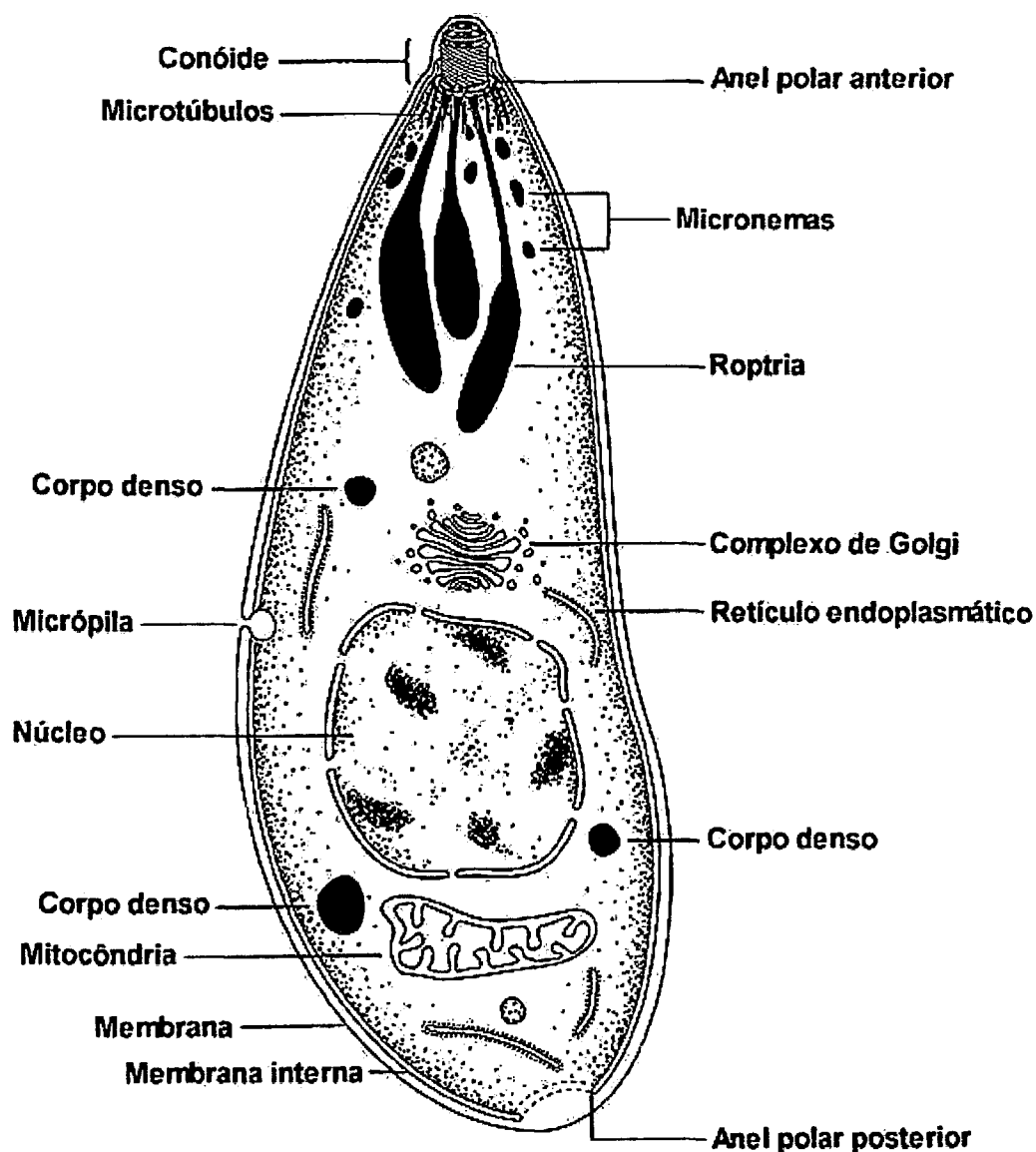


Figura 2 – Morfologia esquemática de taquizoíto de *T. gondii*. Conóides e roptrias estão envolvidos nos processos de invasão celular (Beaman *et al*, 1995).

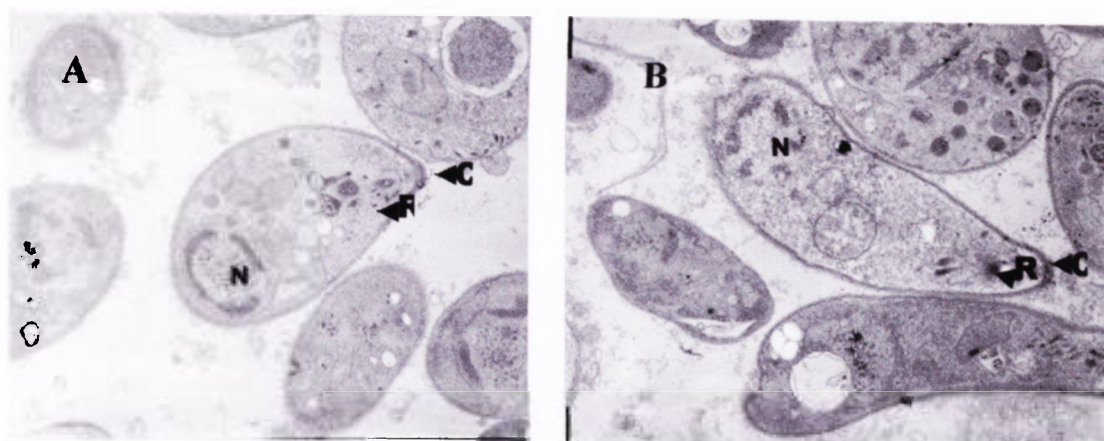


Figura 3 - Reprografia computadorizada de micrografia eletrônica de taquizoitos de *T. gondii* cepa RH (A e B). Pode se observar o (N) núcleo e as estruturas associadas com o processo de invasão celular: (C) conóide e (R) roptria.

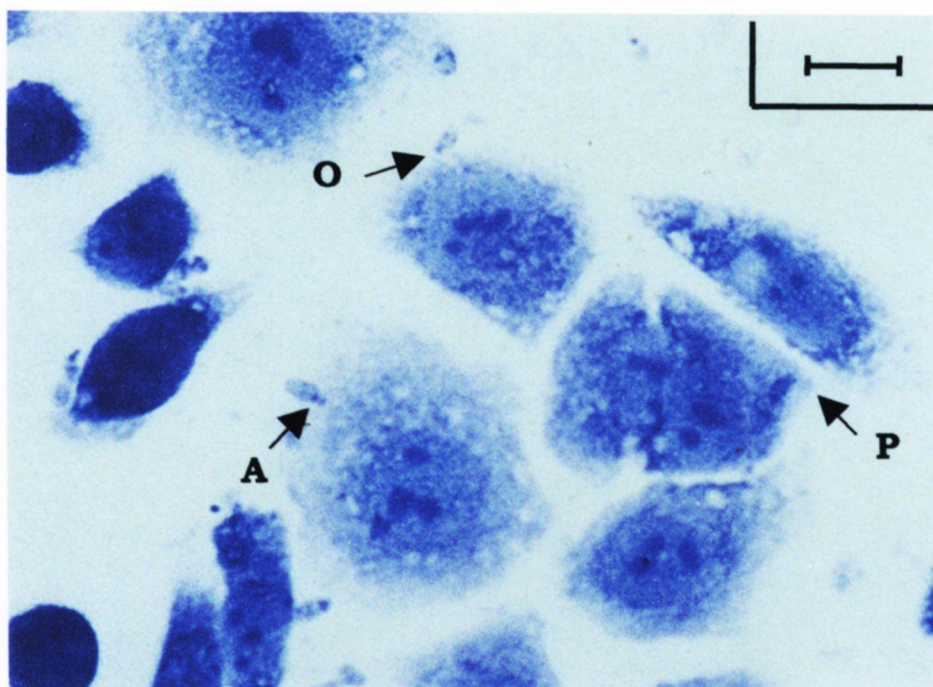


Figura 4 – Reprografia computadorizada de células LLC-MK2 desafiadas com taquizoitos de *T. gondii* durante 4 horas, coradas com GIEMSA. A barra representa 16μm. (A) adesão, (O) orientação e (P) penetração.

Com o desenvolvimento de uma resposta imune humoral ocorre a lise de taquizoítos extracelulares, por meio de uma combinação de anticorpos e complemento (Beaman *et al*, 1995), porém alguns parasitas intracelulares podem persistir por algum tempo na medula espinal ou no cérebro, pois a imunidade é menos efetiva nos órgãos neurais que nos tecidos viscerais (Dubey, 1993). Embora a resposta imune seja eficiente no controle da infecção aguda, alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira, desenvolvem-se mais lentamente formando os bradizoítos (formas de multiplicação lenta) e geram um vacúolo contendo um cisto tecidual (Dubey, 1993). O parasita é isolado do resto da célula, pois não ocorre fusão com qualquer outra vesícula celular, protegendo assim o *T. gondii* dos sistemas de destruição (Janeway & Travers, 1997).

Os cistos (Figura 5) podem desenvolver-se em órgão viscerais, incluindo pulmões, baço e fígado, mas estes são mais prevalentes nos tecidos neurais e musculares, incluindo o cérebro, olhos, músculo esquelético e cardíaco (Dubey & Beattie, 1988). Os cistos intactos provavelmente não causam nenhum dano e podem persistir por longos períodos ou por toda a vida do hospedeiro sem causar a este nenhuma resposta inflamatória ou despertar resposta tecidual significativa (Duarte & Andrade Jr., 1994). O destino dos cistos teciduais não é totalmente conhecido, mas se propõe que às vezes estes possam se romper durante a vida, liberando os bradizoítos que podem ser destruídos pelo sistema imune ou formar novos cistos (Dubey, 1993).

A ingestão de carne crua ou mal cozida, contendo cistos de *T. gondii* infecta os hospedeiros carnívoros, incluindo o homem. O ciclo se completa quando os felinos ingerem carnes destes hospedeiros intermediários contendo

cistos teciduais. A parede do cisto é dissolvida por enzimas proteolíticas, no intestino delgado e os bradizoítos liberados são capazes de penetrar nas células epiteliais do intestino. Os toxoplasmas passam então por diversos estágios antes da gametogênese. Os gametócitos desenvolvem-se nas células epiteliais e dão origem aos microgametas e macrogametas, a fertilização entre os dois resulta na formação de oocistos que são então excretados nas fezes dos felinos (Dubey, 1993).

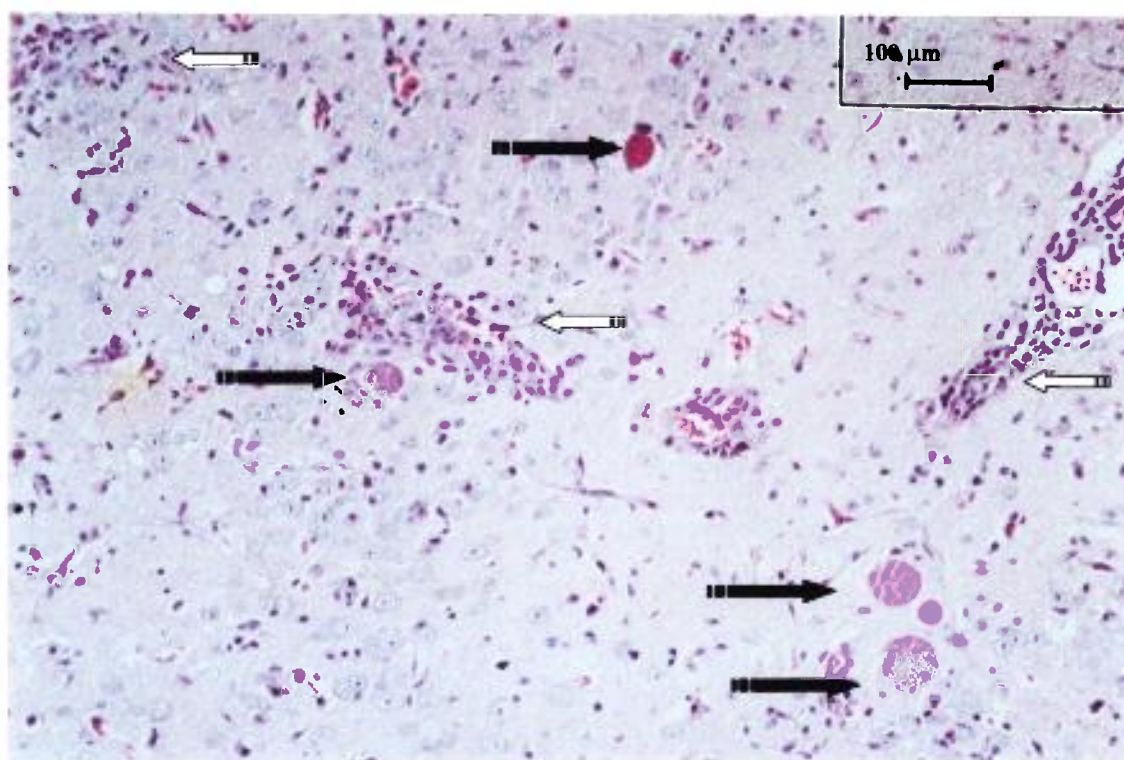


Figura 5 - Reprografia computadorizada de micrografia de corte de cérebro de camundongo C57Bl/6j infectado experimentalmente com cistos de *T. gondii* cepa ME-49. As setas negras mostram cistos teciduais; as brancas, encefalite.

Fontes de infecção humana

O parasita pode ser transmitido ao homem principalmente por três vias, pela ingestão de alimento e água contaminada com oocistos provenientes de fezes de felinos infectados, pela ingestão de carne e derivados mal cozidos contendo cistos teciduais e ingestão de leite e derivados (Dubey & Bettie, 1988; Hiramoto *et al*, 2001; Warnekulasuriya *et al*, 1998). Outra fonte de infecção humana pode ser através de acidentes de laboratório, pessoas que trabalham com cistos teciduais, fezes de felinos, organismos em cultura, ou inoculando animais podem se infectar pelo *T. gondii* e apresentar doença grave (Herwald & Juranek, 1993).

Estudos recentes para se detectar as fontes de infecção pelo *T. gondii* em grávidas na Europa demonstraram que entre 30 e 63% das infecções em diferentes locais foram atribuídos ao consumo de carne crua, mal cozida, defumada ou seca e 6 a 17% ao contato com o solo contaminado (Cook *et al*, 2000). A soro-prevalência também foi avaliada em Adventistas do Sétimo Dia, pois se trata de um grupo que não consome carnes e como controle foram utilizados voluntários da mesma região que não pertencem a religião, nos adventistas foram encontrados 24% de infectados e no grupo controle 50%, mostrando o papel significativo da carne e derivados na infecção pelo *T. gondii* (Roghmam *et al*, 1999).

Os surtos de toxoplasmose aguda não são comuns, mas existem relatos de infecções em grande número de pessoas no Panamá, Carolina do Norte (EUA) e Columbia Britânica (Canadá), que foram associados à ingestão de oocistos presentes na água (Benenson *et al*, 1982; Bowie *et al*, 1997). Pequenos surtos de toxoplasmose aguda foram associados com a ingestão de carne crua de gado ovino e carne de suínos (Bonametti *et al*, 1997; Choi *et al*, 1997).

Tratamento

O tratamento para a toxoplasmose é baseado em inibidores da síntese de ácidos nucleicos, como a sulfa e pirimetamina, apesar destas drogas apresentarem alto grau de mielotoxicidade (Koskiniemi *et al*, 1989). Embora o tratamento consiga controlar as formas de rápida proliferação, não existe nenhuma droga que consiga eliminar os cistos teciduais latentes em humanos e animais, e estes se mantêm viáveis por longos períodos podendo reativar a infecção (Beaman *et al*, 1992; Winstanley, 1995). A administração de drogas é necessária para o tratamento de toxoplasmose sintomática, prevenção da transmissão fetal ou quando ocorre a reativação do parasita (Derouin, 2001).

Aspectos gerais da imunidade

A resposta imune desencadeada pelo *T. gondii* envolve mecanismos celulares e humorais, sendo a imunidade mediada por células um dos maiores mecanismos para controlar a infecção pelo *T. gondii*. Diversas citocinas foram encontradas em enterócitos infectados, mas IFN- γ parece ser o maior mediador de resistência contra o parasita, ativando os enterócitos e inibindo a replicação do parasita (Liesenfeld, 1999). A infecção induz a produção de altas quantidades de anticorpos contra o parasita, no sangue e intestino. Anticorpos IgA contra o *T. gondii* podem ser detectados em secreções do intestino e leite. Foi demonstrado que os anticorpos IgA humanos são capazes de reduzir a infecção em enterócitos *in vivo* (Boult *et al*, 1999).

Nos hospedeiros intermediários, após a infecção das células epiteliais do intestino, aparecem os taquizoítos, que se multiplicam rapidamente por seguidas endodiogenias, inclusive no interior dos macrófagos, impedindo a fusão dos fagolisossomos (Jones & Hirsch, 1972). Se não controlados os taquizoítos podem causar toxoplasmose generalizada, que pode ser fatal. Foi demonstrado que cepas avirulentas tornam-se altamente virulentas em animais deficientes de linfócitos T, e que a imunidade mediada por estas células é importante no controle dos taquizoítos e na sobrevivência dos hospedeiros intermediários (Gazzinelli *et al*, 1993a).

Interferon gama (IFN- γ): produzido por linfócitos T (Th1) e células NK ("Natural killers") é um importante mediador da resistência para a infecção contra *T. gondii*, tendo inclusive papel na prevenção da ruptura de cistos e encefalite, pois a neutralização desta citocina usando anticorpos monoclonais durante a infecção crônica leva a reativação de cistos e morte dos camundongos, mesmo a infecções com cepas avirulentas (Suzuki *et al*, 1989). Sem IFN- γ camundongos não são capazes de sobreviver da infecção aguda com as cepas ME-49 e ts-4 (Scharton-Kersten *et al*, 1996). A administração de IFN- γ recombinante pode proteger camundongos contra desafios com cepas virulentas de *T. gondii* (McCabe *et al*, 1984) e diminuir a gravidade da encefalite em camundongos susceptíveis (Suzuki & Remington, 1990). Estudos demonstraram que IFN- γ recombinante de ovinos pode inibir a multiplicação em fibroblastos e macrófagos alveolares de ovinos (Oura *et al*, 1993). Astrócitos de camundongos foram tratados antes da infecção com IFN- γ resultando em 65% de inibição no crescimento do *T. gondii*, e quando esta citocina foi combinada com TNF- α , IL-1 ou IL-6 levou a inibição de 75 a 80% no crescimento do parasita (Halonen *et al*, 1998).

Interleucina-12 (IL-12): essencial para estimular as células NK a sintetizarem IFN- γ e os macrófagos são sua principal fonte. Em camundongos SCID (deficientes em células T), esta interleucina induziu a produção de IFN- γ , o que conferiu imunidade não específica contra o *T. gondii* (Gazzinelli *et al*, 1993b). Quando IFN- γ endógeno está ausente, camundongos mantêm a produção de IL-12, mas não conseguem controlar a infecção aguda pelo *T. gondii* (Scharton-Kersten *et al*, 1996). IL-12 estimula células a produzirem

baixos níveis de IFN- γ , mas para que haja produção de altos níveis existe a dependência adicional de outros co-fatores.

Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α): a infecção pelo *T. gondii* induz os macrófagos a produzirem TNF- α e IL-12, estes dois fatores em sinergia induzem as células NK a produzirem IFN- γ (Gazzinelli *et al*, 1993b). Em populações de células NK purificadas, TNF- α isolado não é suficiente para iniciar a produção de IFN- γ (Sher *et al*, 1993); e em esplenócitos de camundongos SCID a indução desta citocina é dependente de IL-12 e IL-1 (Alexander & Hunter, 1998). Outros estudos *in vitro* demonstraram que o TNF- α aumenta a atividade dos macrófagos contra o *Trypanosoma cruzi*, mas não contra o *T. gondii* (De Titto *et al*, 1986). Chang e colaboradores (1990) demonstraram que o TNF- α tem papel significativo na proteção de camundongos Swiss, pois animais desafiados com dose letal da cepa C56 de *T. gondii* são protegidos quando tratados com TNF- α e IL-1 recombinantes e camundongos inoculados com taquizoítos da cepa RH liberam TNF- α no soro.

Interleucina-10 (IL-10): produzida por linfócitos CD4⁺ (Th2), responsável pela inibição da síntese de IFN- γ das células NK e células T, sendo um importante modulador das funções efetoras dos macrófagos contra diferentes patógenos, inclusive o *T. gondii* (Fiorentino *et al*, 1991; Gazzinelli *et al*, 1992). IL-10 inibe a síntese de IFN- γ pelas células NK e linfócitos Th1, inibindo a síntese de IL-12 dos macrófagos (D'Andrea *et al*, 1993). A indução de IL-10 pode ser uma importante estratégia pela qual o parasita se evade da resposta imune celular dependente de IFN- γ (Gazzinelli *et al*, 1992).

Além das citocinas descritas acima, outras podem participar da resposta

imune contra o *T. gondii*, como: IL-1, IL-2, GM-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócios e monócitos), IL-4 e IL-5 (Beaman *et al*, 1992).

A imunidade mediada por células (CMI) fornece uma maior defesa contra doenças infecciosas e o *T. gondii* induz uma potente resposta CMI, que leva a resistência do hospedeiro (Gazzinelli *et al*, 1993a). A capacidade para resistir a desafios com taquizoítos virulentos após vacinação depende de linfócitos T (principalmente CD8⁺) e IFN- γ . No entanto, as células B e anticorpos são componentes importantes da resistência adquirida e podendo bloquear a infecção das células hospedeiras pelos taquizoítos (Sayle *et al*, 2000). Anticorpos específicos na presença de complemento podem lisar os taquizoítos extracelulares (Schreiber & Feldman, 1980) e a transferência passiva de soro imune (Pavia, 1986) ou anticorpo monoclonal (Johnson *et al*, 1983) conferem proteção parcial contra a infecção.

Na instalação de uma imunidade protetora contra a fase aguda e na manutenção da fase crônica, o papel dos anticorpos foi avaliado usando camundongos deficientes de células B, infectados com cepa virulenta e tratados com sulfadiazina. Quando o tratamento foi suspenso, todos os animais morreram com miocardite, pneumonia e encefalite, sugerindo a importância dos anticorpos produzidos pelas células B no controle da infecção latente (Frenkel & Taylor, 1982). Recentemente, camundongos deficientes de células B foram inoculados com cistos da cepa ME-49 e todos os animais morreram entre a 3^a e 4^a semanas após a infecção, mas quando receberam anticorpos policlonais anti-*T. gondii* produzidos em coelho, havia redução da mortalidade, diminuição da patologia no cérebro e aumento da sobrevivência, demonstrando o papel importante das células B (Kang *et al*, 2000).

Vacinas

Até o momento não existe nenhuma vacina comercial para a toxoplasmose humana, que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (Gottstein, 1995). Foram testados diversos esquemas de imunização contra o *T.gondii* em animais, utilizando DNA, proteínas recombinantes e cepas mutantes (Araujo, 1994). Existe uma única vacina comercial (Toxovax) para uso em ovelhas, que foi desenvolvida na Nova Zelândia, sendo utilizada também no Reino Unido e Eire. A vacina utiliza taquizoítos vivos da cepa S-48, que não persistem nos tecidos dos animais. Desafios experimentais com oocistos em ovelhas prenhes demonstraram que 18% das crias nascem vivas e viáveis, no entanto quando os animais são vacinados esta taxa aumenta para 75% (Buxton, 1993).

Escajadillo e Frenkel (1991) utilizaram a cepa não persistente (que não formam cistos) de *T.gondii* ts-4 como vacina em macacos (*Aotus lemurinus*) e nos testes de segurança da imunização os animais apresentaram febre e inflamação local e um deles morreu de infecção disseminada. O índice de sobrevivência nos animais vacinados e desafiados com outras cepas (T265 e T163) foi de apenas 19% e quando a imunização foi realizada em fêmeas gestantes houve casos de abortos e lesões oculares. Apesar de cepas não persistentes não produzirem cistos, elas são taquizoítos patogênicos vivos e podem causar danos ou até mesmo levar a morte os organismos susceptíveis, como foi demonstrado em marsupiais Australianos (Lynch *et al*, 1993).

Outros modelos de imunizações utilizando parasitas vivos, de baixa patogenicidade, foram testados experimentalmente, mas pelo fato dos

indivíduos permanecerem infectados durante muito tempo, possivelmente até o fim da vida, não se pode descartar a possibilidade do hospedeiro ter uma perda da imunidade, causando reativação da infecção e conseqüentemente lesões graves. A imunização com parasitas mortos também foi testada em ovelhas, mas a imunidade apresentada foi de curta duração, demonstrada pelo desafio com cepas patogênicas (Wandeland & Frenkel, 1983), mesmo utilizando adjuvante incompleto de Freund, sem proteção dos animais contra novos desafios (Buxton, 1993).

Várias tentativas de definir uma fração antigênica estável e imunizante foram tentadas, com antígenos particulados (Krahenbuhl *et al*, 1972) ou proteínas purificadas de membrana, como a p30 ou SAG-1 (Grimwood & Smith, 1996), mas com resultados erráticos e por vezes com piora do sistema de defesa ao agente.

As dificuldades de obtenção de massa de antígeno levaram a modelos de produção de proteínas recombinantes, na busca de antígenos majoritários detectados no soro de pacientes. Inicialmente, a proteína p30 majoritária da membrana foi escolhida como alvo, com alguns bons resultados iniciais (Darcy *et al*, 1992), mas a produção de anticorpos monoclonais contra esta proteína mostrou que apenas alguns destes anticorpos eram eficientes na produção de bloqueio da infecção, sugerindo que epítomos conformacionais ou específicos eram de importância capital na indução da proteção (Velge-Roussel *et al*, 1994). Outros modelos de construção de proteínas híbridas, para melhorar a imunogenicidade apresentaram resultados contraditórios (Lunden, *et al*, 1997), provavelmente pela necessidade de uma resposta conformacional específica tanto celular como humoral (Khan *et al*, 1988). Estes fenômenos imunológicos

sugerem que a melhor imunização é aquela que possa oferecer os antígenos mais semelhantes ao agente original. O *T.gondii* penetra nas células ativamente pelo uso de suas organelas do complexo apical e liberando a membrana externa de seu invólucro trilamelar (Kasper & Mineo, 1994). Sua penetração se dá em células de diferentes tecidos, com diferentes capacidades de processamento e apresentação de antígenos (Abbas, 1995). A mera inoculação de antígenos ou agentes mortos suscita a resposta local de células inflamatórias no sítio, com conseqüente resposta imune local, reagindo a todos os antígenos do agente, de forma inespecífica ou com resposta alterada a antígenos purificados. Já a liberação de antígenos durante o processo de penetração leva a uma resposta muito mais específica, levando em consideração todos os epítomos conformacionais dos produtos e com uma resposta quantitativa muito diferente, com maior eficiência.

Radiação Ionizante

A radiação ionizante foi utilizada para verificar a infectividade de cistos de *T. gondii*, cérebros de camundongos previamente infectados as cepas NT, TS-2 ou ME-49 foram homogeneizados em solução salina, irradiados a doses de 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 ou 1.00 kGy em uma fonte de Cobalto-60 e inoculados (i.p.) em camundongos e gatos jovens, e os resultados demonstraram que a dose mínima efetiva de raios γ que controla a infectividade de cistos de *T. gondii* cepa NT foi 0.55 kGy, enquanto para as cepas ME-49 e TS-2 foi de 0.60 kGy (Song *et al*, 1991; Song *et al*, 1993). Dubey e Thayer (1994) irradiaram

cortes de cérebro de camundongos infectados com cistos de *T. gondii* (ME-49, GT-1, CT-1 e TG-3) com radiação γ de uma fonte de ^{137}Cs e verificaram que todas as cepas perdem a viabilidade a doses de 0.4 kGy. Músculos da língua, coração e membros de porcos previamente inoculados com oocistos de *T. gondii* foram irradiados com doses de 100, 200, 250 ou 300 Gy em fontes de ^{60}Co e ^{137}Cs e inoculados em gatos, os animais que foram inoculados com músculos irradiados a 250 e 300 Gy não liberaram oocistos em suas fezes (Dubey *et al*, 1996). Estes autores não encontraram nenhuma diferença entre ^{60}Co e ^{137}Cs na capacidade de tornar os cistos de *T. gondii* inviáveis.

Os efeitos da radiação γ de fonte de ^{137}Cs em oocistos de *T. gondii* também foram analisados, grupos de camundongos foram inoculados com oocistos da cepa VEG irradiados a 200, 400, 500, 600 ou 800 Gy, demonstrando que doses de 500 Gy são efetivas para tornar inviáveis oocistos de *T. gondii* em vegetais e frutas e muito provavelmente de outros coccídeos como, *Cryptosporidium sp* e *Ciclospora sp* (Dubey *et al*, 1998a).

Além da esterilização de alimentos, uma solução para a produção de vacinas seria através da utilização da radiação ionizante (Dubey & Thayer, 1994), a qual pode causar danos diretos ou indiretos sobre as moléculas dos seres vivos. Nos danos diretos, ocorre transferência da energia para a molécula alvo, provocando ionização, alteração da estrutura química e conseqüentemente efeito na função biológica. Nos danos indiretos, ocorre interação da radiação gama com moléculas do meio, principalmente água, molécula mais encontrada nos sistemas biológicos, formando hidrogênio molecular (H_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e vários radicais livres, como hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), elétron aquoso (e^-_{aq}), átomo de hidrogênio ($\text{H}^\bullet$) e peroxila

(HO₂^{*}). Os mesmos podem interagir com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos deletérios da radiação. Os ácidos nucléicos (DNA) e as proteínas são as principais moléculas afetadas, no entanto, a atividade enzimática e função da membrana celular podem ser alteradas (Wales & Kusel, 1992). A radiosensibilidade depende da linhagem celular, fatores físicos, químicos e biológicos, podendo a morte ser por necrose ou apoptose (Szumiel, 1994).

Linfócitos humanos apresentam apoptose radio-induzida e dose dependente (Lemes *et al*, 1997). Além destes fenômenos sobre os processo reprodutivos dos agentes ou indução de morte fisiológica, alguns fenômenos relacionados a alterações de proteínas induzidas pela radiação diretamente ou através de radicais de correntes da radiólise da água são sugestivos de uma melhor resposta imunológica (Pinho *et al*, 1995). Tal fato provavelmente decorre da oxidação das proteínas, levando a uma fagocitose preferencial por células imunes, através de receptores específicos (Cardi *et al*, 1998).

A bioquímica de diversos parasitas irradiados foi estudada com o objetivo da produção de vacinas (Wales & Kusel, 1992). Ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni* isolados de fezes humanas foram irradiadas com Cobalto-60 a doses de 5 a 2.000 Gy, os ovos irradiados a doses de 100 a 2.000 Gy ou os miracídios a doses de 10 a 500 Gy, penetravam nos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) e não conseguiam se desenvolver, entretanto quando a dose utilizada foi de 5 Gy, 3,2% dos caramujos desenvolveram a infecção, mas a maioria de *B. glabrata* imunizados com miracídios irradiados e desafiados com miracídios normais apresentavam infecção (Antunes *et al*, 1971). Quando camundongos são imunizados com cercarias irradiadas (150 a 200 Gy) a carga

de vermes de uma infecção desafio tem sido reduzida em até 90%, quando comparado com camundongos não vacinados (Richter *et al*, 1995). O envolvimento dos anticorpos na resposta imune foi demonstrado quando anticorpos foram transferidos de animais vacinados para normais, aumentando a resistência dos camundongos a desafios, a resposta imune celular também auxilia na resistência, pois animais sem o timo não conseguem desenvolver proteção quando são vacinados com cercarias irradiadas (Richter *et al*, 1995). Cercarias de *Schistosoma japonicum* irradiadas com doses de 100, 200, 300, 400 e 500 Gy induziram proteção de 34-46% nos animais contra desafios com parasitas viáveis (Zhang *et al*, 1999).

Utilizando *Trypanosoma cruzi* irradiados como inóculo em camundongos, foi observado que a inibição da infectividade era dependente da dose de radiação, do poder infectante da cepa, da via de inoculação e do número de organismos inoculados (Martinez-Silva *et al*, 1969). Entretanto, outros autores observaram que não houve proteção quando camundongos, que receberam parasitas irradiados, eram inoculados com formas sangüíneas virulentas não irradiadas (Salata *et al*, 1973). Camundongos foram imunizados com 3 doses de (1×10^8 parasitas/animal) *Trypanosoma cruzi* irradiado (epimastigota, metacíclicos ou formas sangüíneas) a 3.0 kGy em uma fonte de ^{60}Co e desafiados com 1×10^2 metacíclicos de *Triatoma infestans*, todos os animais apresentaram diminuição e redução da parasitemia (Okanla *et al*, 1982). Em estudos realizados com *Trypanosoma brucei*, bovinos foram imunizados com parasitas irradiados a 600 Gy em uma fonte de ^{137}Cs , demonstrou-se que 10^7 ou mais parasitas irradiados conferem proteção completa contra desafios com 10^3 parasitas normais (Morrison *et al*, 1982).

Nos plasmódios, parasitas causadores da malária, também pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de indivíduos com esporozoítos irradiados foram capazes de induzir proteção parcial contra esporozoítos normais, mas falhou em proteger os indivíduos quando formas merozoíticas ou eritrocíticas foram utilizadas como desafio (Nussezeiwig *et al*, 1969). O soro de símios imunizados com esporozoítos irradiados apresentou atividade inibitória contra o *Plasmodium vivax* (Millet *et al*, 1991). Esporozoítos de *Plasmodium berghei* foram irradiados, criopreservados e posteriormente inoculados em camundongos, que apresentaram altos índices de proteção quando desafiados com esporozoítos normais (Orjih & Nussenzweig, 1980). Em relato recente, os esporozoítos irradiados foram capazes de invadir as células hepáticas e transformar-se em trofozoítos, mas com degeneração após esta fase, gerando uma imunidade no hospedeiro semelhante à doença natural (Scheller *et al*, 1995). Chatterjee e colaboradores (1996) imunizaram camundongos com 3×10^4 esporozoítos de *Plasmodium berghei* irradiados a 120 ou 200 Gy a cada duas semanas (3 doses no total) e posteriormente desafiaram os animais com 100 esporozoítos viáveis, todos os camundongos imunizados com esporozoítos irradiados a 120 Gy mostraram completa proteção, enquanto no grupo imunizado com parasitas irradiados a 200 Gy houve o aparecimento de formas sanguíneas. Quando voluntários humanos foram imunizados com esporozoítos de *Plasmodium falciparum* irradiados a 150 Gy em uma fonte de ^{60}Co , estes desenvolveram anticorpos e foram protegidos contra malária transmitida através de mosquitos (Egan *et al*, 1993). Gilbert e colaboradores (1998), expuseram *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia) a 0, 50 100, 150 ou 200 Gy de radiação-gama de uma fonte de ^{60}Co e demonstraram que a radiação provocou

danos nos mecanismos nuclear e celular de reprodução.

Dubey e colaboradores (1996) irradiaram oocistos esporulados da cepa VEG de *T. gondii* a diversas doses (100, 200, 250, 300, 400 ou 500 Gy) com radiação- γ de uma fonte de ^{137}Cs e demonstraram que camundongos inoculados oralmente não apresentavam parasitas no cérebro após dois meses, quando o inóculo era realizado com *T.gondii* irradiado com doses ≥ 250 Gy, embora estes animais desenvolvessem anticorpos anti-*T. gondii*. Camundongos oralmente inoculados com oocistos irradiados foram parcialmente protegidos quando desafiados com doses letais de oocistos não irradiados, sendo que a quantidade de cistos localizados no cérebro dos animais vacinados foi menor que nos animais controle.

Seah e Hucal (1975) irradiaram taquizoítos de *T. gondii*, cepa RH a doses de 50, 100, 150 a 200 Gy e realizaram inóculo intraperitoneal em camundongos Swiss (cepa Charles River CD-1), somente nos animais inoculados com 50 Gy houve mortalidade devido à toxoplasmose, nas doses superiores todos os animais sobreviveram e não foram encontrados cistos teciduais. Quando os autores realizaram ensaios de imunização, demonstraram que somente uma dose de parasitas irradiados oferece proteção a um subsequente desafio com parasitas virulentos, e a proteção foi de 100% nas três primeiras semanas após o desafio.

Formas proliferativas (taquizoítos) da cepa RH foram irradiadas a doses de 50, 100, 150 e 200 Gy em uma fonte de ^{60}Co e posteriormente inoculadas em camundongos SPF Swiss, mostrando que inóculo de 10^4 e 10^6 parasitas irradiados a 50 e 100 Gy resultam em morte dos animais após 10 dias, enquanto que parasitas irradiados a 150 e 200 Gy não foram capazes de

induzir a morte de nenhum animal. Quando os sobreviventes inoculados com parasitas irradiados foram desafiados com parasitas normais, a sobrevivência foi dependente da quantidade do inóculo e das doses administradas (Bakal & Veld, 1979).

Chhabra e colaboradores (1979) realizaram estudos semelhantes irradiando taquizoítos da cepa RH a doses de 0, 50, 100, 150 e 200 Gy em uma fonte de ^{60}Co com posterior inóculo (10^5 ou 10^6 parasitas/animal) em camundongos Swiss (CDRI). Nenhum dos animais inoculados com parasitas não irradiados ou irradiados a doses de 50 Gy sobreviveram. Nos animais inoculados com *T.gondii* irradiado a 100 Gy, a maioria sobreviveu ao desafio. Quando o inóculo foi de parasitas irradiados com doses superiores a 150 Gy todos os camundongos desafiados sobreviveram. Quando os animais eram inoculados com 10^6 parasitas irradiados a 150 e 200 Gy e desafiados após duas semanas com 10^4 parasitas não irradiados, a sobrevivência dos grupos de camundongos que recebeu *T.gondii* irradiado 200 Gy foi de 100%, enquanto que no grupo que recebeu *T.gondii* irradiado 150 Gy foi de 80%. Após três semanas, os resultados foram semelhantes, no entanto após 4 semanas o grupo que recebeu parasitas irradiados 200 Gy apresentou queda na sobrevivência dos animais (80%), após 6 semanas passou a 20% e após 8 semanas todos os animais morreram, sugerindo que a resposta imune induzida por estes agentes era de curta duração e necessita de aprimoramento.

É interessante notar que em todos os estudos de irradiação de parasitas, quer especificamente com *T.gondii*, quer com outros protozoários ou helmintos, pouco se fez sobre a ação da radiação sobre a morfologia, metabolismo ou fisiologia do agente. Essa lacuna é comentada brevemente em

alguns trabalhos, mas seu conhecimento é essencial para uma imunização adequada.

Apesar destes estudos promissores, a otimização do processo de irradiação não foi efetuada, com pouco interesse sobre o estudo deste processo no agente, sendo que não foi encontrado nenhum trabalho sobre as alterações e a viabilidade dos taquizoítos de *T.gondii* após a irradiação, nem estudos sobre o mecanismo de ação da radiação sobre estes parasitas. A compreensão destes mecanismos pode oferecer novas abordagens para a produção de imunógenos eficientes, por apresentarem o mesmo tipo de processamento que o agente intacto, mas sem capacidade reprodutiva e conseqüente infecção.

2 - OBJETIVOS

Geral

A proposta do presente estudo foi avaliar a resposta imune celular, humoral e a proteção contra desafios orais, em camundongos, induzida por taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy de uma fonte de Cobalto-60.

Específicos

Analisar a resposta imune humoral, ao nível de anticorpos IgG específicos, nos camundongos imunizados com taquizoítos irradiados, bem com verificar a especificidades destes no reconhecimento de frações antigênicas do parasita.

Verificar se o soro de camundongos imunizados com parasitas irradiados inibe a invasão de taquizoítos em células LLC-MK2.

Investigar se os taquizoítos irradiados causam infecção ou persistem no cérebro dos camundongos imunizados.

Estudar a proteção induzida por taquizoítos irradiados em camundongos desafiados com a cepa cistogênica ME-49, analisando patologias nos órgãos e avaliando o número de cistos cerebrais.

Analisar a resposta proliferativa de esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados.

Estudar a produção de citocinas (IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α) por esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados, comparando com camundongos infectados.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Todos os sais e demais reagentes usados foram de qualidade pré-análise sendo a água utilizada purificada em sistema Milli-Q®, apresentando resistividade de 18 mega Ω . Reagentes específicos têm sua fonte citada ao longo do texto.

3.1. Parasitas

Os parasitas utilizados foram taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, que são mantidos rotineiramente no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênicos) ou C57Bl/6j (isogênicos). Os animais previamente infectados são sacrificados por asfixia em câmara de CO₂ e o peritônio lavado com solução salina ou salina tamponada com fosfato – NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS), contendo gentamicina (40 mg/ml), após contagem em câmara de Neubauer, os taquizoítos são diluídos apropriadamente, cada animal recebe 10⁷ taquizoítos, por inóculo intraperitoneal (i.p). Os parasitas são mantidos também em estabilato de nitrogênio líquido no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

T. gondii cepa ME-49 (cistogênica), fornecida gentilmente pelo Prof. Dr. R.T. Gazzinelli (UFMG) e mantida no Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Os cistos são obtidos de camundongos

C57Bl/6j ou Swiss cronicamente infectados, sacrificados por narcose em câmara de CO₂ e os cérebros macerados em solução salina ou PBS. Uma alíquota da suspensão cerebral foi examinada para contagem do número de cistos em microscopia óptica convencional e diluída apropriadamente em PBS ou solução salina, e cada camundongo recebe 10 cistos por sonda oral.

3.2. Animais experimentais

Camundongos machos isogênicos C57Bl/6J e não isogênicos Swiss, com peso entre 20 e 22g, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina/USP, sendo mantidos em gaiolas de plástico com maravalha de pinho autoclavada, recebendo ração comercial Nuvital e água *ad libitum*. Previamente a inoculação, alguns animais eram avaliados quanto à sua resposta a antígenos de *T. gondii* pelo método de Imunofluorescência Indireta (IFI), sendo utilizados lotes apenas de animais que apresentavam resposta negativa. A manipulação dos animais, antes e durante os ensaios, foi conduzida de acordo com as regras de cuidados de animais de laboratório (Clark, 1996) e com os "Princípios de Ética em Experimentação Animal" (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

3.3. 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 (Hudson & Hay, 1989), 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 peritonial foram aplicados, seguidos de lavagem com PBS estéril. As frações recolhidas eram reunidas e centrifugadas a 800 g por 10 min a 4° C e posteriormente ressuspendidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®). A preparação era 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.

3.4. Imunofluorescência indireta (IFI)

3.4.1. Antígenos

Os parasitas coletados do peritônio dos camundongos foram centrifugados a 800 g durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em formol 2% tamponado com fosfato de sódio 0,02M pH 7,2, permanecendo em estufa a 37°C por 12 horas. A seguir, o material foi novamente centrifugado a 800 g, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em PBS contendo 1% de gelatina para uma concentração de 10⁶ parasitas/ml. Em lâminas limpas, era adicionado 10µl (10000 parasitas) do preparado em cada orifício da lâmina de imunofluorescência. Após secagem

cuidadosa, as lâminas eram envoltas isoladamente em papel alumínio, colocadas em caixas seladas e mantidas a -20°C até o momento do uso.

3.4.2. Descrição da reação

A reação foi realizada segundo Camargo & Leser (1976), com antígeno de *T. gondii* para pesquisa de anticorpos da classe IgG. Em todos os testes utilizamos controles positivos (soro de camundongo inoculado com *T. gondii* e tratado com pirimetamina e sulfadiazina) e negativos (soro normal de camundongo); o eluato do papel foi considerado uma diluição 1/100.

A diluição do soro foi depositada em cada orifício da lâmina de fluorescência, aquecida e reidratada previamente em PBS, contendo taquizoítos formolizados e aderidos; seguiu-se incubação em câmara úmida por 30 minutos a 37°C . Após a primeira incubação, as lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS por 10 minutos. Em seguida, cada orifício foi recoberto com soro anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína-FITC, 1/500, diluído em solução de Azul de Evans 0,01% em PBS; com incubação a 37°C , ao abrigo da luz, por 30 minutos. As mesmas foram novamente lavadas 2 vezes em PBS por 10 minutos, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas com preservativo (Glicerol-PBS 9:1 contendo 1 mg/ml de p-fenilenodiamina) sob lamínula para observação. A observação era feita em microscópio de epifluorescência com lâmpada de mercúrio de 100 V, com sistema de filtros para fluoresceína, sendo considerada positiva a diluição em que os taquizoítos apresentassem uma clara fluorescência verde

na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo Azul de Evans. O título foi considerado a maior diluição de soro com reação positiva.

3.5. Irradiação

Os taquizoítos de *T. gondii* cepa RH, depois de retirados do peritônio dos camundongos e purificados, foram mantidos em banho-de-gelo, e então submetidos a irradiação, a doses de 255 Gy com blindagem de 90%, pela exposição a raios γ de uma ^{60}Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canada, Ltd.) de forma homogênea, em presença de oxigênio, a uma taxa de dose de 7,91 kGy/h. O grupo controle permaneceu na parte externa da bomba durante todo o tempo de irradiação, para avaliação das condições ambientais. Após a irradiação a viabilidade de todas as amostras foi determinada utilizando Azul de Tripiano.

3.6. Estabilato de nitrogênio líquido

Após a irradiação foi acrescentado ao meio de cultura contendo os parasitas, soro fetal bovino inativado (volume final 50%) e Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Fisher Scientific) (volume final 5%) em seguida aliquotados no volume de 1 ml (concentração final 1×10^8 taquizoítos/ml) em tubos plásticos e mantidos à temperatura de -70°C durante 24 horas e transferidas para recipientes contendo nitrogênio líquido (-196°C) onde permaneceram até o momento do uso. Os mesmo procedimentos foram utilizados no grupo controle.

3.7. Resfriamento -17°C com Glicerol

Após irradiação os taquizoítos foram mantidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, sendo acrescentados glicerol (Sigma®), volume final 15%. A suspensão de parasitas foi colocada em tubos plásticos no volume de 1 ml (concentração final 1×10^8 taquizoítos/ml) e mantidos a temperatura de -20°C (Lin *et al*, 1995).

3.8. Testes de viabilidade dos parasitas

O teste de viabilidade dos parasitas foi realizado por meio de contagem de parasitas corados com Azul de Tripiano (0,4%) diluídos em HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) pH 7,2 (Hudson & Hay, 1989).

3.9. Imunizações dos camundongos

Grupos de 05 camundongos C57Bl/6j foram imunizados com 3 doses (1×10^7 parasitas/animal) de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy a intervalos de duas semanas cada dose. Antes do inóculo, os parasitas eram retirados do recipiente de nitrogênio líquido, aquecidos por cerca de 1 minuto em banho-maria 37°C. Camundongos C57Bl/6j (n=5) foram inoculados com uma dose (1×10^7 parasitas/animal) de taquizoítos do grupo controle. O desenvolvimento da infecção foi observado pela mortalidade dos animais.

3.10. Coleta de sangue e soro

As amostras de sangue dos camundongos foram obtidas por secção leve da extremidade da cauda e coletadas em papéis de filtro, com diâmetro de 0,5cm ($\approx 5\mu\text{l}$), antes da inoculação com parasitas irradiados, e a períodos posteriores ao processo. Todas as amostras foram estocadas secas a -20°C .

3.11. Obtenção de antígeno de *T. gondii* (Camargo *et al*, 1978)

Para o preparo do extrato salino (antígeno), as suspensões de parasitas foram submetidas a sonicação (Thornton – INPEC Eletrônica S/A), a 40 ciclos por 5 - 10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa dos agentes, comprovada por microscopia óptica de contraste de fase. Após a lise, acrescentou-se 1 volume de NaCl 0,3M para isotonzar a suspensão. Esta suspensão foi mantida por 4 horas a 4°C e a seguir centrifugada a $10.000g$ por 30 minutos a 4°C , em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403. A proteína total do extrato salino foi determinada pelo método de Bradford, utilizando gama-globulina humana como padrão (Bradford, 1976).

3.12. Ensaio imunoenzimático– ELISA (Venkatesan & Wakelin, 1993)

As placas de 96 poços (Multiwell Plate/polystyrene - Sigma®) foram sensibilizadas com 100 μl de antígeno na concentração de $10\mu\text{g/ml}$ em tampão carbonato 0,1 M pH 9,0 durante 12 - 18hs a 4°C . A seguir, foram lavadas com

PBS + 0,02% Tween 20 (Sigma®) (PBST) + leite desnatado 0,3% (PBSTL) e incubadas com PBSTL por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C, para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos de ligação. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, as amostras de soro, 100 µl/cavidade, diluídos a 1:100 em PBST foram depositadas nas placas e incubadas a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, acrescentou-se conjugado de coelho anti-IgG de camundongo (Sigma®), conjugado a peroxidase (100 µl/cavidade), na diluição 1/10.000 em PBSTL. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguida de novo ciclo de lavagens com PBSTL. A reação foi revelada pela adição 100 µl/cavidade de solução cromogênica OPD (o - phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0). Após 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de HCl 4N (50 µl/cavidade). A densidade óptica (D.O.) foi obtida por leitura a 492 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

3.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (EGPA-SDS)

As amostras de antígenos de *T.gondii* foram submetidas à análise da mobilidade eletroforética e dos constituintes protéicos por meio de EGPA-SDS, num sistema descontínuo e denaturante, segundo Laemmli, 1970, utilizando o sistema Mini-Protean II (BIO-RAD®).

O gel de empilhamento era composto por Acrilamida-Metileno Bisacrilamida (30/0,8) 5% em tampão Tris-HCl 0.125M pH 6.8, SDS 0,1% e gel de resolução contendo Acrilamida/Bisacrilamida 10,0%, tampão Tris/HCl 0.375M pH 8.8, SDS 0,1%. O gel foi polimerizado quimicamente pela adição de Temed (Sigma®) e Persulfato de Amônio (Sigma®).

Todas as amostras, bem como o padrão de peso molecular (Quadro 1) foram denaturadas e reduzidas, após a dissolução em tampão de amostra (Tris-HCl 0.0625, pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 10%, β -Mercaptoetanol 5%, Uréia 1M, Azul de Bromofenol 0.001% 50%-v/v), e aquecimento em banho-maria a 100°C por 3 minutos.

Em seguidas as amostras foram aplicadas, sendo que a corrida eletroforética ocorreu na presença de Tris 0.025M-Glicina 0.192M pH 8.3, a 120V por cerca de uma hora.

Após a corrida, cada gel foi corado com Coomassie® Brilliant Blue G-250 (Sigma®) 0,25%; metanol 45% e ácido acético 10% por 4 horas à temperatura ambiente, e descorados com uma solução de metanol 10%; ácido acético glacial 5%. A estocagem dos géis se processou após a colocação dos mesmos em solução de Metanol 10%; glicerol 1% por 1 hora e secagem em estufa a 42°C por 12 horas, entre folhas de papel celofane comercial sobre placa de vidro. O gel foi então digitalizado em Scanner HP de alta resolução.

Quadro 1 – Proteínas usadas como referência para EGPA-SDS

PROTEÍNAS	PESO MOLECULAR (Daltons)
Fosfolipase b	94.000
Albumina Bovina	67.000
Ovoalbumina	43.000
Anidrase carbônica	30.000
Inibidor de tripsina de soja	20.100
α -lactalbumina	14.200

3.14. Preparação de membranas transferidas com antígenos de *T.gondii*, após Eletroforese (Western-Blot)

Amostras do antígeno de *T.gondii* foram separadas por EGPA-SDS (10%) como descrito acima e transferidas para membranas de nitrocelulose (Immobilon-nc Transfer Membrane Millipore®) para posterior ensaio, em sistema de transferência semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD®). Brevemente, após a eletroforese, o gel era retirado e colocado sobre membrana de nitrocelulose, ladeados por folhas de papel filtro embebido em tampão de transferência de Towbin (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,1-8,5). A transferência foi conduzida a uma voltagem constante de 20 V por 30

minutos. Após isso, o gel residual foi corado, como descrito para EGPA-SDS, com a finalidade de verificar a eficiência da transferência.

Eventuais sítios de ligação livres foram bloqueados por imersão da membrana de nitrocelulose em solução bloqueadora (PBS Tween 0,05% + Leite 5%) por 1 hora sob agitação a 4°C.

A seguir, a membrana contendo antígeno foi incubada com anticorpo primário (soro de camundongo), em diluição adequada "overnight", seguido de várias lavagens em PBS contendo Tween 20 0,02% (PBST). Anticorpos ligados foram revelados por incubação com anti-IgG de camundongo produzido em cabra, conjugado a peroxidase (Sigma®), durante 1 hora. Após lavagens em PBST foi realizada a revelação do conjugado, utilizando solução de 4-cloro-1-naftol (4-cloro-1-naftol 6mg; metanol 2ml; PBS 10ml e H₂O₂ 30% 10μl) (Towbin & Gordon, 1984).

3.15. Invasividade dos taquizoítos de *T. gondii* cultivados com soro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy

Grupos de camundongos imunizados com 3 doses (1×10^7 parasitas/animal) de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy, em intervalos de duas semanas cada dose, foram sacrificados após 15 dias do último inóculo, sendo o sangue dos animais retirado por punção cardíaca e o soro separado por centrifugação (1500 rpm) e filtrado (0.22 μm/Millipore®). Os grupos controles foram incubados com Soro Fetal Bovino (SFB).

Taquizoítos de *T. gondii* foram incubados nas concentrações de 10^6 , 10^5 , 10^4 e 10^3 com soro de camundongos imunizados, durante 2 horas, em seguida adicionados a monocada de células LLC-Mk2 previamente cultivadas em placas de 24 poços (Corning™) contendo lamínulas (GlassTécnica), com RPMI 1640 (Gibco®). Após 24 horas, as culturas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo método de Giemsa.

As lamínulas foram então adicionadas a lâminas utilizando "Permout" (Fischer Scientific®) e o número de taquizoítos no interior das células avaliado através de microscopia óptica convencional. Foram contadas pelo menos 500 células.

3.16. Criopreservação com DMSO x Resfriamento com Glicerol

Grupos de 05 camundongos C57Bl/6j foram inoculados com 3 doses (a cada 14 dias) taquizoítos irradiados de *T. gondii* irradiados mantidos com DMSO 5%, a -196°C em nitrogênio líquido ou glicerol 15% a temperatura de -20°C . Os grupos controles foram inoculados com taquizoítos não irradiados e mantidos nas mesmas condições das amostras irradiadas. O desenvolvimento da infecção foi observado pela mortalidade dos animais. Coletas de sangue foram realizadas a cada duas semanas e os anticorpos IgG específicos anti-*T. gondii* produzidos foram detectados por ELISA.

3.17. Desafio dos camundongos

Grupos de 05 camundongos foram imunizados com 03 doses de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy e após 15 dias da última dose foram inoculados com 1, 5, 10, 10 e 25 cistos da cepa ME-49, por sonda oral. Os cistos foram obtidos de camundongos C57Bl/6j cronicamente infectados. Os cérebros dos animais foram homogeneizados em Hank's (HBSS) com 30% de dextran, centrifugados a 3000 g a 4° C por 10 minutos e o "pellet" ressuspendido em HBSS, a quantidade de cistos foi verificada por microscopia óptica convencional (Booth *et al.*, 1996). Camundongos C57Bl/6j normais foram inoculados com as mesmas quantidades de cistos. A mortalidade dos animais foi acompanhada diariamente.

3.18. Quantificação do número de cistos

Após 4 semanas do desafio oral com a cepa de *T. gondii* ME-49, todos os camundongos foram sacrificados, por narcose com CO₂. Fragmentos do cérebro fresco foram homogeneizados em cinco volumes de PBS (mg/ml), sendo uma alíquota colocada entre lâmina e lamínula. O número de cistos foi determinado em microscópio de fase e o resultado expresso em cistos/ml de homogenato.

3.19. Exame histo-patológico

Grupos de 05 camundongos foram imunizados com 03 doses de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy e após 15 dias da última dose foram inoculados com 25 cistos da cepa ME-49, por gavagem. Após 60 dias todos os animais foram sacrificados por asfixia com CO₂, colhendo-se fragmentos de cérebro, coração, baço, pulmão e fígado. Os órgãos foram lavados em solução fisiológica, fixados em formaldeído a 10%, tamponado com tampão de Sorensen pH 7,2. Após os órgãos eram incluídos em parafina confeccionando-se cortes histológicos de 7µm, que foram corados por hematoxilina-eosina (H.E.). Os cortes foram examinados para se verificar a presença de cistos e lesões teciduais decorrentes da infecção pelo *T. gondii* em um foto-microscópio Axiophot.

3.20. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Foi realizada uma PCR específica para a detecção de um segmento repetitivo do gene B1 do parasita. Após 60 dias do desafio com a cepa de *T. gondii* ME-49, todos os camundongos dos 3 grupos foram sacrificados, colhendo-se fragmentos do cérebro com tamanho em torno de ¼ do órgão, de maneira asséptica em fluxo laminar. O DNA total foi conservado usando 1 ml de TRIzol (Gibco®) em tubo plástico de congelamento, e mantidos em freezer – 70° C até o momento da extração.

Para extração do DNA seguindo as especificações do fabricante, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto a temperatura ambiente, em seguida centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4° C, ao pellet obtido foi acrescentado 200µl de clorofórmio, sendo novamente centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4° C. O DNA extraído foi ressuspenso em 50 µl de água deionizada estéril e quantificado por espectofotometria (Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech®), padronizando-se as reações para a utilização de 5 µg de DNA por tubo. Os “primers” usados foram: TOXO B22 (sense) 5'-AAC GGG CGA GCA CCT GAG GAG A-3' (Localização 1793-1817), TOXO B23 (anti-sense) 5'-TGG GTC TAC GTC GAT GGC ATG ACA ACT-3' (Localização 1881-1907). A reação foi efetuada utilizando os seguintes ciclos: denaturação a 94°C (3 min.), anelamento dos *primers* a 62°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 10 minutos, repetidos por 35 ciclos. Ao final da reação, obteve-se um fragmento de 114 pares de bases, detectado por eletroforese em gel de agarose 2% com coloração por brometo de etídio (10 µg/mL) após a visualização em transluminador (LKB-MacroVue - Pharmacia®).

3.21. Indução da produção de anticorpos *in vitro* - IVIAP (Caterino-de-Araujo, 1992)

3.21.1. Sensibilização das placas de 96 poços

As placas de cultura 96 poços estéreis (Corning) foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno na concentração de 10µg/ml em tampão carbonato 0,1

M (esterilizado em filtro de 0.22 μm /Millipore®) pH 9,0 durante 12 - 18hs a 4°C. A seguir, foram lavadas com PBS e incubadas com albumina bovina (BSA) 2% (Sigma®) 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C, para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos de ligação, após a placa foi novamente lavada com PBS.

3.21.2. Obtenção de células esplênicas e cultura

Foram utilizados grupos de camundongos C57Bl/6J imunizados com 3 doses de taquizóitos de *T. gondii* irradiados a 255Gy, e grupos de camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49 (25 dias de infecção). Camundongos C57Bl/6J normais foram utilizados como controles. Os baços dos animais foram retirados de maneira estéril em fluxo laminar, sendo macerados em peneira de aço inoxidável (mesh 50) (Sigma®) em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®) suplementado com soro fetal bovino 10%, 100 U/ml Penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ Estreptomicina, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Anfotericina B e 50 μM beta-mercatoethano em seguida homogeneizado várias vezes. As células foram então colocadas cuidadosamente em tubos contendo 5ml de Ficoll-Hypaque (90ml Ficoll/Sigma® + 20ml Hypaque 50%/Sanofi Winthrop Farmacêutica Ltda), então centrifugados a 5000 rpm por 30 minutos a 20° C. Os esplenócitos foram então retirados cuidadosamente com pipeta Pasteur, adicionado-se em seguida igual volume de meio RPMI 1640 (Sigma®), sendo novamente centrifugados a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente.

O sobrenadante foi desprezado e as células no precipitado resuspensas em 1ml de meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer e ajustadas para

concentração de 2×10^6 células/ml em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e antibióticos, sendo 100 µl/poço desta suspensão distribuídos em placa de 96 poços (Nunc). Adicionaram-se 100 µl de meio, contendo antígeno de *T. gondii* (5 µg/poço) ou Concanavalina A (Con A; Sigma®) (5 µg). As culturas foram mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37° C por 48 horas, para a adsorção ao anticorpo produzido.

Assim, após ciclo de lavagens com PBSTL, acrescentou-se conjugado de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado a peroxidase (100 µl/cavidade), na diluição 1/10.000 em PBSTL. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguida de novo ciclo de lavagens com PBSTL. A reação foi revelada pela adição 30 µl/cavidade de solução cromogênica OPD (o - phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0). Após 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de HCl 4N (25 µl/cavidade). A absorbância foi obtida por leitura a 492 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

3.22. Proliferação de células esplênicas (Candolfi et al, 1994) e detecção de citocinas

3.22.1. Obtenção de células esplênicas

Foram utilizados grupos de camundongos C57Bl/6J imunizados com 3 doses de taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255Gy (após 15 dias da última imunização) e grupos de camundongos agudamente e cronicamente

infectados, via oral com a cepa cistogênica ME-49 de *T. gondii*. Camundongos C57Bl/6j normais foram utilizados como controle. Os esplenócitos dos camundongos dos 04 grupos de camundongos foram retirados de maneira estéril em fluxo laminar, como descrito no item anterior. Depois de contadas em câmara de Neubauer, as células esplênicas foram colocadas em placas de 96 poços (Corning™), a concentração de 2×10^5 células/poço em meio RPMI 1640 com soro fetal bovino e antibióticos. As células foram estimuladas com extratos de taquizoítos (5 µg/ml) ou Con A (5 µg/ml). Esta preparação foi utilizada nos experimentos subseqüentes.

3.22.2. Proliferação das células esplênicas

As culturas foram mantidas em estufa 5% de CO₂ a 37° C por 48 horas. No fim desse período adicionou-se timidina triciada (Amersham Pharmacia Biotech) (1mCi/poço em 20 µl de meio). Decorridas 72 horas de incubação, 50µl por poço foram recolhidos de maneira estéril para detecção de citocinas. As células então foram colhidas em aparelho Cell Harvester (Skatron), utilizando papel FilterMAT 11731(Skatron). As áreas correspondentes a cada poço foram coletadas e colocadas em tubos próprios contendo 3 ml de líquido de cintilação (PPO 2,5 Diphenyloxazole [5,0g] + POPOP (1,4-Bis[2-(5Phenyl)Oxazolyl]Benzene [0,5g] + 1 litro de Tolueno p.a) por tubo. A radioatividade incorporada foi determinada em Beta-Cintilador e a contagem apresentada em c.p.m (cintilações por minuto).

3.22.3. Detecção de citocinas (IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α) no sobrenadante de cultura

Para detecção de citocinas foram utilizados kits específicos OptEIA™ Set (Pharmingen) de acordo com o protocolo do fabricante. Placas de 96 poços (Corning™) foram sensibilizadas com 100 μ l de anticorpo de captura (diluição 1:250) por poço e incubadas "overnight" a 4° C. A seguir, lavadas com PBS com 0,05% Tween-20 (Sigma®) por 3 vezes (300 μ l/poço) e bloqueadas utilizando PBS com 2% de albumina bovina (Sigma®) (200 μ l/poço) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após 5 lavagens, 100 μ l de cada "standard" ou amostras (sobrenadante das culturas esplênicas utilizadas na proliferação) foram acrescentadas por poço e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida foi realizado um ciclo, com 5 lavagens e adicionado 100 μ l do conjugado ("Working Detector" - "Detection Antibody + Enzyme Reagent Av-HRP", diluição 1:250) em cada poço e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Após novo ciclo com 7 lavagens as placas foram reveladas com adição de 100 μ l da Solução substrato TMB (Tetramethylbenzidine) em acetato de sódio 0,1M por poço. Após 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50 μ l/poço de ácido fosfórico 1 M. A absorbância foi obtida por leitura a 450 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS) e a concentração de citocinas estimada por regressão linear, a partir de controles conhecidos fornecidos pelo fabricante.

3.22.4. Análise estatística

Para análise comparativa da produção de citocinas entre os animais imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy, infectados e controles, foi utilizado ANOVA após verificação da variância.

4 - RESULTADOS

4.1. Viabilidade dos taquizoítos controle e irradiados após criopreservação

A viabilidade dos taquizoítos foi acompanhada após o processo de irradiação, por meio da afinidade tintorial pelo Azul de Tripiano, dos taquizoítos mortos. Nos taquizoítos irradiados a 255 Gy com blindagem de 90% a proporção corada (morta) foi sempre inferior a 5% imediatamente após a irradiação. Em cada preparação pelo menos 1000 taquizoítos eram analisados. Os taquizoítos de *T. gondii* irradiados ou não, foram criopreservados em meio de cultura RPMI 1640, com 50% de soro fetal bovino e 5% de DMSO, por pelo menos duas semanas em nitrogênio líquido, depois de descongelados. Em todos os grupos a proporção de taquizoítos corada (morta) foi inferior a 5%, demonstrando que a criopreservação não afetou a viabilidade dos parasitas.

4.2. Viabilidade dos taquizoítos irradiados e mantidos no freezer com Glicerol

Os taquizoítos de *T. gondii* irradiados foram preservados em meio de cultura RPMI 1640, com 10% de soro fetal bovino e 15% de glicerol, por pelo menos duas semanas no freezer convencional (-17°C), depois de descongelados. Em todos os grupos a proporção de taquizoítos corada (morta) foi inferior a 5%, demonstrando que o resfriamento a -17°C em glicerol não afetou a viabilidade dos parasitas.

4.3. Sobrevida dos camundongos após a imunização

A sobrevida dos camundongos após o inóculo com taquizoítos normais ou irradiados, preservados no nitrogênio líquido ou glicerol, foi acompanhada diariamente. Nos grupos inoculados com taquizoítos não irradiados (nitrogênio líquido e glicerol), houve mortalidade de 100% após 7 dias, nos camundongos inoculados com 10^7 parasitas/ml não irradiados. Nos animais inoculados com taquizoítos irradiados 255 Gy com blindagem 90% não houve mortalidade de nenhum camundongo, mesmo com inóculo de 3 doses de 10^7 parasitas/animal a cada quinze dias.

4.4. Imunogenicidade em camundongos C57Bl/6j inoculados com taquizoítos irradiados com dose de 255 Gy

Para avaliar a resposta imune humoral obtida por três imunizações de camundongos C57Bl/6j (N=5), com i.p. de 10^7 taquizoítos irradiados a 255 Gy com blindagem 90%, foram coletadas amostras de sangue semanalmente, sendo a presença de anticorpos específicos determinados por ELISA, conforme descrito em métodos. Como podemos observar na Figura 6, nos camundongos inoculados com taquizoítos irradiados a 255 Gy com blindagem de 90%, houve resposta imune mostrada pelo aumento significativo nos níveis de IgG com o passar do tempo após uma imunização primária, seguida por uma secundária e uma terciária. A mortalidade dos animais que receberam parasitas irradiados foi 0%, ao contrário dos camundongos que receberam parasitas normais, cuja mortalidade foi de 100%.

Para analisar o reconhecimento das proteínas de taquizoítos de *T. gondii* por soros de camundongos inoculados com parasitas irradiados, realizamos a técnica de Western Blot como descrito em Métodos, utilizando extratos salinos de taquizoítos da cepa RH como antígenos. Na Figura 6 I, mostramos que os anticorpos presentes no soro de camundongos inoculados com parasitas irradiados 255 Gy reconhecem os antígenos de taquizoítos de *T.gondii*. Mas quando comparamos o reconhecimento dos antígenos com camundongos infectados com a cepa cistogênica ME-49 (Figura 6 M), notamos que reconhecem um grande número de frações além das reconhecidas por animais imunizados com parasitas irradiados. A banda correspondente a SAG1 é

reconhecida por soro de animais imunizados com taquizoítos irradiados e cronicamente infectados pela cepa ME-49.

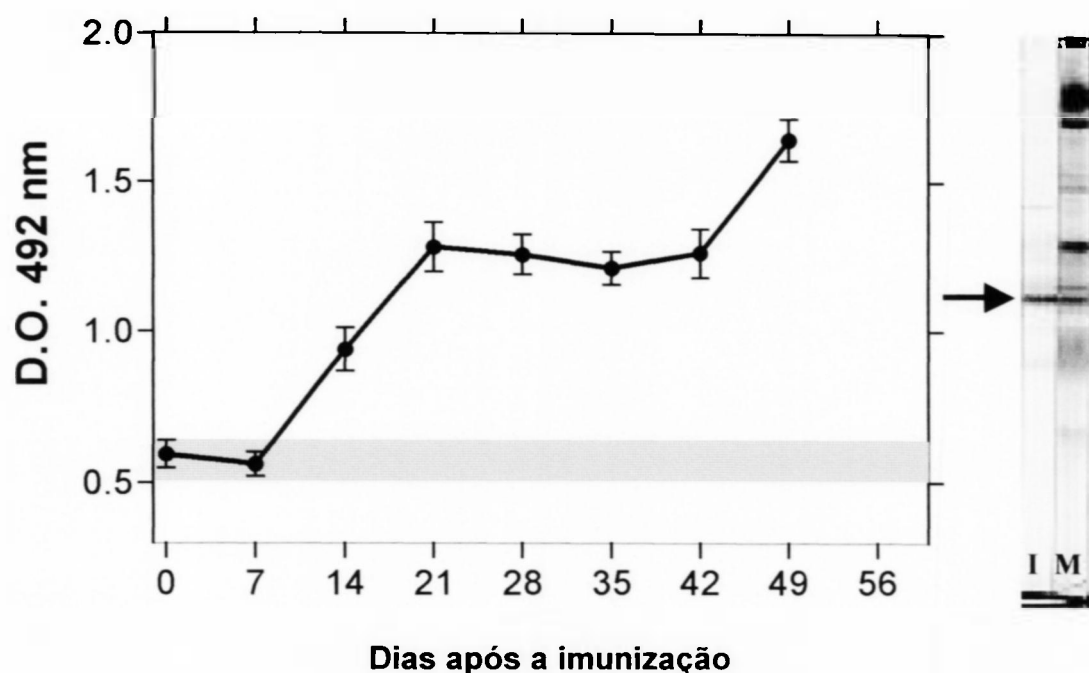


Figura 6 - Acompanhamento da produção de anticorpos IgG específicos no soro de camundongos C57Bl/6j inoculados 1×10^7 taquizoítos *T. gondii* cepa RH irradiados a 255 Gy i.p., 3 doses (dia 0/14/28), detectada por ELISA. Análise da resposta de anticorpos específicos por Western Blot em camundongos C57Bl/6J. **I**, Camundongo imunizado com três doses i.p., de 1×10^7 taquizoítos irradiados 255 Gy; **M**, Camundongo cronicamente infectado com a cepa ME-49 de *T. gondii*. A seta indica SAG1 de *T. gondii*.

4.5. Invasividade dos taquizoítos incubados com soro de camundongo imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy

Taquizoítos de *T. gondii* cepa RH forma cultivados com soro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy em seguida adicionadas à cultura de células LLC-MK2 e a porcentagem de parasitas no interior das células analisados. Com verificamos na Tabela 1 e Figura 7, quando 10^6 taquizoítos foram cultivados, notamos que nos parasitas incubados previamente com soro de animais imunizados, 22,61% das células estavam parasitadas, enquanto 77,14% das células crescidas com parasitas previamente incubados no SFB apresentavam parasitas no seu interior. Quando foram utilizados 10^5 taquizoítos incubados com soro de animais imunizados foram encontradas poucas células infectas e quando foram utilizados 10^4 e 10^3 taquizoítos não foram encontradas células parasitadas. Nos grupos controles infectados com 10^5 parasitas houve ainda grande número de células infectadas (22,08%), e quando a infecção foi de 10^4 e 10^3 ainda foram detectados taquizoítos no interior das células.

Tabela 1 – Porcentagem de células LLC-MK2 infectadas com taquizoítos previamente incubados com soro de camundongo imunizado com taquizoítos irradiados 255 Gy ou soro fetal bovino

SORO	CONCENTRAÇÃO DE TAQUIZOÍTOS			
	10^6	10^5	10^4	10^3
Camundongo imunizado com taquizoítos irradiados 255 Gy	22,61%	2%	0	0
Soro Fetal Bovino	77,14%	23,08%	4%	2%

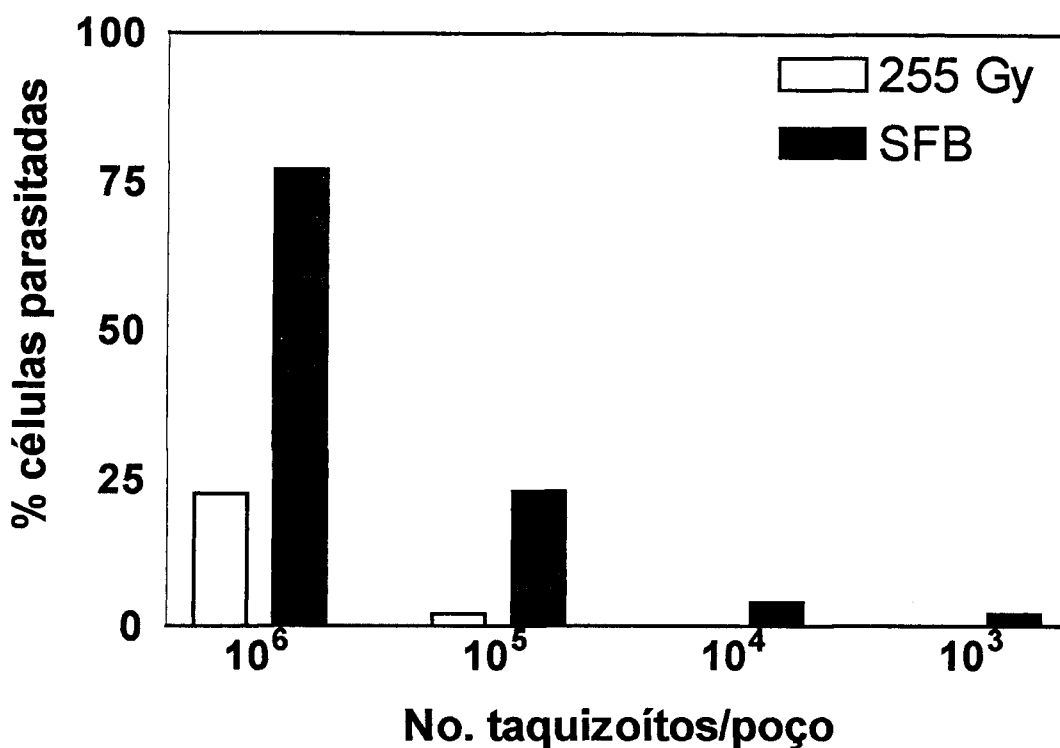


Figura 7 - Porcentagem de células LLC-MK2 infectadas com taquizoítos previamente incubados com soro. 255 Gy, soro de camundongo imunizado com taquizoítos irradiados 255 Gy e SFB, soro fetal bovino.

4.6. Anticorpos IgG específicos em camundongos inoculados com taquizoítos irradiados mantidos em DMSO ou Glicerol

Para comparar as técnicas de preservação dos taquizoítos irradiados, estes foram mantidos em DMSO (-196°C) ou glicerol (-20°C) e inoculados em camundongos C57Bl/6j, sendo a produção de anticorpos específicos IgG acompanhada. Os taquizoítos irradiados mantidos no glicerol induziram resposta imune em nível de IgG nos camundongos imunizados, com resultados melhores no 35º dia, quando comparados aos animais imunizados com taquizoítos mantidos com DMSO no nitrogênio líquido (Figura 8).

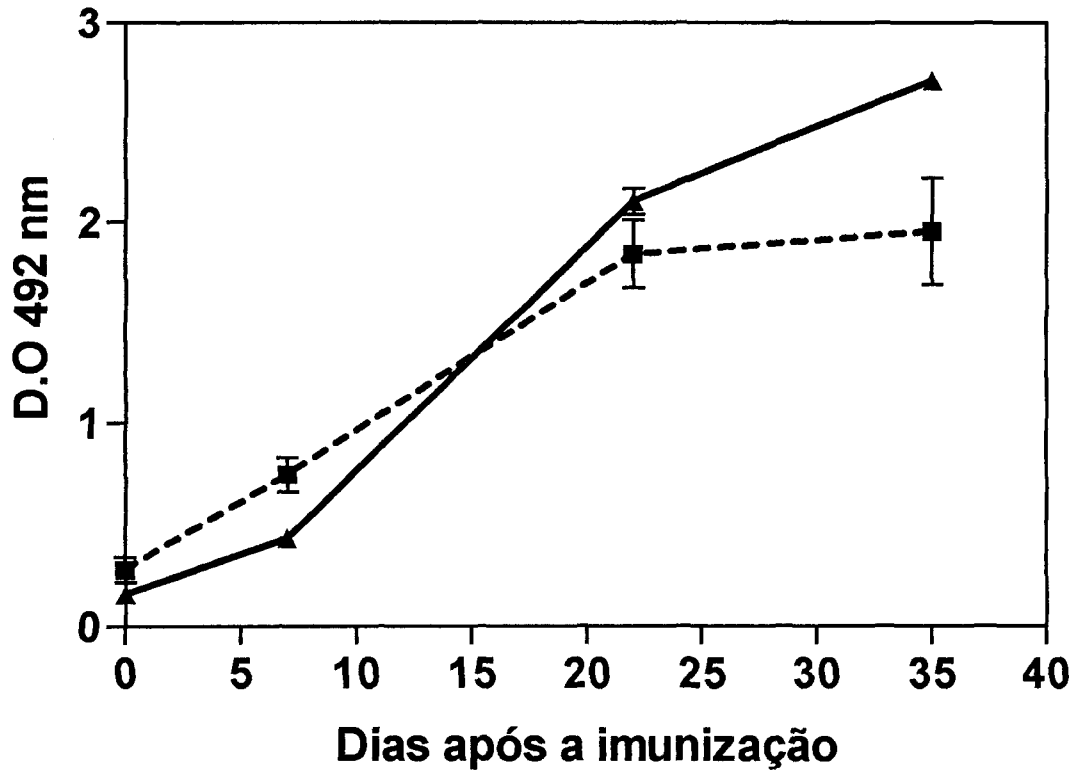


Figura 8 - Acompanhamento da produção de anticorpos IgG específicos no soro de camundongos C57Bl/6j inoculados 1×10^7 taquizoítos *T. gondii* cepa RH irradiados a 255 Gy i.p., 3 doses (dia 0/14/28), detectada por ELISA.. (—) Taquizoítos criopreservados em DMSO no nitrogênio líquido -196°C ; (---) Taquizoítos mantidos em Glicerol no freezer -20°C .

4.7. Desafiados com a cepa cistogênica de *T.gondii* ME-49

4.7.1. Mortalidade

A mortalidade dos grupos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy e controles, desafiados com cistos da cepa ME-49, foi acompanhada. Nos grupos controles a mortalidade em todos os ensaios foi de 20%, exceto no grupo inoculado com 1 cisto (Tabela 2). A análise do macerado cerebral em PBS de animais extremamente debilitados, por microscopia óptica demonstrou sempre grandes quantidades de cistos teciduais (> 1000), o que foi confirmado através da análise histológica.

Nos grupos imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy todos os animais sobreviveram ao desafio com cistos de *T. gondii* cepa ME-49. Após 4 semanas do desafio todos os animais (controle e imunizados 255 Gy) foram sacrificados, o número de cistos cerebrais contados e realizados cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina nos grupos desafiados com 25 cistos.

Tabela 2 – Mortalidade em camundongos C57Bl/6j inoculados via oral com cistos de *T. gondii* cepa ME-49. Controle: camundongos normais; Imunizado: três imunizações (i.p.) de 10⁷ taquizoítos irradiados a 255 Gy a cada duas semanas.

	Número de cistos inoculados (ME-49)				
	1	5	10	20	25
Controle	0	20%	20%	20%	20%
Imunizado	0	0	0	0	0

4.7.2. Exame histo-patológico

Após 60 dias do desafio com 25 cistos da cepa ME-49 todos animais (controle e imunizados 255 Gy) que sobreviveram à infecção (80%), foram sacrificados, sendo realizados cortes histológicos corados com Hematoxilina-Eosina. Nos camundongos não imunizados e infectados com 25 cistos v.o. da cepa ME-49 de *T. gondii*, detectou-se inúmeros cistos no cérebro de todos os animais, bem como focos de inflamação e necrose (Figura 9A e 9B). Cistos na região perimeningial, com infiltrado na meninge também foram localizados (Figura 9C) bem como infiltrado na região do ventrículo e cisto (Figura 9D). Nos animais imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy e infectados com 25 cistos v.o. de *T. gondii* detectaram-se raros cistos em alguns animais, com poucos ou raros focos de necrose (Figura 10).

No fígado de animais não imunizados verificamos infiltrado portal, ativação e focos parenquimatosos (Figura 11A), enquanto nos animais previamente imunizados o fígado apresentava aspecto normal com pouca degeneração (Figura 11B). Os pulmões dos animais do grupo não imunizados apresentavam ativação do tecido linfóide associado ao brônquio (Figura 12A), enquanto no grupo imunizado o órgão apresentava aspecto normal (Figura 12B). Nos animais não imunizados verificamos que o baço apresenta aspecto normal, com a polpa branca circundada por polpa vermelha (Figura 13A), enquanto nos animais imunizados ocorre uma maior ativação da polpa branca (Figura 13B). Em animais não imunizados, o coração apresentou focos de miosite local e infiltrado inflamatório (Figura 14A), enquanto dos animais imunizados este órgão apresentou aspecto normal (Figura 14B).

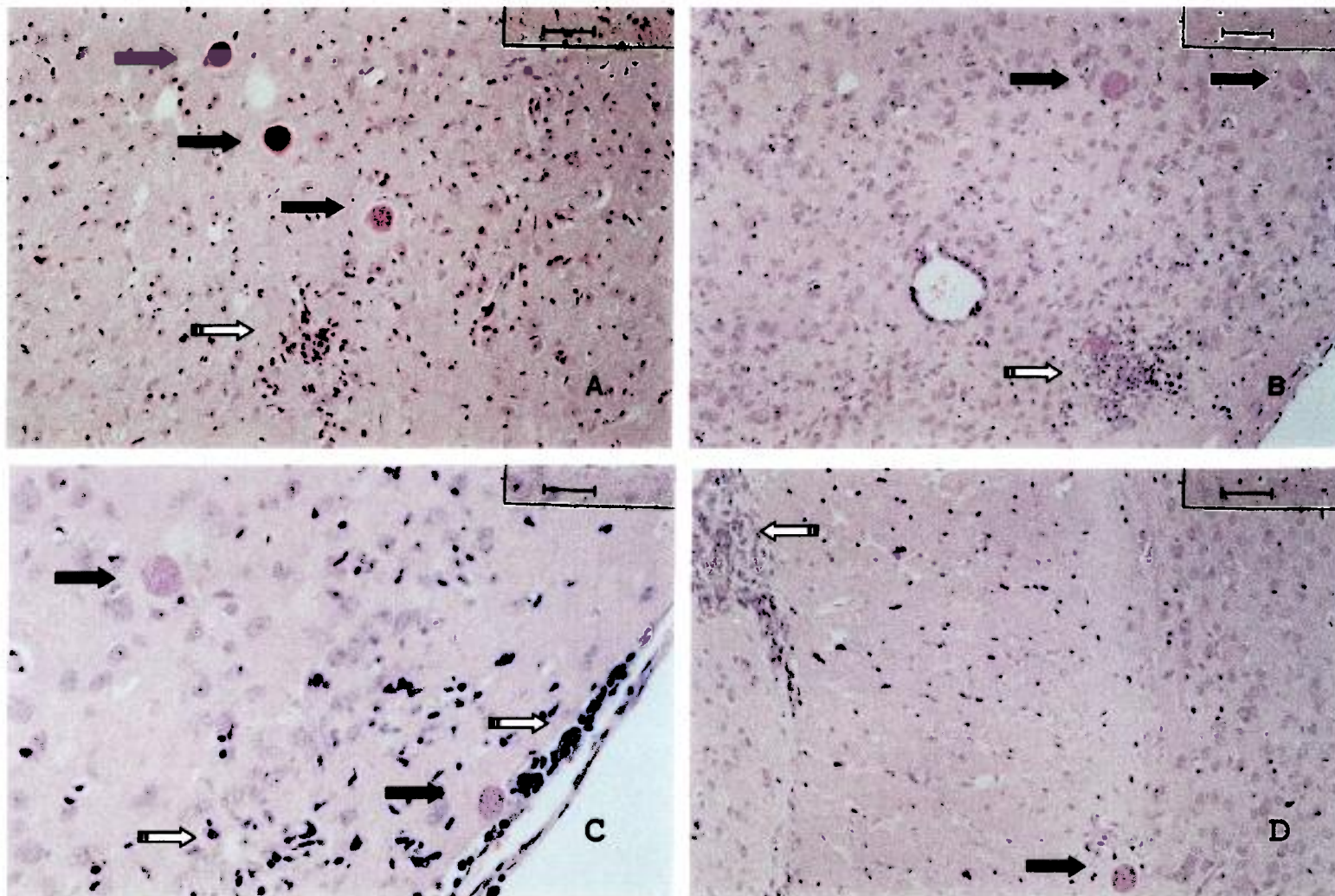


Figura 9 - Cortes histológicos de cérebros de camundongos normais infectado com 25 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. As setas pretas indicam cistos teciduais. As setas brancas indicam áreas de lesão. Hematoxilina-eosina (20X). A barra representa 50 μm.

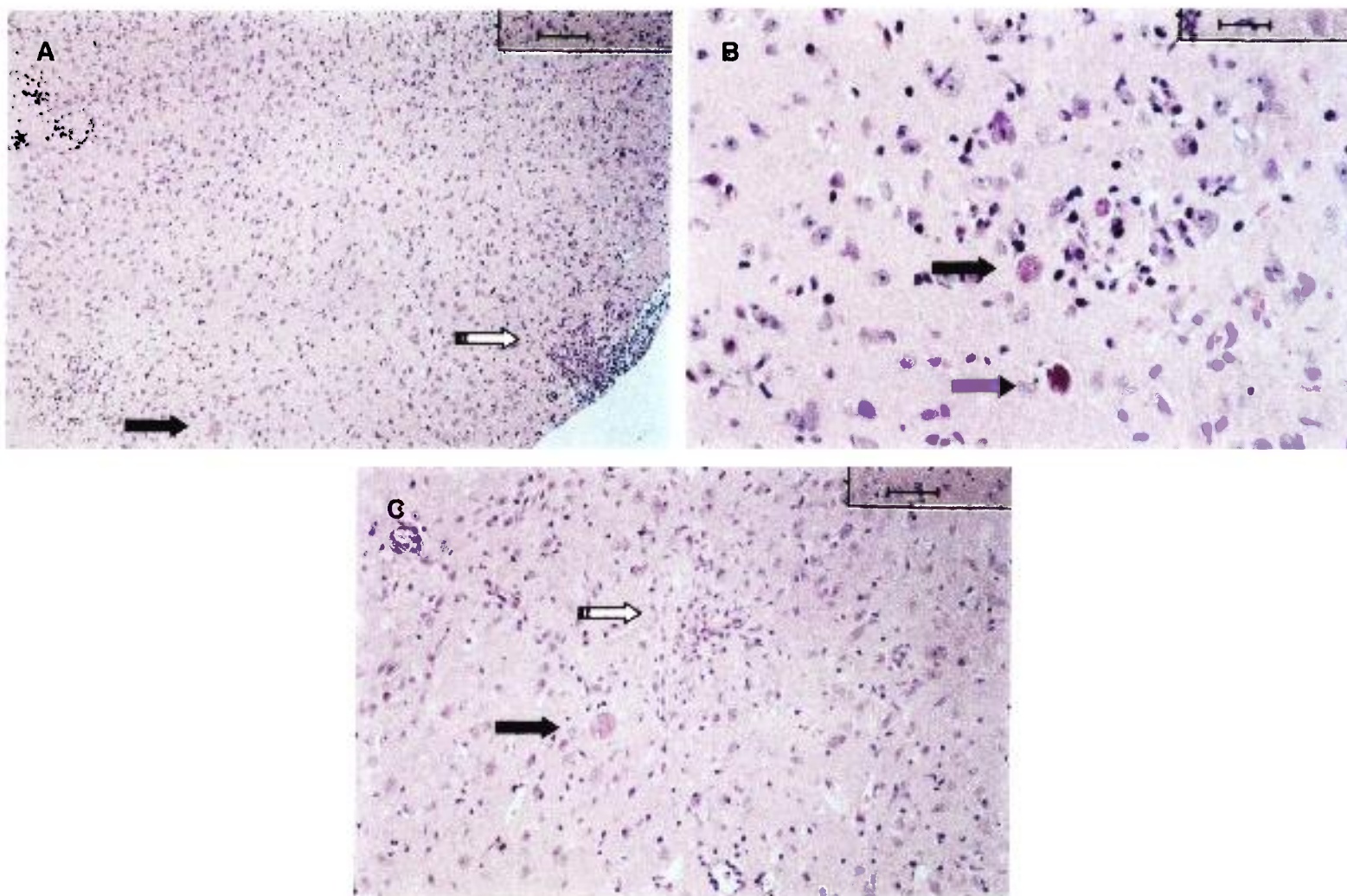


Figura 10 – Cortes histológicos de cérebros de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy e desafiados com 25 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. As setas pretas indicam cistos teciduais. As setas brancas indicam áreas de lesão. Hematoxilina-eosina (A, 10X; B, 40X, C, 20X). A barra representa: A, 100µm; B, 25µm; C, 50µm.

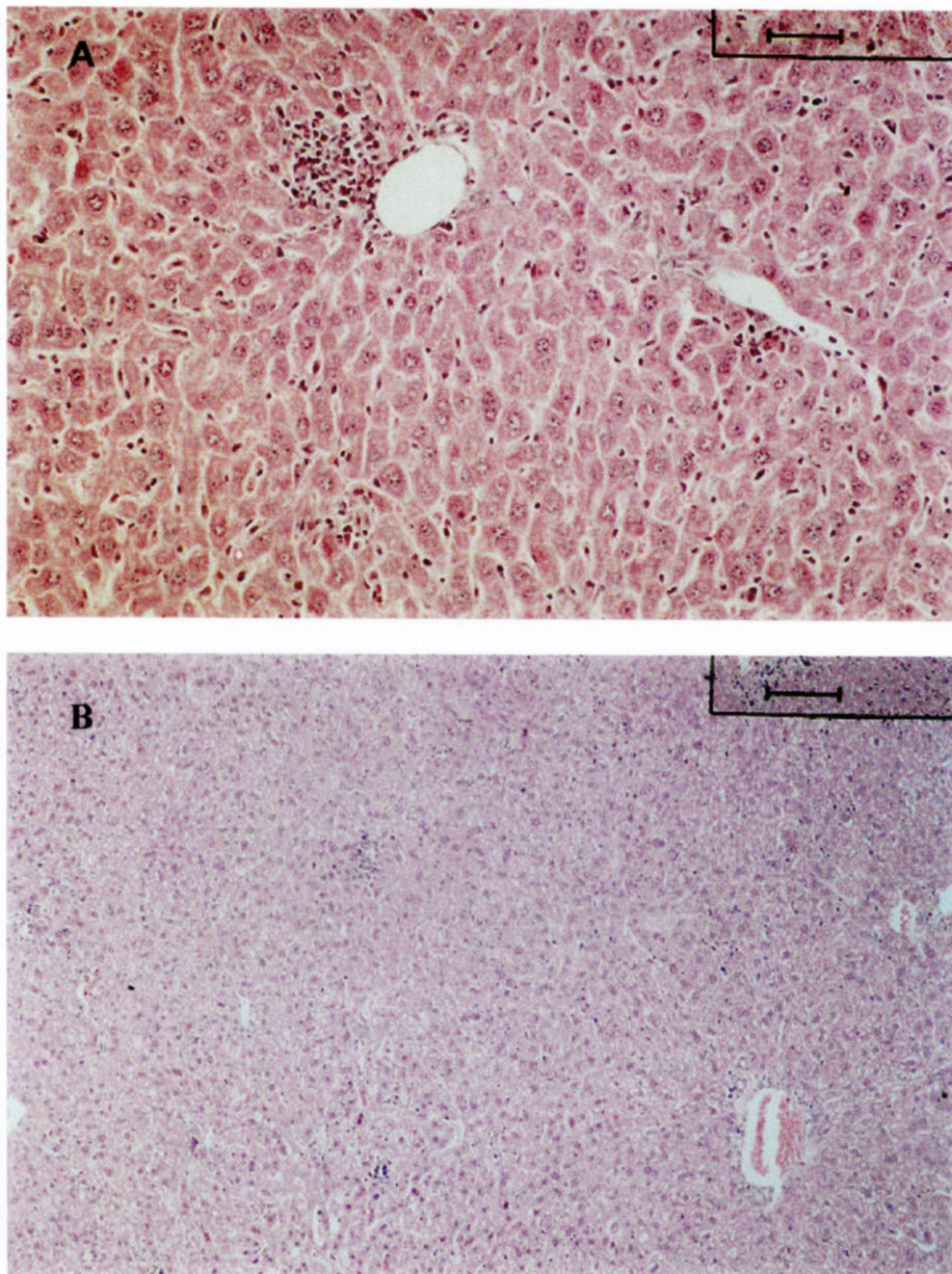


Figura 11 – Cortes histológicos de fígados de camundongos inoculado com 25 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Hematoxilina-eosina. (A) Camundongo normal (20X), a barra representa 50 µm; (B) Camundongo imunizado com taquizoítos irradiados a 255 Gy (10X), a barra representa 100 µm.

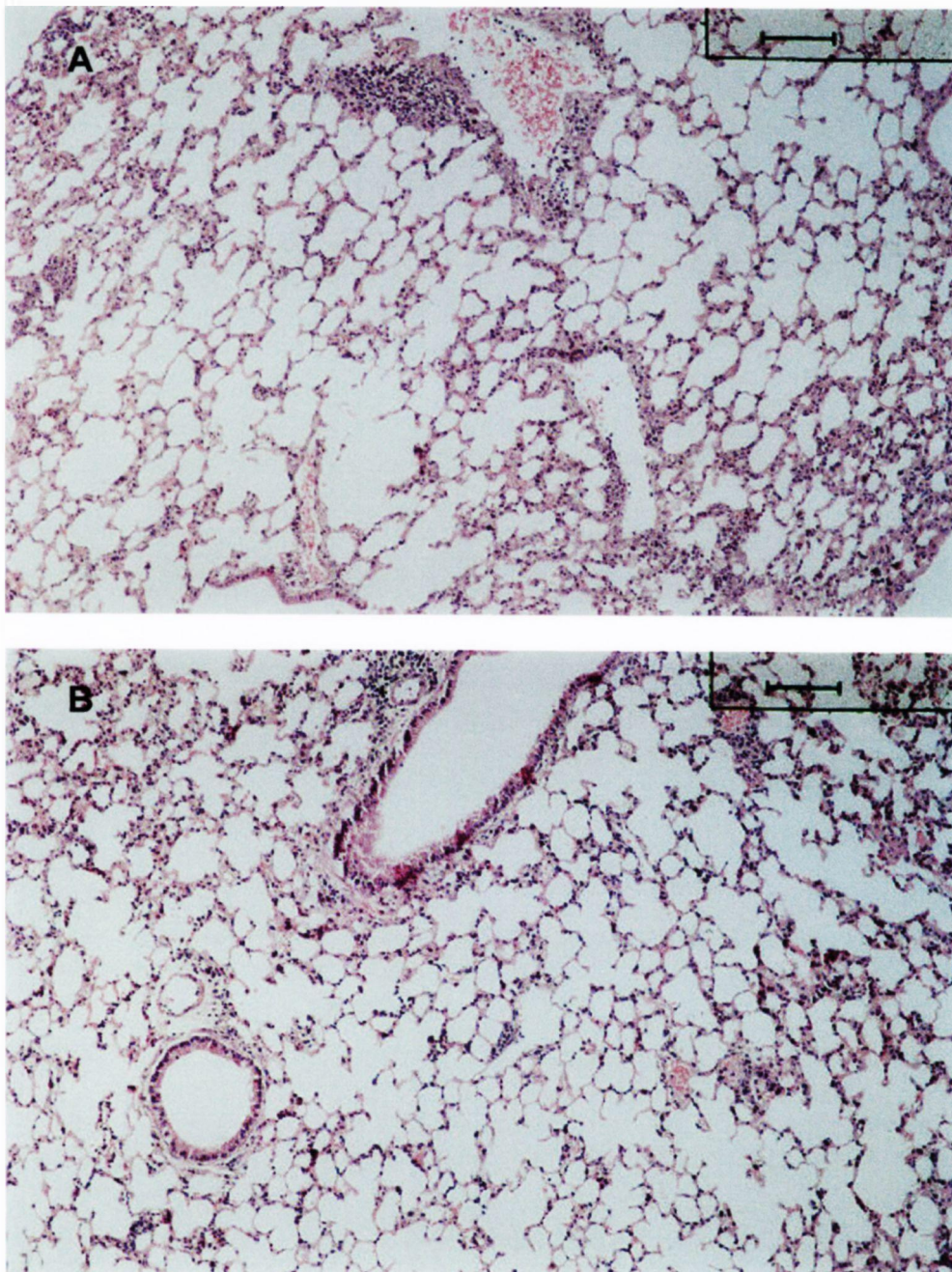


Figura 12 – Cortes histológicos de pulmões de camundongos inoculado com 25 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Hematoxilina-eosina (10X). A barra representa 100µm. (A) Camundongo normal; (B) Camundongo imunizado com taquizoítos irradiados a 255 Gy.

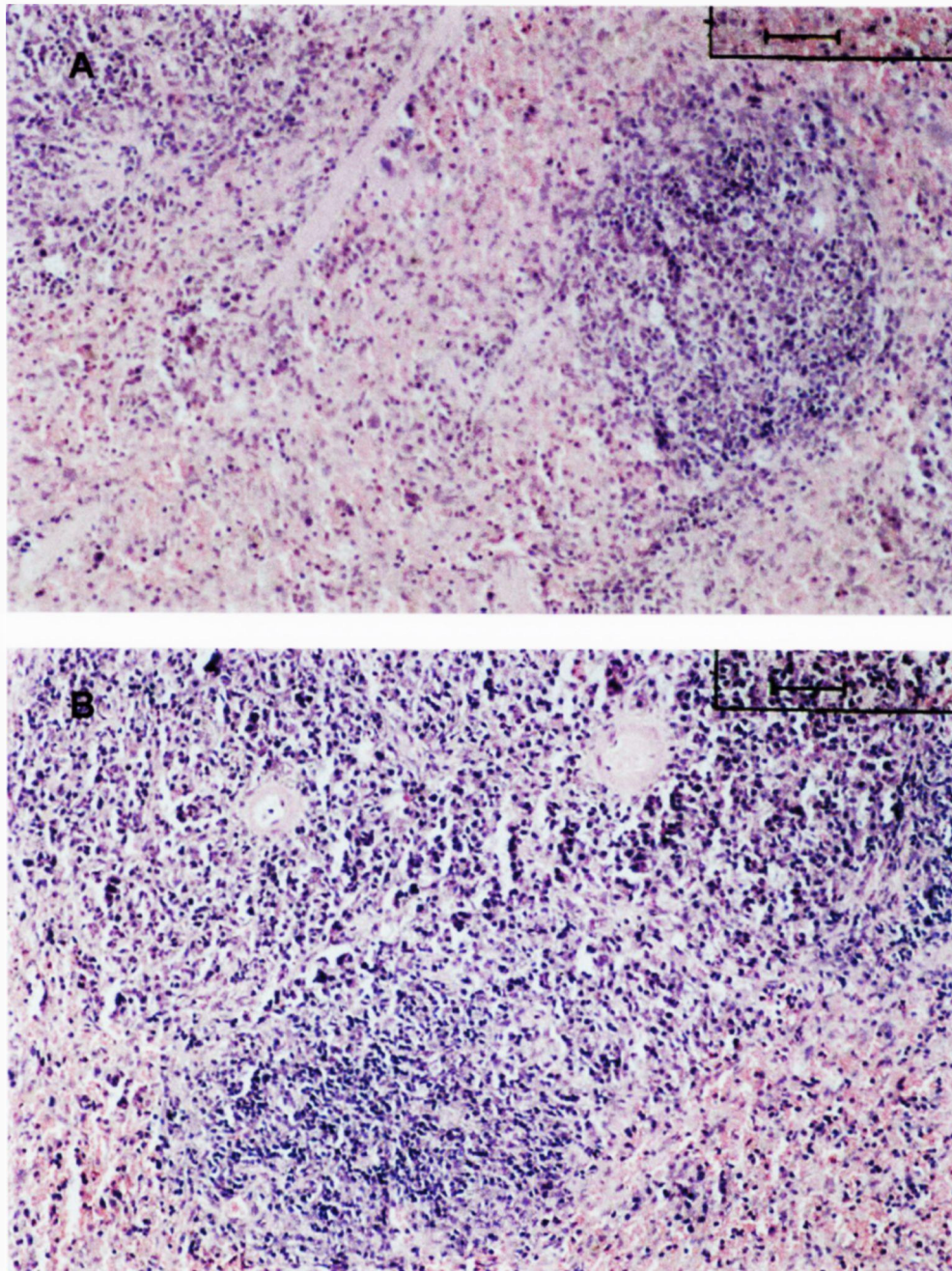


Figura 13 – Cortes histológicos de baços de camundongos inoculado com 25 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Hematoxilina-eosina (20X). A barra representa 50µm. (A) Camundongo normal; (B) Camundongo imunizado com taquizoítos irradiados a 255 Gy.

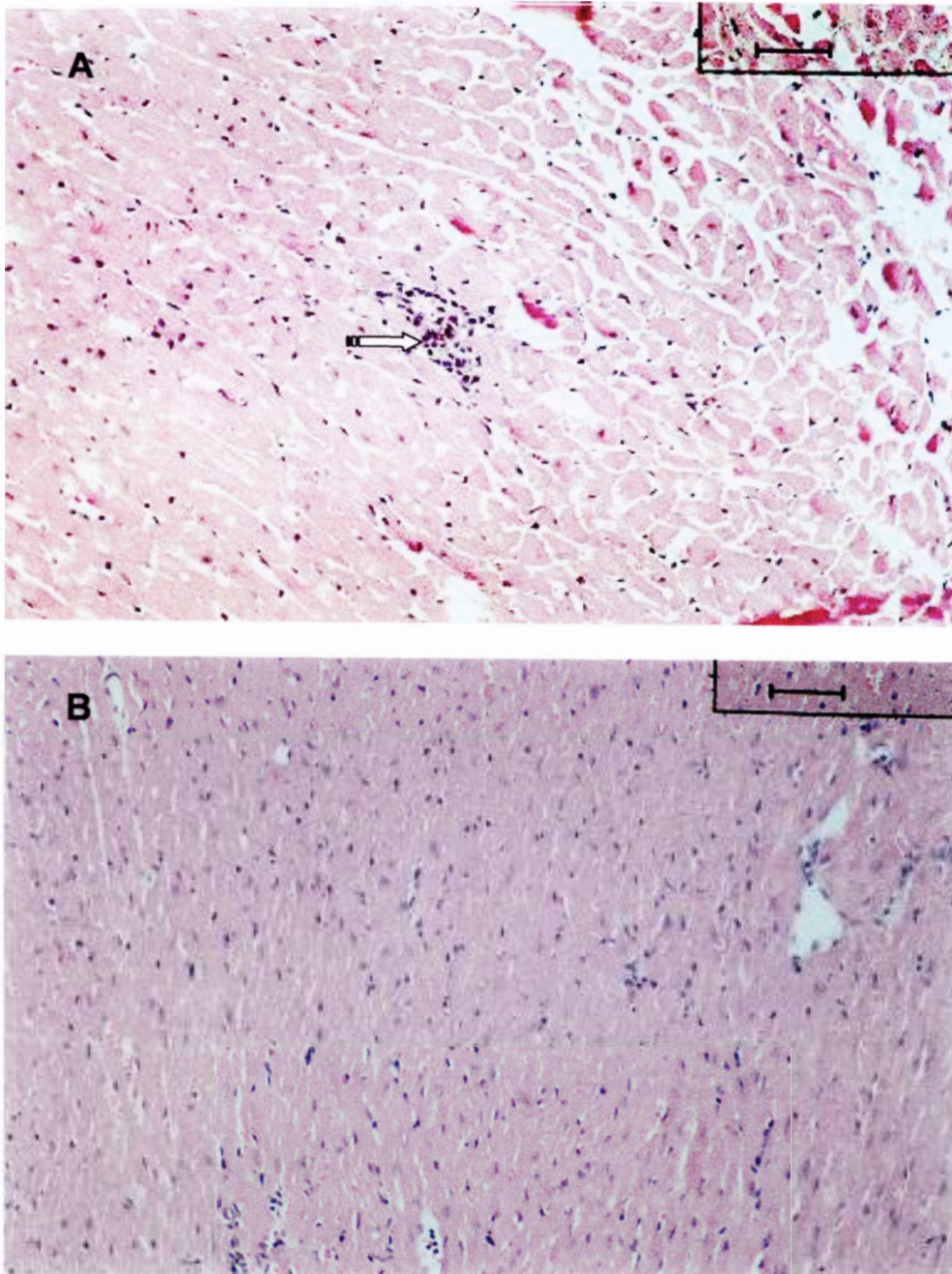


Figura 14 – Cortes histológicos de corações de camundongos inoculado com 25 cistos da cepa ME-49 de *T.gondii*. Hematoxilina-eosina (20X). A barra representa 50µm. (A) Camundongo normal, a seta branca mostra áreas de lesão; (B) Camundongo imunizado com taquizoítos irradiados a 255 Gy.

4.7.3. Quantificação do número de cistos

Os cérebros dos camundongos normais e imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy, infectados via oral com diferentes quantidades de cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, foram macerados em PBS e o número de cistos quantificados através de microscopia. No grupo de camundongos previamente imunizados com 3 doses de taquizoítos irradiados 255 Gy notamos poucos cistos, mesmo nos camundongos que receberam inóculos maiores (25 cistos), enquanto no grupo de camundongos não imunizados o número de cistos encontrados foi elevado e aumentou de acordo com o número de cistos utilizado no inóculo (Figura 15).

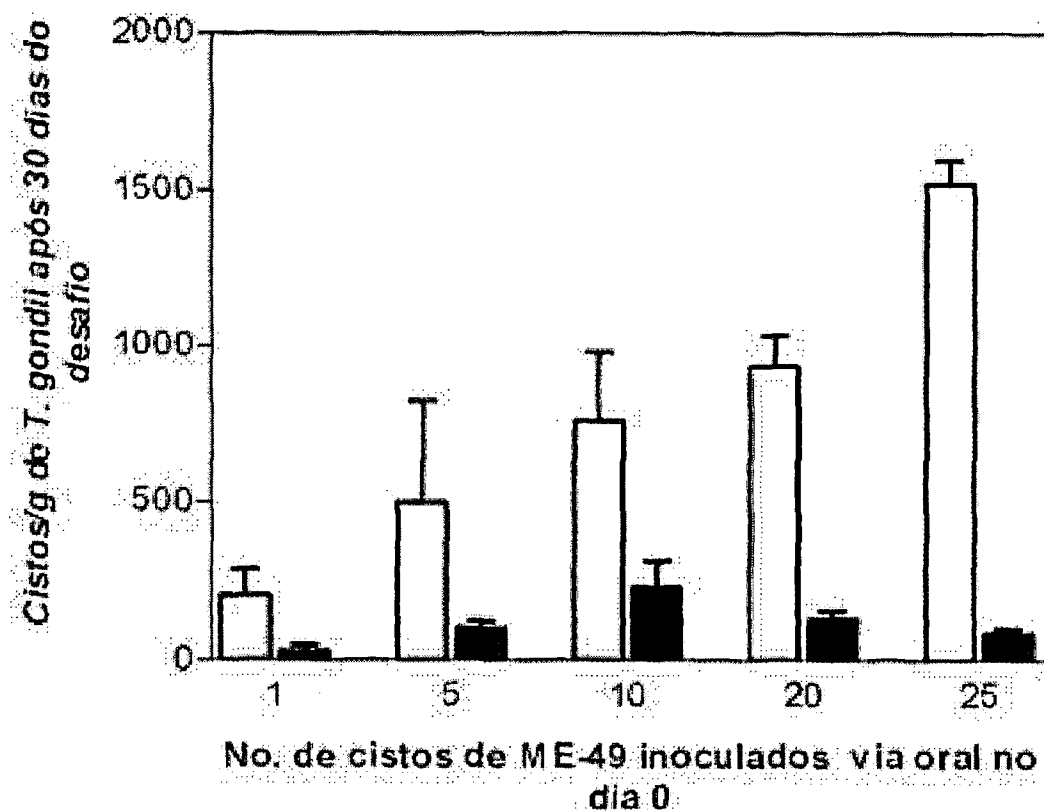


Figura 15 - Número de cistos no cérebro de camundongos após 30 dias do desafio via oral com cistos da cepa ME-49. Barras sólidas, camundongo imunizado com três doses i.p., de 1×10^7 taquizoítos irradiados 255 Gy. Barras abertas, camundongos normais.

4.7.4. PCR

A PCR foi realizada utilizando fragmentos do cérebro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e em animais imunizados desafiados com cistos da cepa ME-49. Nos animais infectados a PCR demonstrou a presença do parasita em todos os animais, enquanto que no cérebro de camundongos imunizados, mas não desafiados, os resultados foram negativos. No grupo imunizado e desafiados a técnica foi utilizada a fim de se confirmar à

presença do parasita no cérebro dos animais, pois em alguns macerados e cortes histológicos não foram encontrados cistos, mas através da PCR confirmamos a presença do parasita em todos os camundongos (Figura 16).

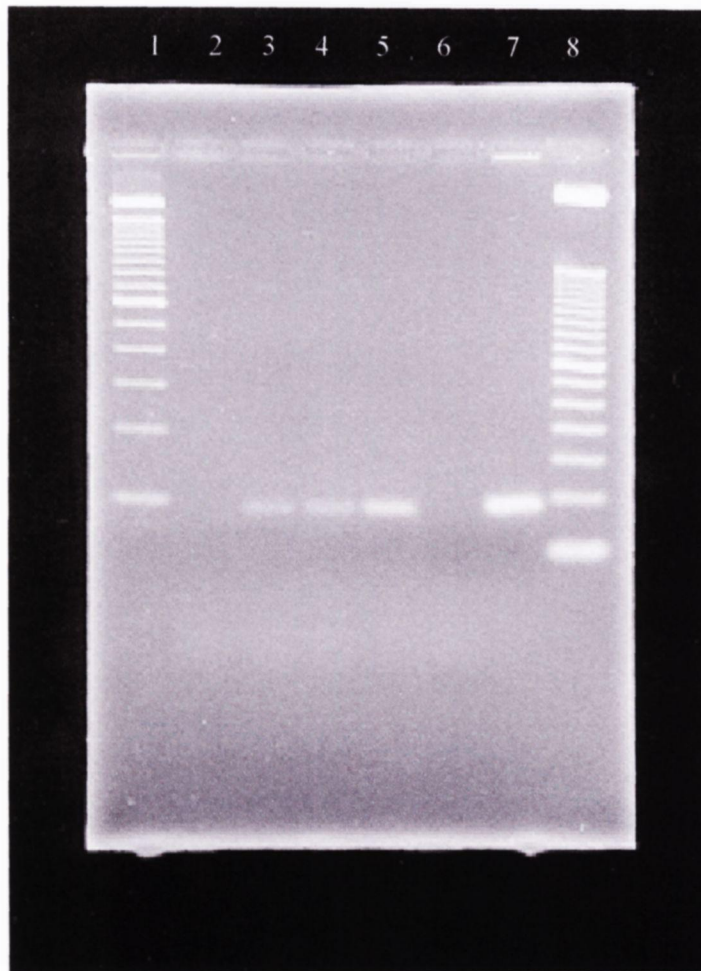


Figura 16 – PCR de cérebro de camundongos infectados com *T. gondii* cepa ME-49. 1: Ladder 100 bp, 2: Controle dos reagentes, 3: Camundongo imunizado (200 Gy) com taquizoítos irradiados e inoculado com 25 cistos, 4: Camundongo imunizado (255 Gy) com taquizoítos irradiados e inoculados com 25 cistos, 5: Camundongo inoculado com 25 cistos, 6: Controle de extração, 7: Controle positivo e 8: Ladder 50 bp.

4.8. IVIAP

Para detectar a produção de anticorpos *in vitro* anti-*T. gondii* por células esplênicas de camundongos imunizados e infectados utilizamos a técnica do IVIAP. Como controle utilizamos células esplênicas de animais normais. Nas células esplênicas provenientes de animais imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy a produção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi maior que nas células esplênicas dos animais não imunizados, e semelhante à produção apresentada pelas células esplênicas de animais infectados com a cepa ME-49 (Figura 17).

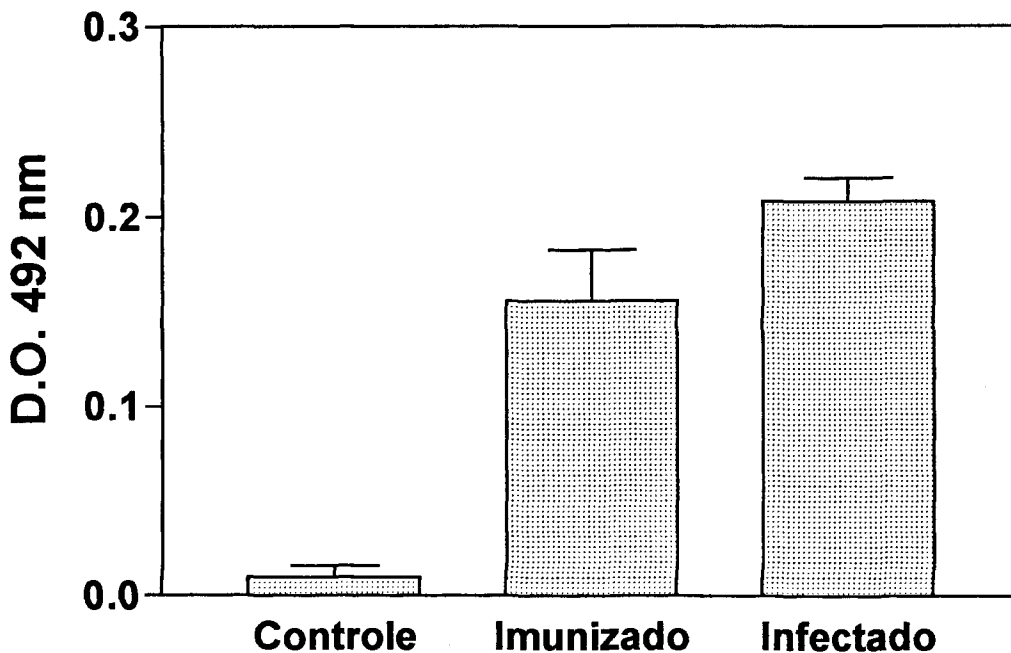


Figura 17 – Resposta imune (IgG) *in vitro* de células esplênicas de camundongos C57Bl/6j normais, imunizados com três doses i.p., de 1×10^7 taquizoítos irradiados 255 Gy e infectados com cistos da cepa ME-49.

4.9. Respostas proliferativas das células do baço

Os baços obtidos de camundongos C57Bl/6j após imunização com taquizoítos de *T. gondii* irradiados ou infectados i.p. com cistos da cepa ME-49, foram estimulados com antígeno de *T. gondii* ou Con A *in vivo* para comparar sua capacidade proliferativa. Células esplênicas de animais normais foram utilizadas como controle. A proliferação nas células esplênicas dos camundongos infectados foi menor do que nos demais grupos, nos animais imunizados com taquizoítos irradiados i.p. a proliferação foi maior quando estimulados com antígeno de *T. gondii* ou Con A (Figura 18).

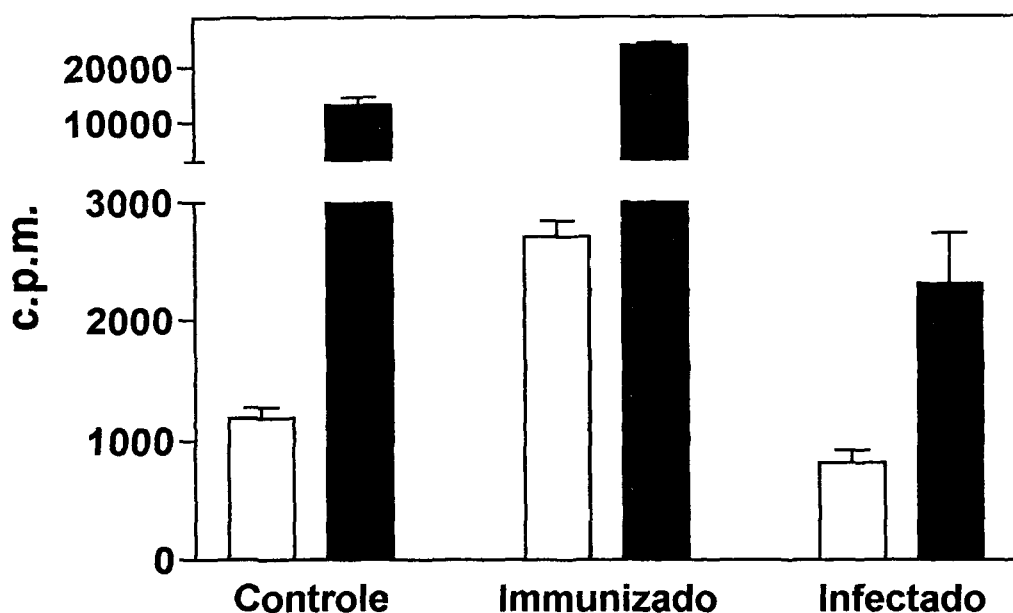


Figura 18 - Resposta proliferativa de células esplênicas em camundongos C57Bl/6j, estimuladas com antígenos de *T. gondii* (barras abertas) ou Con A (barras fechadas). Controle, baço de camundongo normal; Imunizado, baço de camundongo imunizado com três doses i.p., de 1×10^7 taquizoítos irradiados 255 Gy; Infectado, baço de camundongo cronicamente infectado, por 25 dias, com cistos da cepa ME-49 As células esplênicas foram cultivadas por 48 horas, em seguida foi adicionado $1 \mu\text{Ci}$ [^3H] TdR e após 18 horas foi realizado o "harvest".

4.10. Citocinas

Na figura 19A, mostramos a produção de IFN- γ por esplenócitos de animais obtidos 15 dias após a última das 03 doses quinzenais da imunização, comparados com a produção de IFN- γ de esplenócitos de animais controles infectados por via oral com a cepa ME-49, na fase aguda e crônica da infecção. Todas as reações foram feitas com estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. Podemos notar que os esplenócitos de camundongos agudamente infectados produzem níveis maiores de IFN- γ , que diminuem com a infecção crônica a níveis semelhantes ao produzido pela imunização com taquizoítos irradiados a 255 Gy e todos os valores acima da produção basal dos animais do grupo controle.

Na figura 19B, verificamos a produção de TNF- α por esplenócitos de camundongos obtidos 15 dias após a última dose da imunização com taquizoítos irradiados a 255 Gy, comparados com a produção de TNF- α de esplenócitos de animais agudamente e cronicamente infectados, todos após estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. As células esplênicas de camundongos agudamente infectados produzem maior quantidade de TNF- α , que diminui com a infecção crônica a níveis semelhantes ao produzido por esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados a 255 Gy, sempre acima da produção basal dos animais do grupo controle.

Na figura 19C, observamos a produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos obtidas 15 dias após a terceira imunização com taquizoítos irradiados 255 Gy, comparados com a produção em esplenócitos de animais agudamente e cronicamente infectados, todos após estimulação *in vitro* com antígenos de *T. gondii*. Não houve diferença significativa na produção de IL-10 entre esplenócitos de camundongos imunizados, agudamente e cronicamente infectados ou do grupo controle.

A figura 19D mostra a produção de IL-12 por esplenócitos de camundongos obtidos 15 dias após a última dose da imunização com taquizoítos irradiados a 255 Gy, comparados com a produção de IL-12 de esplenócitos de animais agudamente e cronicamente infectados, todos após estimulação *in vitro* com antígeno de *T. gondii*. Os esplenócitos de animais agudamente infectados produzem níveis maiores de IL-12, que diminuem com a infecção crônica, a níveis semelhantes aos produzidos por camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy e todos acima dos valores da produção basal dos animais do grupo controle.

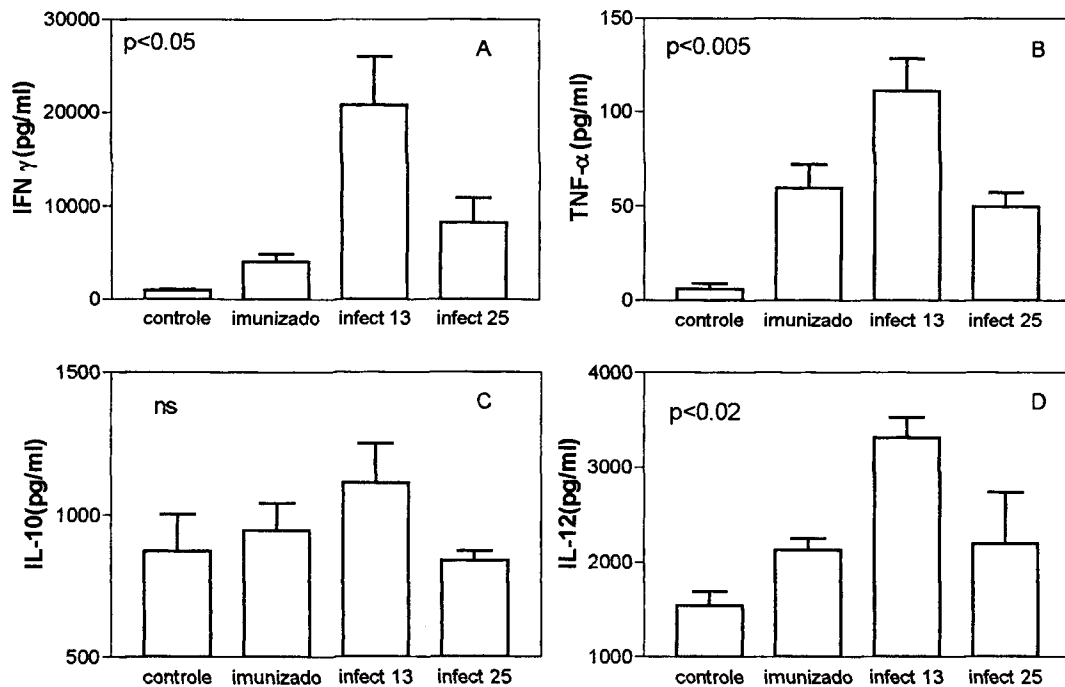


Figura 19 – Produção de citocinas por células esplênicas de camundongos C57Bl/6j em resposta a antígenos de *T. gondii*. **Controle**: camundongo normal; **Imunizado**: camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy; **Infect 13**: camundongos no 13º dia de infecção com cistos de *T. gondii* cepa ME-49; **Infect 25**: camundongos no 25º dia de infecção com cistos de *T. gondii* cepa ME-49. A: IFN- γ , B: TNF- α , C: IL-10 e IL-12.

5 – DISCUSSÃO

A radiação ionizante não afetou a viabilidade dos taquizoítos, pois menos de 5% dos parasitas irradiados com 200 Gy ou 255 Gy com blindagem 90% foram encontrados corados, quando avaliados por meio de afinidade tintorial, pela incorporação do corante Azul de Tripano, método ideal para o diagnóstico rápido da viabilidade do *T. gondii* e de outros protozoários (Shaio *et al*, 1987). Os taquizoítos mantidos no nitrogênio líquido apresentaram viabilidade semelhante aos grupos não irradiados, demonstrando que a criopreservação com DMSO (-196°C) não afetou a viabilidade dos parasitas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Lin e colaboradores (1995), os quais demonstraram que taquizoítos da cepa RH mantidos em nitrogênio líquido com 7,5% DMSO durante 8 anos e inoculados em camundongos mantêm a capacidade de matar os animais após 2 semanas. Esses autores demonstraram que, dos parasitas mantidos em nitrogênio líquido por aproximadamente 500 semanas, 20% permanecem viáveis e que a viabilidade é tempo dependente; como em nosso experimento utilizamos taquizoítos congelados por no máximo 8 semanas com 5% de DMSO, a viabilidade foi quase próxima de 100%, semelhante ao demonstrado previamente por esses autores utilizando taquizoítos não irradiados. O fato de poder-se preservar os taquizoítos de *T. gondii* irradiados por longos períodos facilita o processo de imunização, uma vez que, em se obtendo grandes quantidades de parasitas por meio do inóculo em camundongos ou cultura de tecidos, pode-se irradiar e mantê-los criopreservados podendo descongelar as

amostras no momento do uso, sem precisar irradiar a cada processo de imunização.

Os taquizoítos de *T. gondii* irradiados a 255 Gy foram preservados em nitrogênio líquido (-196°C) e glicerol (-20°C) e comparados quanto a sua viabilidade por Azul de Tripiano e antigenicidade pela detecção de anticorpos específicos IgG em camundongos C57Bl/6j imunizados. Os taquizoítos irradiados armazenados em glicerol (-20°C) durante 30 dias apresentaram viabilidade e induzem níveis IgG em camundongos C57Bl/6j semelhantes aos mantidos no nitrogênio líquido (DMSO). Estes dados também são semelhantes aos obtidos por Lin e colaboradores (1995), que verificaram a viabilidade e virulência dos taquizoítos de *T. gondii* em glicerol e nitrogênio líquido. Apesar de taquizoítos de *T. gondii* persistirem durante 8 anos no nitrogênio líquido e apenas 16 – 25 semanas no glicerol (Lin *et al*, 1995), o fato de que durante 30 dias os taquizoítos irradiados mantêm sua viabilidade e capacidade de induzir resposta imune IgG específica, demonstra que estes podem ser mantidos em freezer -20° C, não havendo necessidade de nitrogênio líquido e viabilizando seu uso.

Em nossos ensaios utilizando inoculo de 10^7 parasitas irradiados a 255 Gy e blindagem de 90% não encontramos mortalidade de nenhum animal imunizado e foi possível detectar a produção de anticorpos (IgG) no soro, por ELISA. Quando comparamos as descrições da literatura em relação à imunização e aumento nos níveis de anticorpos IgG (Janeway & Travers, 1996) notamos que a curva obtida com 3 imunizações mostra um aumento nos níveis de IgG, com resposta primária e secundária.

Quanto à especificidade dos anticorpos produzidos por camundongos imunizados com taquizoítos irradiados 255 Gy, podemos notar que estes reconhecem os antígenos de *T. gondii* pelo Western blot. No entanto, quando utilizamos sangue de animais inoculados com a cepa ME-49 verificamos que a reatividade é muito maior, pois ocorre um reconhecimento de um número maior de proteínas do protozoário, mas esta cepa permanece infectando os camundongos por longos períodos, com formação de cistos cerebrais.

Quando os animais foram desafiados com cistos da cepa ME-49, houve mortalidade somente nos grupos controles, enquanto todos os animais imunizados sobreviveram. Suzuki e colaboradores (1989b) utilizando camundongos CBA/J inoculados com 10 cistos v.o. da cepa ME-49, demonstraram que a mortalidade dos animais teve início por volta da 5ª semana e atingiram 64% decorridas 30 semanas. No grupo imunizado com taquizoítos irradiados 255 Gy, diferente do que ocorreu no grupo controle não houve mortalidade de nenhum animal, mesmo nos animais inoculados com maior quantidade de cistos (20 e 25 cistos).

Suzuki e colaboradores (1989b) analisaram as mudanças histológicas em órgãos de camundongos infectados com a cepa ME-49, decorrida 8 semanas após o desafio com 10 cistos, encontrando diversas alterações no cérebro dos animais, como lesões inflamatórias, semelhantes aos encontrados no grupo controle inoculados com 25 cistos/animal. Os autores também analisaram histologicamente o coração, pulmão, baço e fígado e encontraram diferenças significantes somente no miocárdio dos camundongos infectados com a cepa ME-49, dado semelhante ao encontrado em nossos ensaios nos animais do grupo controle. No grupo imunizado com taquizoítos irradiados 255

Gy, além de encontrarmos raros cistos cerebrais, o grau de lesão nos órgãos (cérebro) avaliado por histologia foi muito menor ao grupo controle, demonstrando que os processos de imunização com taquizoítos irradiados podem conferir proteção parcial aos camundongos.

A PCR tem sido utilizada para confirmar a infecção pelo *T. gondii* em indivíduos transplantados (Bretagne *et al*, 1995), em fluído cérebro espinal de pacientes com AIDS (Schoondermark-van de Ven *et al*, 1993) e em camundongos (Owen & Tress, 1998). Em nosso trabalho utilizamos PCR com a finalidade de detectar a presença do parasita no cérebro dos animais imunizados e infectados com a cepa ME-49, pois em alguns animais, diferente do grupo controle, não localizamos cistos na amostragem de contagem e houve a necessidade de se usar a técnica para confirmar a infecção menos intensa.

O IVIAP é um método alternativo para detecção da secreção de anticorpos, utilizado primeiramente para detecção de anticorpos secretados contra o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), pela cultura de linfócitos sangüíneos de crianças infectadas (Pahwa *et al*, 1989; Amadori *et al*, 1990). A técnica tem sido utilizada também para confirmação de diagnóstico da infecção primária aguda pelo HIV (Casseb & Caterino-de-Araujo, 1994). Em nosso trabalho, utilizamos extrato salino de *T. gondii* como antígeno, e em vez de células sangüíneas, células esplênicas, seguindo os mesmos princípios utilizados para detecção de anticorpos anti-HIV. Nossos resultados demonstraram que o IVIAP pode ser empregado para detecção de anticorpos produzidos contra o *T. gondii*, tendo a vantagem de podermos utilizar o sobrenadante da cultura para detecção das citocinas.

Para estudo de proliferação celular e citocinas na toxoplasmose aguda tem se utilizado a técnica de proliferação de células esplênicas de camundongos infectados, estimuladas com antígeno de *T. gondii* ou Con A, com incorporação de timidina triciada (Candolfi *et al*, 1995). As células esplênicas de camundongos infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* apresentaram supressão na resposta proliferativa para Con A, quando comparados com esplenócitos de animais normais, dados semelhantes foram encontrados por outros autores (Strickland *et al*, 1975; Khan *et al*, 1995). A resposta proliferativa das células esplênicas estimuladas por antígeno de *T. gondii*, nos animais infectados foi menor do que a apresentada nos camundongos normais e imunizados, dados semelhantes aos encontrados por outros autores, que demonstraram que a supressão da resposta proliferativa nas células esplênicas em resposta ao antígeno de *T. gondii* ocorre principalmente entre os dias 7 e 14 após a infecção (Candolfi *et al*, 1994). Nossos dados demonstram que a imunização não induz a supressão da resposta proliferativa nas células esplênicas para Con A ou antígenos de *T. gondii*, como ocorrem nos animais infectados com a cepa ME-49.

Não se sabe o papel exato dos anticorpos na resistência contra o *T. gondii*, mas estudos comprovam que a administração de anticorpos em camundongos diminuem a mortalidade e aumentam a sobrevivência dos animais (Sharma *et al*, 1984) apesar de alguns autores terem demonstrado que taquizoítos opsonizados (imunoglobulina G) mantêm a habilidade de penetrar em monócitos humanos não aderentes e com pouco efeito na replicação intracelular do parasita, na ausência de complemento (Fadul *et al*, 1995). No entanto, diversos autores têm demonstrado a importância dos anticorpos e da

resposta humoral na resposta imune do hospedeiro e também o seu uso no diagnóstico. O papel protetor dos anticorpos em colaboração com macrófagos foi demonstrado *in vitro* (Anderson *et al*, 1976). Na presença de anticorpos os taquizoítos são rapidamente lisados pela via clássica de fixação do complemento e na ausência destes anticorpos os parasitas são resistentes (Fuhrman & Joiner, 1989). Quando os taquizoítos de *T. gondii* penetram ativamente nos macrófagos, não ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos (Jones & Hirsch, 1972), mas, quando os taquizoítos são opsonizados com anticorpos específicos ou sistema complemento, estes são mortos pelos mecanismos normais dos macrófagos após fagocitose (Joiner *et al*, 1990). Sibley e colaboradores (1985) demonstraram que o *T. gondii* bloqueia a acidificação do vacúolo pelo lisossomo em macrófagos normais e quando o parasita está recoberto por anticorpos específicos desencadeia o processo de acidificação, de maneira similar à fagocitose de parasitas mortos. Camundongos deficientes de células B, mesmo apresentando níveis normais ou maiores de interleucinas (IFN- γ e TNF- α) tiveram diminuição da resistência a infecção e quando foi administrado anticorpo policlonal de coelho anti-*T. gondii*, houve diminuição da mortalidade precoce e das patologias associadas aos taquizoítos no cérebro destes animais (Kang *et al*, 2000). Taquizoitos da cepa RH foram incubados com anticorpos monoclonais (1B8), o crescimento do parasita teve inibição > 90%, determinado pela incorporação de radioisótopos (Mineo *et al*, 1993).

A importância dos anticorpos e células B foi demonstrada *in vivo*, utilizando camundongos (μ MT) deficientes de células B. Quando os animais eram inoculados com 10 cistos da cepa ME-49 ocorria a mortalidade de todos

os animais até 4 semanas após a infecção e quando foi administrado anticorpo anti-*T. gondii* IgG policlonal produzido em coelho todos os animais sobrevivem até o final dos ensaios (42 dias) com pouco número de cistos e áreas inflamatórias (Kang *et al*, 2000). Sayles e colaboradores (2000) imunizaram camundongos μ MT (deficientes de células B) com a cepa ts-4 e desafiaram com taquizoítos normais i.p., demonstrando que ocorre a mortalidade de todos os animais, mas quando era administrado soro de animais normais imunizados nos camundongos μ MT ocorre aumento da sobrevivência após desafio com taquizoítos virulentos.

Quando os taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foram incubados com soro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e adicionados à cultura de células LLC-MK2, notamos que houve uma redução significativa no número de células infectadas, quando comparado com o grupo controle. Taquizoítos de *T. gondii* foram incubados com soro de camundongos imunizados com taquizoítos da cepa ts-4 e em seguida os parasitas foram adicionadas a culturas de fibroblastos humanos e observou-se uma diminuição drástica nas células infectadas, no entanto, quando foi utilizado soro de camundongos deficientes em células B (μ MT) o crescimento dos taquizoítos foi semelhante ao grupo controle, apesar dos animais apresentarem os mesmos níveis de citocinas com o IFN- γ , demonstrando a importância de anticorpos e células B na resistência contra o parasita (Sayles *et al*, 2000). Nossos resultados mostraram que os camundongos imunizados i.p. apresentaram níveis de anticorpos semelhantes a animais infectados com a cepa ME-49, o

que pode ser de extrema importância no auxílio ao combate a infecção por *T. gondii*.

O estudo da produção de citocinas é essencial para compreender a resposta imune induzida por vacinas de *Toxoplasma*. Em nossos ensaios a produção de citocinas foi similar, embora em níveis menores, quando comparamos a imunização com taquizoítos irradiados com a infecção crônica pela cepa cistogênica ME-49. Citocinas como IFN- γ e TNF- α são importantes para o controle da replicação dos taquizoítos durante a fase crônica e aguda da infecção pelo *T. gondii* (Denkers & Gazzinelli, 1998). Estas duas citocinas têm sido descritas previamente como necessárias para ativar os macrófagos e inibir a proliferação dos taquizoítos *in vitro* (Sibley *et al*, 1991; Langermans *et al*, 1992). A produção de citocinas foi similar, embora em menores níveis, quando comparamos os animais imunizados com taquizoítos irradiados com camundongos agudamente infectados com a cepa cistogênica ME-49. A indução da produção de IFN- γ foi um dos mais promissores achados, pois a eliminação de células infectadas parece estar relacionada com a capacidade de produção desta citocina em modelos experimentais (Denkers, 1999). A importância desta citocina tem sido diretamente demonstrada em vários modelos murinos. A administração de IFN- γ recombinante pode proteger camundongos contra desafios com cepas virulentas de *T. gondii* (McCabe *et al*, 1984). Camundongos foram inoculados i.p. com anticorpos monoclonais contra IFN- γ e desafiados com a cepa ME-49 para verificar a importância da produção endógena desta citocinas na resistência contra o *T. gondii*, e os animais que não receberam o anticorpo sobreviveram e desenvolveram infecção crônica,

enquanto os infectados que receberam o anticorpo morreram de toxoplasmose (Suzuki *et al*, 1988). Quando camundongos cronicamente infectados com a cepa ME-49 foram tratados com anticorpos monoclonais contra IFN- γ , apresentaram cinco vezes mais cistos no cérebro do que os animais que não receberam o anticorpo indicando que esta citocina tem um papel direto na prevenção da ruptura de cisto e encefalite (Suzuki *et al*, 1989).

Estudos demonstraram a importância do IFN- γ para inibição da replicação do *T. gondii* *in vitro*. Utilizando IFN- γ recombinante de ovinos (ov.rIFN- γ), incubando macrófagos alveolares e fibroblastos 24 horas antes ou 2 horas após a infecção com *T. gondii*, foi demonstrado uma significativa diminuição da replicação do parasita (Oura *et al*, 1993). Células do cordão umbilical de ovelhas foram tratadas com IFN- γ recombinante de bovinos e foi observado bloqueio no crescimento do *T. gondii* (Dimier & Bolt, 1997). Células de cordão umbilical humano foram pré-incubaram com IFN- γ recombinante (rIFN- γ) e em seguida infectadas com taquizoítos da cepa RH, demonstrando que ocorre uma drástica inibição do *T. gondii*, sendo este efeito dose-dependente (Woodman *et al*, 1991). Foi provado que a replicação do *T. gondii* em células de enterócitos de ratos e células epiteliais do intestino humano pode ser inibidas pelo tratamento das células com IFN- γ , isto pode ser relevante pois são as primeiras linhas de defesa contra a infecção pelo *Toxoplasma* (Dimier & Bolt, 1993; Dimier & Bolt, 1997).

A produção de TNF- α nos animais imunizados com taquizoítos irradiados foi similar aos camundongos cronicamente infectados, e menor do que nas fases agudas da infecção. Esta citocina foi descrita como sendo importante o controle

da replicação dos taquizoítos durante a fase crônica e aguda da infecção. Em camundongos altamente resistentes à infecção aguda com a cepa ME-49 de *T. gondii*, após o inóculo de anticorpos anti-TNF- α ocorre um aumento significativo do número de taquizoítos na cavidade peritoneal e em camundongos susceptíveis ocorre mortalidade dos animais (Johnson, 1992).

Quando camundongos cronicamente infectados com *T. gondii* cepa ME-49 e tratados com anticorpos anti-TNF- α o resultado é uma rápida e letal reativação da toxoplasmose crônica, com severas lesões cerebrais (Gazzinelli *et al*, 1993c). Camundongos protegidos da infecção letal através do inóculo com cepa não virulenta, demonstraram que a ativação imune na infecção esta associada à produção de altos níveis de IFN- γ , TNF- α e NO (Haque *et al*, 1999). Camundongos foram inoculados com TNF- α recombinante e infectados com a cepa letal C56 de *T. gondii*, demonstrando que o tratamento com a citocina diminuiu a mortalidade dos animais durante o início da infecção (Chang *et al*, 1990). Células microgliais humanas e de camundongos são ativadas por IFN- γ e TNF- α , inibindo a replicação de taquizoítos e o TNF- α têm se mostrado importante na prevenção da proliferação dos taquizoítos no cérebro de camundongos (Gazzinelli *et al*, 1993a). A neutralização do TNF- α com anticorpos monoclonais induz eliminação da resposta de células do baço em camundongos "SCID" expostos ao parasita, demonstrando também que células esplênicas aderentes produzem baixos níveis de TNF- α em resposta ao *T. gondii* e que esta citocina sozinha não é suficiente para desencadear a produção de IFN- γ (Sher *et al*, 1993).

As interleucinas-10 (IL-10) e IL-12 estão relacionadas à fase inicial de infecção e têm pouca importância durante a fase crônica, sendo as duas maiores antagonistas na regulação da síntese de IFN- γ (Denkers & Gazzinelli, 1998). A IL-12 é citocina que mais promove a síntese de IFN- γ pelas células NK e linfócitos T (Biron & Gazzinelli, 1995). A produção de IL-12 pelas células esplênicas dos camundongos imunizados foi menor que nos camundongos agudamente infectados, mas semelhante ao produzido pelo animal em fase crônica. O tratamento de camundongos (SCID) com anti-IL-12 ou anti-IFN- γ , demonstrou que houve mortalidade precoce dos animais, e quando camundongos B6 agudamente infectados foram tratados com anti-IL-12 houve 100% de mortalidade após 15 dias do desafio, enquanto todos os animais do grupo controle sobreviveram (Gazzinelli *et al*, 1994). A administração de IL-12 em camundongos (SCID) infectados com a cepa ME-49, prolonga a sobrevivência dos animais, mas isto não ocorre quando são tratados com anti-IFN- γ ou as células NK são depletadas (Gazzinelli *et al*, 1993b). Camundongos "gko" (deficientes na produção de IFN- γ) não conseguem sobreviver à infecção aguda pelo *T. gondii* cepa ME-49, apesar de manterem a produção de IL-12, sugerindo que esta citocina funciona induzindo a produção de IFN- γ pelas células NK (Scharton-Kersten *et al*, 1996). A administração de IL-12 em camundongos BALB/C infectados com a cepa virulenta C56 demonstrou que ocorre um aumento na sobrevivência, mas quando os animais são inoculados com anti-IFN- γ , anti-TNF- α ou as células NK são depletadas o tratamento não funciona, e quando camundongos BALB/c foram infectados com a cepa ME-49, todos os animais sobrevivem à infecção, no entanto quando é administrada

anti-IL-12, resulta em mortalidade de 100%, com diminuição dos níveis de IFN- γ , demonstrando a importância da IL-12 na fase aguda da infecção em camundongos imunocompetentes (Hunter *et al*, 1995). Em trabalho recente, camundongos deficientes de IL-12 foram desafiados com a cepa ME-49, sendo administrado IL-12 recombinante nos animais durante as duas primeiras semanas de infecção, e como esperado os animais sobreviveram da fase aguda e foi estabelecida a fase crônica, no entanto, 45-50 dias após a infecção houve um aumento do número de cistos cerebrais e todos os animais morreram de encefalite, sugerindo que a IL-12 endógena é necessária também para manter em longo prazo a resistência dependente de IFN- γ contra o *T. gondii* (Yap *et al*, 2000).

A citocina IL-10 foi identificada por inibir a síntese de IFN- γ pelos linfócitos Th1 sendo produzida por células Th2 (Fiorentino *et al*, 1989) e inibe a produção de várias citocinas por macrófagos ativados (Fiorentino *et al*, 1991). Em nossos ensaios não houve diferenças significantes na produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e infectados com a cepa ME-49. Camundongos infectados com a cepa ME-49 de *T. gondii* apresentam encefalite e ocorre 100% de mortalidade após 12 a 15 semanas, sendo localizados nos cérebros dos animais níveis elevados de mRNA do parasita (Gazzinelli *et al*, 1993c). Análise imuno-histoquímica no cérebro de camundongos suscetíveis para o desenvolvimento de encefalite apresentam níveis elevados de IL-10, o que não ocorre com camundongos infectados e resistentes a encefalite (Hunter *et al*, 1994). Estes resultados têm demonstrado que esta citocina é uma das maiores candidatas a favorecer a susceptibilidade para encefalite pela capacidade de inibir a atividade protetora

do IFN- γ (Hunter & Remington, 1994). Camundongos KO ("knockout") para IL-10 foram inoculados com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii* e todos os animais morreram nas duas primeiras semanas de infecção, com níveis elevados de IL-12 e IFN- γ no soro. Quando os linfócitos CD4⁺ (fonte de IFN- γ) dos camundongos KO infectados eram neutralizados ocorria um aumento na sobrevivência dos animais, indicando o papel destas células na mortalidade precoce dos animais (Gazzinelli *et al*, 1996). Estes dados corroboram com os obtidos por outros autores, que utilizaram animais deficientes em IL-10 (camundongos IL-10^{-/-}), demonstrando que a IL-10 está associada com a proteção e o aumento da susceptibilidade à infecção pelo *T. gondii*, sendo dependente do animal possuir linfócitos e que ambos, IL-12 e IFN- γ são importantes na mortalidade precoce dos animais (Neyer *et al*, 1997).

O desenvolvimento de vacinas contra a infecção pelo *T. gondii* é baseada no fato de que uma exposição primária resulta na maioria dos casos em uma completa resistência para um segundo desafio, mas a resistência durante a infecção ocorre pela presença de cisto (bradizoítos) em muitos tecidos do hospedeiro. Estudos de imunização têm sido realizados utilizando taquizoítos de *T. gondii* inativados sozinhos ou em adjuvante incompleto de Freund, sendo demonstrado que estes não protegem ovelhas prenhes de novos desafios (Buxton & Innes, 1995). Vários estudos têm sido realizados utilizando camundongos e ratos imunizados com extratos ou antígenos específicos do parasita, como SAG1 (p30), GRA2 (gp28.5) e GRA5 (p21), conferindo proteção parcial contra o desafio com cistos teciduais ou taquizoítos. Foi utilizado um peptídeo antigênico derivado do antígeno P30 de *T. gondii* para imunizar camundongos, mas este não conferiu proteção aos animais quando

desafiados com a cepa 76K (Darci *et al*, 1992). Camundongos foram imunizados com os antígenos P30 e P22 de *T. gondii* incorporados em complexos imuno-estimulantes e desafiados com taquizoítos ou oocisto, conseguindo aumento de sobrevivência, no entanto o número de cistos encontrados foi semelhante ao grupo controle (Lunden *et al*, 1993). A proteína SAG1 de *T. gondii* em associação com toxina da cólera, induziu diminuição do número de cistos cerebrais após desafio com a cepa 76K de *T. gondii* (Debard *et al*, 1996; Velge-Roussel *et al*, 2000).

Recentemente, têm sido utilizados antígenos recombinantes de taquizoítos ou plasmídeos que codificam antígenos de taquizoítos para imunizar animais contra o *T. gondii*. A proteína recombinante rSAG1 (expressa em *E. coli*) associada a IL-12 foi utilizada para imunizar camundongos e demonstrou-se que ocorre uma redução de 40% nos cistos cerebrais (Letscher-Bru *et al*, 1998). Quando camundongos foram imunizados com a proteína rSAG1 com Al(OH)₃ como adjuvante houve proteção parcial dos animais quando desafiados com taquizoítos e o número de cistos foi semelhante ao grupo controle nos desafiados com cepas cistogênicas (Petersen *et al*, 1998). O *Micobacterium bovis* (BCG) foi manipulado para que produzisse e secretasse GRA1, antígeno de *T. gondii* e utilizado para imunizar camundongos, no entanto, houve mortalidade de 100% dos animais quando desafiados com a cepa 76K (Supply *et al*, 1999). Camundongos imunizados com cDNA codificando o antígeno de superfície de *T. gondii* SAG1 (p30) foram desafiados com a cepa cistogênica ME-49 e houve uma diminuição do número de cistos cerebrais, mas quando os animais foram desafiados com taquizoítos da cepa RH não houve proteção significativa (Angus *et al*, 2000). A capacidade da

proteína de superfície SAG2 de *T. gondii* para proteger camundongos foi estudada utilizando SAG2 recombinante ou associada a "ISCOMS", e nenhum efeito foi observado, ou houve mortalidade precoce quando dos animais em relação ao grupo controle (Lunden *et al*, 1997). Desolme e colaboradores (2000) imunizaram camundongos com pGRA4 (DNA com plasmídio que codifica o gene GRA4 de *T. gondii*) e desafiaram os animais com uma dose letal da cepa 76K, demonstrando que houve sobrevivência de 62% dos animais, mas com cistos cerebrais em todos os animais. Outro ensaio de imunização utilizando vacinas de DNA com genes que codificam antígenos de *T. gondii* (GRA1, GRA7 e ROP2) foram realizados, demonstrando que ocorre pouca proteção em camundongos desafiados com a cepa 76K e quando os animais foram desafiados com doses não letais da cepa IPB-G houve pouca diminuição do número de cistos (Vercammen *et al*, 2000). Imunizações utilizando extratos, antígenos nativos, antígenos recombinantes ou seqüências de DNA que codificam proteínas de taquizoítos induziram pouca proteção, seja para prevenir a mortalidade ou na diminuição do número de cistos, embora a comparação com nossos dados seja difícil, pois foram utilizados camundongos de várias cepas, parasitas de diferentes estágios (taquizoítos, cistos e oocistos) e cepas. As vias de inóculo e medidas de proteção também não foram semelhantes.

A imunização com parasitas vivos têm sido utilizada para proteger animais da infecção pelo *T. gondii*, principalmente cepas mutantes que não produzem cistos, como a vacina comercial para ovelhas (Toxovax) que faz uso de taquizoítos da cepa S48 (Buxton, 1993). Camundongos imunizados com a cepa não virulenta PTN de *T. gondii* são protegidos de desafio i.p. com a cepa

PLK, com produção de níveis elevados de IFN- γ e TNF- α (Haque *et al*, 1999). Outra cepa de *T. gondii* ts-4 foi testada na imunização de diversos grupos de animais. Camundongos foram imunizados com taquizoítos da cepa ts-4 e desafiados com oocistos da cepa M-7741, demonstrando que 88% sobrevivem a infecção, mas a contagem de cistos e o grau de lesão no cérebro e outros órgãos não foi realizada (Waldeland & Frenkel, 1983). Quando suínos foram imunizados com taquizoítos de ts-4 e desafiados com oocistos da cepa GT-1, houve formação de cistos teciduais em todos os animais, demonstrando que não houve proteção significativa (Lindsay *et al*, 1993; Pinckney *et al*, 1994). Macacos (*Aotus lemurinus*) foram utilizados como modelo experimental da vacina com ts-4, demonstrando que não ocorre proteção dos animais quando desafiados com cistos da cepa T265 ou T163 (Escajadillo & Frenkel, 1991). Apesar de imunizações com parasitas vivos não persistentes e não virulentos terem apresentado resultados razoáveis na imunização de animais contra o *T. gondii*, há necessidade do hospedeiro possuir o sistema imune intacto para resistir a imunização com estes parasitas, como foi demonstrado em modelos utilizando camundongos (Sayles & Johnson, 1996).

Recentemente taquizoítos de *T. gondii* cepa RH foram modificados geneticamente, necessitando de suplementação de uracil para se replicar em cultura. Camundongos BALB/c e gko (deficientes de IFN- γ) inoculados com estes parasitas não apresentam mortalidade e quando os camundongos BALB/c são desafiados i.p. com taquizoítos de *T. gondii* cepa RH todos os animais sobrevivem (Fox & Bzik, 2002). Apesar dos resultados obtidos existe a necessidade de se testar a proteção dos animais contra desafios orais, pois são estes as fontes de infecção para a toxoplasmose. Embora esta cepa

geneticamente modificada não tenha causado dano em camundongos deficientes de IFN- γ , trata-se de organismos viáveis, podendo não ser eficiente quando o hospedeiro apresenta outro problema imune, deficiência em células B por exemplo, como demonstrado em camundongos por serem essenciais para induzir resistência a animais vacinados contra cepas virulentas (Sayles *et al*, 2000).

A irradiação de taquizoítos de *T. gondii* foi realizada por alguns autores demonstrando que camundongos imunizados com taquizoítos irradiados não morrem quando são desafiados com taquizoítos da cepa RH, esta proteção foi de 100% em alguns ensaios (Seah & Hucal, 1975; Bakal & Veld, 1979; Chhabra *et al*, 1979). Camundongos imunizados com taquizoítos irradiados da cepas RH e Beverley foram desafiados com taquizoítos da cepa RH, demonstrando que a sobrevivência foi respectivamente de 100% e 80%, sendo que todos os animais não imunizados morreram, no entanto, quando gatos foram imunizados com as cepas RH e Beverley houve proteção parcial dos animais, pois alguns gatos imunizados com a cepa Beverley não liberaram oocistos em suas fezes (Omata *et al*, 1996). Na dissertação de mestrado realizamos ensaios para estabelecer a menor dose de radiação para esterilizar os taquizoítos de *T. gondii*, analisando o poder de invasão *in vitro* e *in vivo*, bem com ensaios metabólicos dos parasitas irradiados (Hiramoto, 1998). Atualmente verificamos a resposta imune celular e humoral em camundongos imunizados, comparando com animais agudamente e cronicamente infectados, bem como o grau de proteção induzida por taquizoítos irradiados no animais contra desafios orais com cepa cistogênica.

Como descrito por outros autores, demonstramos que a imunização com taquizoítos viáveis e funcionais, mas sem a capacidade reprodutiva, proporciona resposta imune semelhante à infecção natural, evitando os problemas associados com a imunização antígenos isolados (Reina-San-Martin *et al*, 2000).

A imunidade induzida pela infecção por *T. gondii* é complexa, com produção de anticorpos e imunidade celular, mas os tecidos permanecem viáveis durante a maioria da vida do hospedeiro. Existem dúvidas se a infecção aguda promove imunidade ou se somente elimina os sinais clínicos de uma nova infecção, com anticorpos específicos opsonizando taquizoítos para fagocitose com subsequente morte, mas com circulação de parasitas viáveis (Asensi *et al*, 1993).

A irradiação de taquizoítos de *T. gondii* pode ser uma alternativa extremamente promissora no desenvolvimento de vacinas.

6 – CONCLUSÕES

Geral

Os taquizoítos de *T. gondii* irradiados com raios γ induzem resposta imune em camundongos imunizados, semelhante a infecção crônica, com proteção parcial, quando os animais são desafiados com a cepa ME-49, apresentando diminuição das patologias cerebrais e do número de cistos.

Específicas

Ocorre produção de anticorpos IgG específicos em camundongos imunizados com taquizoítos irradiados, sendo que estes reconhecem frações antigênicas do parasita.

O soro de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados inibe a invasão dos taquizoítos em cultura de células LLC-MK2.

Os camundongos imunizados com taquizoítos irradiados não apresentam infecção e os parasitas não são encontrados nos cérebros dos animais.

Camundongos imunizados com taquizoítos irradiados e desafiados com cepa cistogênica apresentam poucas patologias e pequeno número de cistos no cérebro, quando comparados com animais cronicamente infectados.

Esplenócitos de camundongos imunizados com taquizoítos irradiados apresentam resposta linfo-proliferativa semelhante a da infecção natural, quando estimulados com antígeno de *T. gondii*, havendo cooperação celular *in vitro* para a produção de anticorpos específicos.

Os níveis de citocinas (IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α) produzidas por células esplênicas, estimuladas com antígenos de *T. gondii*, em camundongos imunizados com taquizoítos irradiados com 255 Gy são similares a de animais com infecção crônica.

7 – BIBLIOGRAFIA

- ABBAS, K.A., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. (1994). Cellular and Molecular Immunology. 2 ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 320-334.
- AKSTEIN, R.B., WILSON L.A. & TEUTSCH, S.M. (1982). Acquired toxoplasmosis. *Ophthalmology*, **89**: 1299-1302.
- ALEXANDER, J. & HUNTER, C.A. (1998). Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chem. Immunol. Basel.*, **70**: 81-102.
- AMADORI, A., DE ROSSI, A., CHIECO-BIANCHI, L., GIANQUITO, C., DE MARIA, A. & ADES, A.E. (1990). Diagnosis of human immunodeficiency virus 1 infection in infants: in vitro production virus-specific antibody in lymphocytes. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **9**: 26-30.
- AMATO NETO, V., MEDEIROS, E.A.S., LEVI, G.C. & DUARTE, M.I.S. (1995). Toxoplasmose. 4ª edição. Savier Editora de Livros Médicos – São Paulo.
- ANDERSON JR, S.E., BAUTISTA, S.C. & REMINGTON, J.S. (1976). Specific antibody-dependent killing of *Toxoplasma gondii* by normal macrophages. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**: 375-380.
- ANGUS, C.W., KLIVINGTON-EVANS, D., DUBEY, J.P. & KOVACS, J.A. (2000). Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *J Infect Dis.*, **181**:317-24.
- ANTUNES, CM.F., KATZ, N., ANDRADE, R.M., NETO, E.M. & LIMA, J.M. (1971). Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **13**: 383-386.

- ARAUJO, F.G. (1994). Immunization against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*, **10**: 358-360.
- ASENSI, V., CARTON, J. A., MARADONA, J. A., ONA, M., ARRIBAS, J. M. (1993). Clinical value of blood cultures for detection of *Toxoplasma gondii* in human immunodeficiency virus-seropositive patients with and without cerebral lesions on computerized tomography. *Clin. Infect. Dis.*, **17**: 511-512.
- BAKAL, P.M. & VELD, N. (1979). Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. *Z.Parasitenkd.*, **59**: 211-217.
- BEAMAN, M.H., McCABE, R.E., WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S. (1995) - *Toxoplasma gondii*. In: Mandell, G.L., Benett, J.E. & Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. Vol.2., 4th edition, Churchill Livingstone, p:2455-2475.
- BEAMAN, M.H., WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S.(1992). Cytokines, *Toxoplasma* and Intracellular Parasitism. *Immunol. Rev.*, **17**: 96-117.28
- BENENSON, M.W., TAKAFUJI, E.T., LEMON, S.M., GREENUP, R.L. & SULZER, A.J. (1982). Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *N. Engl. J. Med.*, **307**: 666-669.
- BERDOY, M., WEBSTER, J.P. & MACDONALD, D.W. (2000). Fatal attraction in rats infected with *Toxoplasma gondii*. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **267**: 1591-1594.
- BERDOY, M., WEBSTER, J.P. & MACDONALD, D.W. (1995). Parasite-altered behaviour: is effect of *Toxoplasma gondii* on *Rattus norvegicus* specific?. *Parasitology*, **111**:403-409

- BERNSTEEN, L., GREGORY, C.R., ARONSON, L.R., LIRTZMAN, R.A. & BRUMMER, D.G. (1999). Acute toxoplasmosis following renal transplantation in three cats and a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **215**: 1123-1126.
- BIANCIFIORI, F., RONDINI, C., GRELLONI, V. & FRESCURA, T. (1986). Avian toxoplasmosis: experimental infection of chicken and pigeon. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **9(4)**: 337-346.
- BIRON, C.A. & GAZZINELLI, R.T. (1995). Effects of IL-12 on immune responses to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. *Curr. Opin. Immunol.*, **7**:485-496.
- BISSON, A., MALEY, S., RUBAIRE-AKIKI, C.M. & WASTLING, J.M. (2000). The seroprevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in domestic goats in Uganda. *Acta Tropica*, **76**: 33-38.
- BLEGGI-TORRES, L.F., DE MEDEIROS, B.C., WERNER, B., NETO, J.Z., LODDO, G., PASQUINI, R. & DE MEDEIROS, C.R. (2000). Neuropathological findings after bone marrow transplantation: an autopsy study of 180 cases. *Bone Marrow Transplant.*, **25**:301-7.
- BONAMETTI, A.M., PASSOS, J.N., SILVA, E.M.K. & BORTOLIERO, A.L. (1997). Surto de toxoplasmose aguda transmitida através da ingestão de carne crua de gado ovino. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, **30**: 21-25.
- BOOTH, K.S., JAMES, E.R. & POPIEL, I. (1996). Cryopreservation of an attenuated vaccine strain of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Cryobiology*, **33**: 330-337.
- BOSH-DRIESSEN, L.H., KARINI, S., STILMA, J.S. & ROTHOVA, A. (2000). Retinal detachment in ocular toxoplasmosis. *Ophthalmology*, **107**: 36-40.

- BOUT, D., MORETTO, M., DIMIER-POISON, I. & GATEL, D.B. (1999). Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. *Immunobiology*, 201: 225-228.
- BOWIE, W.R., KING, A.S., WERKER, D.H., ISAAC-RENTON, J.L., BELL, A., ENG, S.B. & MARION, S.A. (1997). Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet*, **350**: 173-177.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248.
- BRETAGNE, S., COSTA, J.M., KUENTZ, M., SIMON, D., VIDUAD, M., M., FORTEL, I., VERNANT, J.P. & CORDONNIER, C. (1995). Late toxoplasmosis evidenced by PCR in a marrow transplant recipient. *Bone Marrow Transplant.*, **15**: 809-811.
- BURNETT, A.J., SHORTT, S.G., ISAAC-RENTON, J., KING, A., WERKER, D. & BOWIE, W.R. (1998). Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology*, **105**: 1032-1037.
- BUXTON, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis spp.*) in sheep and goats: recent advances. *Vet.Res.*, **29**: 289-310.
- BUXTON, D. & INNES, E.A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110 (Suppl): S11-S16.
- BUXTON, D.(1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today*, **9**: 335-337.
- CAMARGO, M.C.V., ANTUNES, C.M.F. & CHIARI, C.A.(1995). Epidemiologia da infecção por *Toxoplasma gondii* no município de Ribeirão das Neves,

- MG. I. Importância dos animais domésticos como fonte de infecção do *T. gondii* para o homem. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, **28**: 211-214.
- CAMARGO M.E, FERREIRA A.W., MINEO J.R., TAKIGUTI C.K., NAKAHARA O.S. (1978). Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. *Infect. Immun.*, **21**, 55-8
- CAMARGO, M.E. & LESER, P.G. (1976). Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutive study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, **18**:227-38.
- CANDOLFI, E., HUNTER, C.A. & REMINGTON, J.S. (1995). Roles of gamma interferon and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferation response to concanavalin A and *Toxoplasma* antigen during acute toxoplasmosis. *Infect. Immun.*, **63**: 751-756.
- CANDOLFI, E., HUNTER, C.A. & REMINGTON, J.S. (1994). Mitogen- and antigen-specific proliferation of T cells in murine toxoplasmosis is inhibited by reactive nitrogen intermediates. *Infect. Immun.*, **62**: 1995-2001.
- CARDI, B.A., NASCIMENTO, N., ANDRADE Jr, H.F.(1998). Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma rays induces its uptake by macrophages through scavenger receptors. *Int. J. Radiat. Biol.*, **7**: 557-564.
- CARTER, A.O., FRANK, W.W. (1986). Congenital toxoplasmosis: Epidemiologic features and control. *Can. Med. Assoc. J.*, **135**: 618-623.

- CASSEB, J.S.R. & CATERINO-DE-ARAUJO, A. (1994). Dificuldade no diagnóstico de infecção primária atípica por HIV-1. Relato de um caso. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **36**: 287-292.
- CATERINO-DE-ARAUJO, A. (1992). Rapid *in vitro* detection of HIV-1-specific antibody secretion by cells-culture with virus antigens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **87**: 239-247.
- CHANG, G.N., TSAI, S.S., KUO, M. & DUBEY, J.P.(1991). Epidemiology of swine toxoplasmosis in Taiwan. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Helth*, **22 (Suppl)**: 111-114.
- CHANG, H.R., GRAU, G.E. & PECHÈRE, J.C.(1990). Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology*, **69**: 33-37.
- CHATTERJEE, S., FRANÇOIS, G., DRUILLE, P., TIMPERMAN, G. & WÉRY, M. (1996). Immunity to *Plasmodium berghei* exoerythrocytic forms derived from irradiated sporozoites. *Parasitol. Res.*, **82**: 297-303.
- CHHABRA, M.B., MAHAJAN, R.C. & GANGULY, N.K.(1979). Effects of ⁶⁰Co irradiation on virulent *Toxoplasma gondii* and its in experimental immunization. *Int. J. Radiat. Biol.*, **35**: 433-440.
- CHOI, W.Y., NAM, H.W., HUH, W., KIM, Y.R., KANG, M.W., SHO, S.Y., DUBEY, J.P. (1997). Foodborn outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, **175**: 1280-1282.
- CLARK JD. (1996). Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, D.C.: National Academy Press.
- CLUMECK, N., SONNET, J., TAELEMAN, H., MASCART-LEMONE, F., DE BRUYERE. M., VANDEPERRE, P., DASNOY, J., MARCELIS, L., LAMY,

- M., JONAS, C. (1984). Acquired immunodeficiency syndrome in African patients. *N Engl. J. Med.*, **310**:492-497.
- COOK, A.J.C., GILBERT, R.E., BUFFOLANO, W., ZUFFEREY, J., PETERSEN, E., JENUM, P.A., FOULON, W., SEMPRINI, A.E., DUNN, D.T. (2000). Sources of Toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. *BMJ.*, **321**: 142-147.
- COUTO, W.J., BRANCO, J.N.R., ALMEIDA, D., CARVALHO, A.C., VICK, R., TELES, C.A., AGUIAR, L.F. & BUFFOLO, E. (2001). Transplante cardíaco e infecção. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*, **16**: 141-151.
- D'ANDREA, A., ASTE-AMEZAGA, M., VALIANTE, N.M., MA, X., KUBIN, M. & TRICHERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma- production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, **178**: 1041-1048.
- DAGHER, R. & LUCAS, K. (1996). Toxoplasmosis in the patients with cancer. *Infect. Med.*, **13**: 998-1000.
- DARCY, F., MAES, P., GRAS-MASSE, H., AURIAULT, C., BOSSUS, M., DESLEE, D., GODARD, I., CESBRON, M.F., TARTAR, A. & CAPRON, A.(1992). Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.*, **149**: 3636-3641.
- DE TITTO, E.H., CATTERALL, J.R. & REMINGTON, J.S. (1986). Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, **137**: 1342-1345.
- DEBARD, N., BUZONI-GATEL, D. & BOUT, D. (1996). Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin

- dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect. Immun.*, **64**: 2158-2166.
- DENKERS, E.Y. (1999). T-lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.*, **1**: 699-708.
- DENKERS, E.Y. & GAZZINELLI, R.T. (1998). Regulation and function of T-Cell-Mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**: 569-588.
- DEROUIN, F. (2001). Anti-toxoplasma drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **2**: 1368-1374.
- DEROUIN, F., GLUCKMAN, E., BEAUVAIS, B., DEVERGIE, A., MELO, R., MONNY, M. & LARIVIERE, M.(1986). *Toxoplasma* infection after human allogenic bone marrow transplantation: clinical and serological study of 80 patients. *Bone Marrow Transplant.*, **1**: 67-73.
- DESOLME, B., MÉVÉLEC, M.N., BUZONI-GATEL, D. & BOUT, D. (2000). Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine*, **18**: 2512-2521.
- DEVADA, K., ANANDAN, R. & DUBEY, J.P. (1998). Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in chickens in Madras, India. *J. Parasitol.*, **84**: 621-622.
- DIMIER, I.H. & BOUT, D.T. (1997). Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in IFN-gamma-activated human intestinal epithelial cells. *Immunol. Cell. Biol.*, **75**: 511-514.
- DIMIER, I.H. & BOUT, D.T.(1993). Co-operation of interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunology*, **79**: 336-338.

- DUARTE, M.I.S. & ANDRADE JR., H.F.(1994). – Toxoplasmose. In: Brasileiro Fo, G., Pitella, J.E.H., Pereira, F.E.L., Bambirra, E.A. & Barbosa, A.I.A.(eds). Bogliolo Patologia, 5ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 1161-1168.
- DUBEY, J.P.(1993). Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P.(ed.) Parasitic Protozoa, vol VI, Academic Press, New York, pp. 1-57.
- DUBEY, J.P.(1991). Toxoplasmosis - An overview. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public.Helth*, **22 (Suppl)**: 88-119.
- DUBEY, J.P. (1987). Toxoplasmosis in goats. *Agri-Practice*, **8**:43-52.
- DUBEY, J.P. (1986). A review of toxoplasmosis in cattle. *Vet. Parasitol.*, **22**: 177-202.
- DUBEY, J.P. & THAYER, D.W. (1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. *J. Parasitol.*, **80**: 764-767.
- DUBEY, J.P. & ADAMS, D.S. (1990). Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in dairy goats from 1982 to 1984. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **196**: 295-296.
- DUBEY, J.P. & BEATTIE, C.P. (1988). In: Toxoplasmosis of animals and Man pp.220. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- DUBEY, J.P. & SHARMA, S.P. (1980). Parasitemina and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J.Parasitol.*, **66**: 111-114.
- DUBEY, J.P., THULLIEZ, P., ROMAND, S., KWOK, O.C.H., SHEN, S.K. & GAMBLE, H.R. (1999). Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. *Vet. Parasitol.*, **86**: 235-238.

- DUBEY, J.P., THAYER, D.W., SPEER, C.A. & SHEN, S.K. (1998a). Effect of gamma irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int.J.Parasitol.*, **28**: 369-75
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. & SPEER, C.A. (1998b). Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.*, **11**: 267-299.
- DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., THAYER, D.W., KWOK, O.C.H. & SHEN, S.K.(1996). Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. *J. Parasitol.*, **82**: 724-727.
- DUBEY, J.P., GOODWIN, M.A., RUFF, M.D., KWOK, O.C., SHEN, S.K., WILKINS, G.C. & THULLIEZ, P. (1994a). Experimental toxoplasmosis in Japanese quail. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**: 216-221.
- DUBEY, J.P., RUFF, M.D., WILKINS, G.C., SHEN, S.K. & KNOK, O.C. (1994b). Experimental toxoplasmosis in pheasants (*Phasianus colchicus*). *J. Wildl. Dis.*, **30**: 40-45.
- EGAN, J.E., HOFFMAN, S.L., HAYNES, J.D., SADOFF, J.C., SCHNEIDER, I., GRAU, G.E., HOLLINGDALE, M.R., BALLOU, W.R. & GORDON, D.M. (1993). Humoral immune responses in volunteers immunized with irradiated *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **49**: 166-173.
- EL-GHAYSH. (1998). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Egyptian donkeys using ELISA. *Vet. Parasitol.*, **80**: 71-73.
- ESCAJADILLO, A. & FRENKEL, J.K. (1991). Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus Monkeys. *Am. J. Trop. Med.Hyg.*, **44**: 382-389.

- FADUL, C.E., CHANNON, J.Y. & KASPER, L.H. (1995). Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. *Infect. Immun.*, **63**: 4290-4294.
- FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M. & O'GARRA, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, **147**: 3815-3822.
- FIORENTINO, D.F., BOND, M.W. & MOSMANN, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.*, **170**: 2081-2095.
- FLEGR, J., ZITKOVÁ, S., KODYM, P. & FRYNTA, D. (1996). Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*, **113**: 49-54.
- FOX, B.A. & BZIK, D.J. (2002). De novo pyrimidine biosynthesis is required for virulence of *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **415**: 926-929.
- FRENKEL, J.K. & TAYLOR, D.W. (1982). Toxoplasmosis in immunoglobulin M-suppressed mice. *Infect Immun.*, **38**: 360-7.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P. & MILLER, N.L. (1970). *Toxoplasma gondii* in cats: Fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science*, **167**: 893-896.
- FREYRE, A., BONINO, J., FALCÓN, J., CASTELLS, D., CORREA, O. & CASARETTO, A. (1999). The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, **81**: 85-88.
- FUHRMAN, S.A. & JOINER, K.A. (1989). *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement-mediated killing. *J. Immunol.*, **142**: 940-947.
- GARCIA, J.S., NAVARRO, I.T., OGAWA, L., OLIVEIRA, R.C., GARCIA, S.M.F. & LEITE, J. (1999). Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular

pela tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.*, **32**: 671-676.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HIENY, S., SCHARTON-KERSTEN, T., CHEEVER, A., KUHN, R., MULLER, W., TRINCHIERI, G. & SHER, A. (1996). In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.*, **157**: 798-805.

GAZZINELLI, R.T., WYSOCKA, M., HAYASHI, S., DENKERS, E.Y., HIENRY, S., CASPAR, TRINCHIERI, G. & SHER, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- γ synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **153**: 2533-2543.

GAZZINELLI, R.T., DENKERS, E.Y. & SHER, A. (1993a). Host resistance to *Toxoplasma gondii*: Model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasites. *Infect. Agents Dis.*, **2**:139-149.

GAZZINELLI, R.T., HIENRY, S., WYNN, T.A., WOLF, S. & SHER, A. (1993b). Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon γ by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 6115-6119.

GAZZINELLI, R.T., ELTOUM, I., WYNN, T.A. & SHER, A. (1993c). Acute cerebral toxoplasmosis is induced by *in vivo* neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. *J. Immunol.*, **151**: 3672-3681.

- GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., JAMES, S.L. & SHER, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.*, **148**: 1792-1796.
- GELLIN, B.C. & SOAVE, R. (1992). Coccidian infections in AIDS. *Med. Clin. North Am.*, **76**: 205-234.
- GILBERT, J.M., FULLER, A.L., SCOTT, T.C. & McDOUGALD, L.R. (1998). Biological effects of gamma-irradiation on laboratory and field isolates of *Eimeria tenella* (Protozoa; Coccidia). *Parasitol. Res.*, **84**: 437-441.
- GILBERT, R.E., STANFORD, M.R., HOLLIMAN, R.E. & SANDERS, M.D. (1995). Incidence of acute symptomatic toxoplasma retinochoroiditis in south London according to country of birth. *BMJ*, **310**: 1037-1040.
- 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. & BELFORT JUNIOR, R. (1992). An unusually high prevalence of ocular toxoplasmosis in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.*, **114**: 136-144.
- GONDIM, L.F.P., BARBOSA Jr., H.V., RIBEIRO FILHO, C.H.A., SAEKI, H. (1999). Serological survey of antibodies to *Toxoplasma gondii* in goats, sheeps, cattle and water buffaloes in Bahia State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, **82**: 273-276.
- GORMLEY, P.D., PAVESIO, C.E., LUTHERT, P. & LIGHTMAN, S. (1999). Retinochoroiditis is induced by oral administration of *Toxoplasma gondii* cysts in the hamster model. *Exp. Eye Res.*, **68**: 657-661.
- GOTTSTEIN, B. (1995). *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, **65**: 89S-95S.

- GRIMWOOD, J. & SMITH J.E.(1996). *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasion. *Int. J. Parasitol.*, **26**: 169-173.
- GUERINA, N.G., HSU, H.W., MEISSNER, H.D., MAGUIRE, J.H., LYNFIELD, R., STECHENBERG, B., ABROMS, I., PASTERNAK, M., HOFF, R., EATON, R.B., GRADY, G.F. & NEW ENGLAND REGIONAL TOXOPLASMA WORKING GROUP. (1994). Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *N.Engl.J. Med.*, **330**: 1858-1863.
- GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAY, M., BORGES, M.M., TOLEZANO, J.E. & ANDRADE JR, H.F.(1993). Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **35**: 479-483.
- HALONEN, S.K., CHIU, F.-C. & WEISS, L.M. (1998). Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect.Immun.*, **66**: 4989-4993.
- HAQUE, S., FRANCK, J., DUMON, H., KASPER, L.H. & HAQUE, A. (1999). Protection against Lethal Toxoplasmosis in Mice by an Avirulent Strain of *Toxoplasma gondii*: Stimulation of IFN- γ and TNF- α a Response. *Exp. Parasitol.*, **93**: 231-240.
- HAVLICEK, J., GASOVÁ, Z., SMITH, A.P., SVÁRA, K. & FLERG, J. (2001). Decrease of psychomotor performance in subjects with latent 'asymptomatic' toxoplasmosis. *Parasitology*, **122**: 515-520.

- HERWALDT, B.L. & JURANEK, D.D. (1993). Laboratory-acquired malaria, leishmaniasis, trypanosomiasis and toxoplasmosis. *Am.J.Trop.Med. Hyg.*, **48**: 313-323.
- HILALI, M., ROMAND, S., THULLIEZ, P., KWOK, O.C.H. & DUBEY, J.P. (1998). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet. Parasitol.*, **75**: 269-271.
- HIRAMOTO, R.M. (1998). Efeitos da radiação ionizante sobre a estrutura, metabolismo e infecciosidade de um protozoário patogênico, *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908). Dissertação de Mestrado. IPEN/USP.
- HIRAMOTO, R.M., MAYRBAURL-BORGES, M., GALISTEO JR., A.J., MEIRELES, L.R., MACRE, M.S. & ANDRADE JR., H.F. (2001). Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese. *Rev. Saúde Pública*, **35**: 113-118.
- HRDÁ, S., VOTÝPKA, J., KODYM, P. & FLEGR, J. (2000). Transient nature of *Toxoplasma gondii*-induced behavioral changes in mice. *J. Parasitol.*, **86**: 657-663.
- HSU, H.W., GRADY, G.F., MAGUIRE, J.H., WEIBLEN, B.J. & HOFF, R. (1992). Newborn screening for congenital *Toxoplasma* infection: five years experience in Massachusetts, USA. *Scand. J. Infect. Dis.*, **84(suppl.)**: 59-64.
- HUDSON, L. & HAY, F.(1989). Lymphokines and Cytokines. Practical Immunology. Third edition, Blackwell Scientific Publications, pp. 423-441.
- HUNTER, C.A. & REMINGTON, J.S. (1994). Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.*, **170**: 1057-1067

- HUNTER, C.A., CANDOLFI, E., SUBAUSTE, C., CLEAVE, V.V. & REMINGTON, J.S.(1995). Studies on the role of interleukin-12 in acute murine toxoplasmosis. *Immunology*, **84**: 160-20.
- HUNTER, C.A., LITTON, M.J., REMINGTON, J.S., ABRAMS, J.S. (1994) Immunocytochemical detection of cytokines in the lymph nodes and brains of mice resistant or susceptible to toxoplasmic encephalitis. *J. Infect. Dis.*, **170**: 939-945.
- INSKEEP II, W., GARDINER, C.H., HARRIS, R.K., DUBEY, J.P. & GOLDSTON, R.T. (1990). Toxoplasmosis in Atlantic bottle-nosed dolphins (*Tursiops truncatus*). *J. Wildl. Dis.*, **26**: 377-382.
- ISRAELSKI, D.M. & REMINGTON, J.S.(1993). Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.*, **17(suppl 2)**: S423-S435.
- JANEWAY JR, C.A. & TRAVERS, P. (1997). Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e na doença. 2ª edição. Editora Arte Médicas Sul Ltda, Porto Alegre, pp. 10:5-10:6.
- JENUM, P.A. & STRAY-PEDERSEN, B. (1998). Development of specific immunoglobulins G, M, and A following primary *Toxoplasma gondii* infection in pregnant women. *J. Clin. Microbiol.*, **36**: 2907-2913.
- JOHNSON, A.M., MCDONALD, P.J. & NEOH, S.H. (1983). Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *J. Protozool.*; **30**:351-6.
- JOHNSON, L.L. (1992). A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. *Infect. Immun.*, **60**: 1979-1983.
- JOINER, K.A., FUHRMAN, S.A., MIETTINEN, H.M., KASPER, L.H. & MELLMAN, I. (1990). *Toxoplasma gondii*: fusion competence of

- parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*, **249**: 641-646.
- JONES, J.L., LOPEZ, A., WILSON, M., SCHULKIN, J. & GIBBS, R. (2001). Congenital toxoplasmosis: A review. *Obstet. Gyn. Survey*, **58**: 296-305.
- JONES, T.C. & HIRSCH, J.C.(1972). The Interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **136**: 1173-1194.
- KANETO, C.N., COSTA, A.J., PAULILLO, A.C., MORAES, F.R., MURAKAMI, T.O. & MEIRELES, M.V. (1997). Experimental toxoplasmosis in broiler chicks. *Vet. Parasitol.*, **69**: 203-210.
- KANG, H., REMINGTON, J.S. & SUZUKI, Y. (2000). Decrease resistance of B cell-deficient mice to infection with *Toxoplasma gondii* despite unimpaired expression of IFN- γ , TNF- α , and inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.*, **164**: 2629-2634.
- KASPER, L.H. & BUZONI-GATEL, D. (1998). Some opportunistic parasitic infections in AIDS: Candidiasis, Pneumocystosis, Cryptosporidiosis, Toxoplasmosis. *Parasitol. Today*, **14**: 150-156.
- KASPER, L.H. & MINEO, J.R.(1994) Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Today*, **10**: 184-188.
- KHAN, I.A., MATSURA, T. & KASPER, L.H. (1995). IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasite Immunol.*, **17**: 183-195.
- KHAN, I.A., SMITH, K.A. & KASPER, L.H.(1988). Induction of antigen-specific parasitocidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **141**: 3600-3605.

- KOSKINIEMI, M., LAPPALAINEN, M. & HEDMAN, K.(1989). Toxoplasmosis needs evaluation. *Am. J. Dis. Child.*, **143**: 724-728.
- KRAHENBUHL, J.L., RUSKIN, J. & REMINGTON, J.S.(1972). The use of killed vaccines in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **108**: 425-431.
- LAEMNLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.
- LANGERMANS, J.A.M., HULST, M.E.B.V.B., NIBBERING, P.H., HIEMSTRA, P.S., FRANSEN, L. & FURTH, R.V.(1992). INF- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, **148**: 568-574.
- LARSSON, C.E., JAMRA, L.M.F., GUIMARÃES, E.C., PATTOLI, D.B.G. & SILVA, H.L.L. (1980). Prevalência de toxoplasmose ovina determiada pela reação de Sabin-Feldman em animais de Uruguaiana, RS, Brasil. *Rev. Saúde públ. S.Paulo*, **14**: 582-588.
- LEMES, M., SILVA, M.A., SANTOS, O.R. & ANDRADE JUNIOR, H.F.(1997). Alternative methods in biological Dosimetry: radioinduced apoptosis of blood lymphocytes. IV ENAN Joint Nuclear Conferences, ABS **425**: 41.
- LETSCHER-BRU, V., VILLARD, O., RISSE, B., ZAUKE, M., KLEIN, J.P. & KIEN, T. (1998). Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect. Immun.*, **66**: 4503-4506.
- LIESENFELD, O. (1999). Immune response to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology*, **201**: 229-239.

- LIN, D.B., SU, KE. & YU J.C.(1995). Studies on cryopreservation of *Toxoplasma gondii* and its antigenicity in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **53**(4): 392-396.
- LINDSAY DS, BLAGBURN BL, DUBEY JP. (2002). Survival of nonsporulated *Toxoplasma gondii* oocysts under refrigerator conditions. *Vet. Parasitol.*, **103**:309-313
- LINDSAY, D.S. & BLAGBURN, B.L. (1999). Prevalence of encysted apicomplexans in muscle of raptors. *Vet. Parasitol.*, **80**: 341-344.
- LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L. & DUBEY, J.P. (1993). Safety and results of challenge of weaned pigs given a temperature-sensitive mutant of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol.*, **79**: 71-76.
- LUFT B.J., HAFNER, R., KORZUN, A. H., LEPORT, C., ANTONISKIS, D., BOSLER, E.M., BOURLAND, D.D., UTTAMCHMCHANDANI, R., FUHRER, J., JACOBSON, J., MORLAT, P., VILDE, J.L., REMINGTON, J.S. and Members of the ACTG 077p/ANRS 009 Study Team (1994). Toxoplasmic encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, **329**: 995-1000.
- LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S.(1992). Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, **15**: 211-222.
- LUNDEN, A., PARMLEY, S.F., BENGTSSON, K.L. & ARAUJO, F.G.(1997). Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.*, **83**: 6-9.
- LUNDEN, A., LOVGREN, K., UGGLA, A. & ARAUJO, F.G. (1993). Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with

- LUNDEN, A., LOVGREN, K., UGGLA, A. & ARAUJO, F.G. (1993). Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infect. Immun.*, **61**:2639-43.
- LYNCH, M.J., OBENDORF, D.L., STATHAM, P. & REDDACLIFF, G.L. (1993). An evaluation of a live *Toxoplasma gondii* vaccine in Tammar wallabies (*Macropus eugenii*). *Aust. Vet. J.*, **70**: 352-353.
- MARTINEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V.A., COLÓN, J.I. & CHIRIBOGA, J. (1969). *Trypanosoma cruzi*: effects of Gamma Radiation on growth and infectivity. *Exp. Parasitol.*, **25**: 162-170.
- MARTINO, R., MAERTENS, J., BRETAGNE, S., ROVIRA, M., DECONINCK, E., ULLMANN, A.J., HELD, T. & CORDONNIER, C. (2000). Toxoplasmosis after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, **31**: 1188-1194.
- MASCHKE, M., DIETRICH, U., PRUMBAUM, M., KASTRUP, O., TUROWSKI, B., SCHAEFER, U.W., DIENER, H.C. (1999). Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **23**:1167-1176.
- MAYES, J.T., O'CONNOR, B.J., AVERY, R., CASTELLANI, W. & CAREY, W.(1995). Transmission of *Toxoplasma gondii* infection by liver transplantation. *Clin. Infect. Dis.*, **21**: 511-515.
- MCCABE, R.E., LUFT, B.J. & REMINGTON, J.S. (1984). Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, **150**:961-962.
- McCANNEL, C.A., HOLLAND, G.N., HELM, C.J., CORNELL, P.J., WINSTON, J.V. & RIMMER, T.G. (1996). Causes of uveitis in the general practice of

- ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. *Am. J. Ophthalmol.*, **121**: 35-46.
- MICHAELS, M.G., WALD, E.R., FRICKER, F.J., DEL NIDO, P.J. & ARMITAGE, J. (1992). Toxoplasmosis in pediatric recipients of heart transplants. *Clin. Infect. Dis.*, **14**:847-851.
- MIKAELIAN, I., BOISCLAIR, J., DUBEY, J.P., KENNEDY, S. & MARTINEAU, D. (2000). Toxoplasmosis in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary: two case reports and a serological survey. *J. Comp. Pathol.*, **122**:73-6
- MILLET, P., COLLINS, W.E., BRODERSON, J.R., BATHURST, I., NARDIN, E.H. & NUSSENZWEIG, R.S. (1991). Inhibitory activity against *Plasmodium vivax* sporozoites induced by plasma from *Saimiri* monkeys immunized with circumsporozoite recombinant proteins or irradiated sporozoites. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **45**: 44-48.
- MINEO, J.R., MCLEOD, R., MACK, D., SMITH, J., KHAN, I.A., ELY, K.H. & KASPER, L.H. (1993). Antibody to *Toxoplasma gondii* major surface protein (SAG-1, P30) inhibit infection of host cells and are produced in murine intestine after peroral infection. *J. Immunol.*, **150**: 3951-3964.
- MORRISON, W.I., BLACK, S.J., PARIS, J., HINSON, C.A. & WELLS, P.W. (1982). Protective immunity and specificity of antibody response elicited in cattle by irradiated *Trypanosoma brucei*. *Parasite Immunol.*, **4**: 395-407.
- NETO, E.C., ANETE, E., RUBIM, R., BRITES, A., SCHULTE, J., BECKER, D. & TUUMINEN, T. (2000). High prevalence of congenital toxoplasmosis in Braxil estimated in a 3-year prospective neonatal screening study. *Int. J. Epidemiol.*, **29**: 941-947.

- NEYER, L.E., GRÜNIG, G., FORT, M., REMINGTON, J.S., RENNICK, D. & HUNTER, C.A. (1997). Role of interleukin-10 in regulation of T-cell-independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.*, **65**: 1675-1682.
- NUSSENZWEIG, R.S., VANDENBERG, J.P., MOST, J.P. & ORTON, C.(1969). Specificity of protective immunity procedures by X-irradiated *Plasmodium berghei* sporozoites. *Nature*, **22**: 488-489.
- OKANLA, E.O., STUMPF, J.L. & DUSANIC, D.G. (1982). Resitance of mice immunized with irradiated and lyophilized stages of *Trypanosoma cruzi* to infections with metacyclics. *International. J. Parasitol.*, **12**: 251-256.
- OMATA, Y., AIHARA, Y., KANDA, M., SAITO, A., IGARASHI, I. & SUZUKI, N. (1996). *Toxoplasma gondii*: experimental infection in cats vaccinated with ⁶⁰Co-irradiated tachyzoites. *Vet. Parasitol.*, **65**: 173-183.
- ORJIH, A.U. & NUSSENZWEIG, R.S. (1980). Immunization against rodent malaria with cryopreserved irradiated sporozoites of *Plasmodium berghei*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **29**: 343-347.
- OURA, C.A., INNES, E.A., WASTLING, J.M., ENTRICAN, G. & PANTON, W.R. (1993). The inhibitory effect of ovine recombinant interferon-gamma on intracellular replication of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.*, **15**:535-8.
- OWEN, M.R. & TRESS, A.J. (1998). Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected mouse (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology*, **116**: 299-304.
- PAHWA, S., CHIRMULE, N., LEOMBRUNO, C., LIM, W., HARPER, R., BHALLA, R., PAHWA, R., NELSON, R.P. & GOOD, R.A. (1989). In vitro

- synthesis of human immunodeficiency virus-specific antibodies in peripheral blood lymphocytes of infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**:7532-7536.
- PASSOS, L.N., ARAUJO FILHO, O.F., ANDRADE JUNIOR, H.F. (2000). Toxoplasma encephalitis in AIDS patients in São Paulo during 1988 and 1991. A comparative retrospective analysis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **42**:141-145.
- PAVIA, C.S. (1986). Protection against experimental toxoplasmosis by adoptive immunotherapy. *J. Immunol.*, **137**: 2985-2990.
- PEREIRA, M.F., SILVA, A.O., FERRO, E.A.V. & MINEO, J.R. (1999). Acquired and congenital ocular toxoplasmosis experimentally induced in *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **94**: 103-114.
- PETERSEN, E., POLLAK, A. & REITER-OWONA, I. (2001). Recent trends in research on congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.*, **31**: 115-144.
- PETERSEN, E., NIELSEN, H.V., CHRISTIANSEN, L. & SPENTER, J. (1998). Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*, **16**: 1283-1289.
- PINCKNEY, R.D., LINDSAY, D.S., BLAGBURN, B.L., BOOSINGER, T.R., MCLAUGHLIN, S.A. & DUBEY, J.P. (1994). Evaluation of the safety and efficacy of vaccination of nursing pigs with living tachyzoites of two strains of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.*, **80**:438-448.
- PINHO, J.R.R., CARDI, B.A., ANDRADE Jr, H.F., BARR, P.J., BATHURST, I.C., VICENTE, E.J. & SCHENBERG, A.C.(1995). Immunogenic properties of the *M. leprae* recombinant 18-Kda antigen purified from

- Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. *Int. J. Leprosy*, **63**: 381-390.
- QUIST, C.F., DUBEY, J.P., LUTTRELL, M.P. & DAVIDSON, W.R. (1995). Toxoplasmosis in wild turkeys: a case report and serologic survey. *J. Wildl. Dis.*, **31**: 255-258.
- RAVDIN, J.I. (1995). Protozoal Diseases. In: Mandell, G.L., Benett, J.E. & Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Disease. Vol.2, 4th Edition, Churchill Livingstone, p: 2393-2395.
- REINA-SAN-MARTÍN, B., COSSON, A., MINOPRIO, P. (2000). Lymphocyte Polyclonal Activation: A Pitfall for Vaccine Design against Infectious Agents. *Parasitol. Today*, **16**: 62-67.
- REMYINGTON, J.S., McLEOD, R. & DESMONTS, G.(1995). Toxoplasmosis. In: Remington, J.S. & Klein, J.O (EDS). Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 4th edition, W.B. Saunders Company, pp. 140-268.
- REY, L.C. & RAMALHO, I.L.C. (1999). Seroprevalence of toxoplasmosis in Fortaleza, Ceará, Brazil. *Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo*, **41**: 171-174.
- RICHTER, D., HARN, D.A. & MATUSCHKA, F.R. (1995). The irradiated cercariae vaccine models: looking on the bright side of radiation. *Parasitol. Today*, **11**: 288-293.
- ROBERTS, T. & FRENKEL, J.K. (1990). Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, **196**: 249-250.
- ROBERTS, T., MURRELL, K.D. & MARKS, S. (1994). Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitol. Today*, **10**: 419-423.

- ROGHMANN, M.C., FAULKNER, C.T., LEFKOWITZ, A., PATTON, S., ZIMMERMAN, J. & MORRIS JR., J.G. (1999). Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in seventh day adventists in Maryland. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **60**: 790-792.
- SABIN, A.B.(1941). Toxoplasmic encephalitis in children. *J. Amer. Med. Ass.*, **116**: 801-807.
- SALATA, E., WIENDL, F.M. & CORRÊA, F.M.A. (1973). Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Inst.Med.Trop.São Paulo*, **15**: 66-71.
- SANTO, A.H., PINHEIRO, C.E. & JORDANI, M.S. (2000). Causas básicas e associadas de morte por Aids, Estado de São Paulo, Brasil, 1998. *Rev. Saúde Pública*, **34**: 581-588.
- SAYLES, P.C., GIBSON, G.W. JOHNSON, L.L. (2000). B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, **68**: 1026-1033.
- SAYLES, P.C. & JOHNSON, L.L. (1996). Intact immune defenses are required for mice to resist the ts-4 vaccine strain of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*, **64**: 3088-3092.
- SCHAFFNER, A. (2001). Pretransplant evaluation for infections in donors and recipients of solid organs. *Clin. Infect. Dis.*, **33(suppl. 1)**: S9-S14.
- SCHARTON-KERSTEN, T., CASPAR, P., SHER, A. & DENKERS, E.Y. (1996). *Toxoplasma gondii*: Evidence for Interleukin- 12-Dependent and – Independent Pathways of Interferon- γ Production Induced by an Attenuated Parasite Strain. *Exp. Parasitol.*, **84**: 102-114.

- SCHELLER, L.F., STUMP, K.C. & AZAD, A.F. (1995). *Plasmodium berghei*: production and quantitation of hepatic stages derived from irradiated sporozoites in rats and mice. *J. Parasitol.*, **81**: 58-62.
- SCHREIBER, R.D. & FELDMAN, H.A. (1980). Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.*, **141**:366-9.
- SEAH, K.K. & HUCAL, G.(1975). The use of irradiated vaccine in immunization against experimental murine toxoplasmosis. *Can. J. Microbiol.*, **21** 1379-1385.
- SHAO, M.F., CHEN, J.G. & CHANG, F.Y. (1987). A comparison of various methods for the determination of viability of parasitic flagellates. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health*, **18**: 538-546.
- SHARMA, S.D., ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S. (1984). *Toxoplasma* antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protects mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **133**: 2818-2820.
- SHER, A., OSWALD, I.P., HIENY, S. & GAZZINELLI, R.T. (1993). *Toxoplasma gondii* induces a T-Independent INF- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, **150**: 3982-3989.
- SIBLEY, L.D., WEIDNER, E. & KRAHENBUHL, J.L. (1985). Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature*, **315**:416-419.

- SIBLEY, L.D., ADAMS, L.B., FUKUTOMI, Y. KRAHENBUHL, J.L. (1991). Tumor Necrosis Factor- α triggers antitoxoplasmal activity of IFN- γ primed macrophages. *J. Immunol.*, **147**: 2340-2346.
- SILVEIRA, C., BELFORT JR., R., MUCCIOLI, C., ABREU, M.T., MARTINS, M.C., VICTORA, C., NUSSENBLATT, R.B. & HOLLAND, G.K. (2001). A follow-up study of *Toxoplasma gondii* infection in southern Brazil. *Am. J. Ophthalmol.*, **131**: 351-354.
- SMYTH, J.D. (1994). Introduction to animal parasitology, 3th edition, Cambridge University Press, pp. 99-104.
- SONG, C.C., YUAN, X.Z., SHEN, L.Y., GAN, X.X. & DING, J.Z.(1993). The effect of Cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.*, **23**: 89-93.
- SONG, C.C., ZHENG, Y.X., YING, S.L., XIAN, G.X., ZU, D.J. & FEN, D.Y.(1991). Studies on the use of cobalt-60 irradiation to control infectivity of *Toxoplasma gondii* cysts. *Southeast Asian J.Trop.Med.Public.Helth*, **22 (Suppl)**: 115-118.
- STRICKLAND, G.T., AHMED, A. & SELL, K.W. (1975). Blastogenic response of Toxoplasma-infected mouse spleen cells to T- and B-cell mitogens. *Clin. Expl. Immunol.*, **22**: 167-176.
- SUARÉZ-ARANDA, F., GALISTEO JR., A.J., HIRAMOTO, R.M., CARDOSO, R.P.A., MEIRELES, L.R., MIGUEL, O. & ANDRADE JR., H.F. (2000). The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru. *Veterinary Parasitology*, **91**: 23-32.
- SUPPLY, P., SUTTON, P., COUGHLAN, S.N., BILO, K., SAMAN, E., TREES, A.J., DELAUW, M.F.C. & LOCHT, C. (1999). Immunogenicity of

- recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*, **17**: 705-714.
- SUZUKI, Y. & REMINGTON, J.S.(1990). The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of lyt-2⁺ immune T cells against toxoplasmosis in mice. *J. Immunol.*, **144**: 1954-1956.
- SUZUKI, Y., CONLEY, FK. & REMINGTON, JS. (1989). Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *J. Immunol.*, **143**: 2045-2050.
- SUZUKI, Y., CONLEY, FK. & REMINGTON, JS. (1989b). Differences in virulence and development of encephalitis during chronic infection vary with the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.*, **159**: 790-794.
- SUZUKI, Y., ORELLANA, M.A., SCHREIBER, R.D. & REMINGTON, J.S. (1988). Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, **240**:516-518.
- SZUMIEL, I.(1994). Ionizing radiation-induced cell death. *Int. J. Radiat. Biol.*, **66**: 329-341.
- TOWBIN, H. & GORDON, J. (1984). Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. *J. Immunol. Meth.*, **72**: 313-340
- VELGE-ROUSSEL, F., MARCELO, P., LEPAGE, A.C., BUZONI-GATEL, D. & BOUT D.T. (2000). Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protective cells into both NALT and GALT compartments. *Infect. Immun.*, **68**: 969-972.

- VELGE-ROUSSEL, F., CHARDES, T., MEVELEC, P., BRILLARD, M., HOEBEKE, J. & BOUT, D.(1994) Epitopic analysis of the *Toxoplasma gondii* major surface antigen SAG1. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **66**: 31-38.
- SCHOONDERMARK-van DE VEM, E., GALAMA, J., KRAAIJEVELD, C., van DRUTEN, J., MEUWISSEN, J. & MELCHERS, W. (1993). Value of the polymerase chain reaction for detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.*, **16**: 661-666.
- VENKATESAN, P. & WAKELIN, D. (1993). Elisias for parasitologists: or lies, damned lies and Elisias. *Parasitol. Today*, **9**:228-232.
- VERCAMMEN, M., SCORZAM, T., HUYGEN, K., DE BRAEKELEER, J., DIET, R., JACOBS, D., SAMAN, E. & VERSCHUEREN, H. (2000). DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infect. Immun.*, **68**: 38-45
- WALDELAND, H. & FRENKEL, J.K.(1983). Live and killed vaccines against toxoplasmosis of mice. *J. Parasitol.*, **69**: 60-65.
- WARNEKULASURIYA, M.R., JOHNSON, J.D. & HOLLIMAN, R.E. (1998). Detection of *Toxoplasma gondii* in cured meats. *Int. J. Food. Microbiol.*, **45**: 211-215.
- WALES, A. & KUSEL, J.R. (1992). Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode action. *Parasitol. Today*, **8**: 358-363.
- WEBSTER, J.P. (2001). Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes Infect.*, **3**: 1037-1045.

- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F.A. & MACDONALD, D.W. (1994). Effect of *Toxoplasma gondii* upon neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. *Parasitology*, **109**:37-43.
- WILSON, C.B., REMINGTON, J.S., STAGNO, S., REYNOLDS, D.W. (1980). Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital *Toxoplasma* infection. *Pediatrics*, **66**: 767-774.
- WINSTANLEY, P. (1995). Drug treatment of toxoplasmic encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Prostgrad. Med. J.*, **71**: 404-408.
- WOODMAN, J.P., DIMIER, I.H. & BOUT, D.T. (1991). Human endothelial cells are activated by IFN-gamma to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. *J. Immunol.*, **147**:2019-23
- YAP, G., PESIN, M. & SHER, A. (2000). Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN- γ production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.*, **165**: 628-631.
- ZHANG, Y., TAYLOR, M.G., BICKLE, Q.D., WANG, H. & GE, J. (1999). Vaccination of mice with gamma-irradiated *Schistosoma japonicum* cercariae. *Parasite Immunol.*, **21**: 111-117.



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

2º Andar - Prédio II
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (011) 3066-7065
Fone/FAX: (011) 3064-5231

São Paulo, 23 de agosto de 2002.

Em reunião realizada em 18 de fevereiro de 2000 o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo apreciou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza ética, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da eficácia vacinal e da resposta imune celular em camundongos inoculados com taquizoitos irradiados de *Toxoplasma gondii***", encaminhado pelo pós-graduando **Roberto Mitsuyoshi Hiramoto**, orientado pelo Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr..

Prof. Dr. Pedro Paulo Chieffi

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do IMT

200 Gy sterilised *Toxoplasma gondii* tachyzoites maintain metabolic functions and mammalian cell invasion, eliciting cellular immunity and cytokine response similar to natural infection in mice

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto^a, Andrés Jimenez Galisteo Jr.^b,
Nanci do Nascimento^a, Heitor Franco de Andrade Jr.^{b,*}

^a Molecular Biology Laboratory, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares—IPEN, Travessa R,
400, Cidade Universitária, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, FMUSP, USP,
Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

Received 1 October 2001; received in revised form 18 December 2001; accepted 15 January 2002

Abstract

200 Gy γ -irradiated *Toxoplasma gondii* RH tachyzoites failed to reproduce in vitro and in vivo. In short-term cultures, these parasites maintained a respiratory response, the ability to invade cells and preserved protein and nucleic acid synthesis. ELISA and Western blotting techniques demonstrated the similarity in humoral response between mice infected with γ -irradiated tachyzoites and animals infected with naive parasites and treated with sulfadoxine, higher than mice immunised with formaldehyde-killed tachyzoites. Splenocyte stimulation by *T. gondii* antigen produced lymphoproliferative response and cytokine profile (IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α) similar to those produced by chronic natural infection. Mice immunised with irradiated tachyzoites had extended survival times after subsequent tachyzoite challenge, and displayed minimal cerebral pathology after cyst challenge. Irradiated tachyzoites lose their reproductive ability whilst maintaining metabolic function and may provide a novel tool for the study of toxoplasmosis and vaccine development. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Toxoplasmosis; γ -Radiation; Immunity

1. Introduction

Toxoplasmosis is a significant, life-threatening disease, infecting a large fraction of the population [1] as well as posing an economic problem with the loss of livestock, mainly sheep and goats [2]. This intracellular parasite, *Toxoplasma gondii*, has a complex life-cycle involving cats, both wild and domestic, as the definitive host, and other warm-blooded species, such as birds and mammals, including man, as intermediate hosts [3]. Transmission occurs via ingestion of raw or undercooked meat of the intermediate host, which contains cysts, or via ingestion of water contaminated with oocysts from cat faeces [4]. In humans, infection is generally benign with few symptoms, occasionally causing eye disease [5]. However, an acute infection can cause devastating disease in the foetus [1], AIDS patients [6], recipients of organ transplants [7] and patients receiving cancer therapy

[8]. To date, there is no commercial vaccine for use in humans. One developed for veterinary use has low efficiency [2]. Several murine models were developed, using different antigens and routes, looking at specific antibody production and mouse challenge with conflicting results [9,10]. The immune response against *T. gondii* is complex, with quick and effective antibody production and cellular immunity. The latter is responsible for the elimination of infected cells via cytokine production and action on CD8 lymphocytes [11] or natural killer (NK) cells [12]. Specific responses of these cells, especially the production of IFN- γ , appears to be a crucial step in mounting an effective immune response [13]. A disrupted induced immunity could result in absent response or exacerbation of disease at challenge, and it has been suggested that the interaction of multiple antigens is necessary for an effective immune response [14].

Ionising radiation was used to sterilise *T. gondii* cysts in meat and oocysts on fruit and vegetables [15]. ⁶⁰Co irradiation on living cells is associated with mitotic death, by double DNA breakage and chromosomal disruption in daughter cells, and also to induction of apoptosis in lymphocytes,

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30667010;

fax: +55-11-30885237.

E-mail address: hfandrad@usp.br (H.F. de Andrade Jr.).

through ceramide production. Higher doses of radiation can have a direct effect on cell membranes by the production of free radicals [16]. Previous studies examined the immunity induced in experimental animals by irradiated forms of *T. gondii* but did not look at parasite viability, metabolism or host cell invasion [17,18]. As purified isolated tachyzoites are not involved in cell division, the main target of radiation, namely chromosomal structures, may be affected without interfering with other biological or metabolic processes. Allowing that irradiated parasites offer the same immunological challenge as intact organisms, this study presents data on the morphology, metabolism and cell invasion of ^{60}Co -irradiated tachyzoites, and their ability to induce an immune response in mice, comparing antibody production, cell proliferation and cytokine production with native parasites, and examining subsequent challenge of immunised mice with virulent tachyzoites or oral administration of cysts.

2. Materials and methods

All reagents used were of analytical grade, from commercial sources. All solutions were prepared with double distilled (MilliQ) water.

2.1. Parasites

T. gondii RH strain was maintained as frozen stabulates or by successive intraperitoneal (i.p.) passage in outbred mice (Protozoology Lab., Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brazil). *T. gondii* ME-49 strain was kindly donated by R. T. Gazzinelli (UFMG) and was also kept as stabulates or by serial passage in C57Bl/6j mice-oral gavage.

2.2. Mice

Isogenic C57Bl/6j, BALB/c or outbred Swiss mice were obtained from a colony at the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, and maintained in sterilised cages with absorbent media and food and water ad libitum. All procedures were conducted according to the "Guide of Laboratory Animal Care", [19] and "The Principles of Ethics in Animal Experimentation" (COBEA—Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

2.3. Purification of tachyzoites

Parasites were harvested from passage animals by sterile peritoneal lavage with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2. The parasite/cell suspension was centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min, 4°C , and the pellet re-suspended in PBS. The suspension was passed through a 0.1 mm gauge needle prior to being loaded on to a Sephadex G 50–80 (1 cm $\times$ 10 cm) column. The column was previously washed with sterile PBS. Unbound parasites were collected and recovered by

centrifugation. To ascertain cell numbers and parasite viability and aliquot was diluted with one volume of Trypan Blue (0.4% in HBSS) and the total cell and stained cell (dead) count was performed using phase-contrast microscopy. Preparations with more than 1% mammalian cell contamination or viability less than 95% were discarded. The final concentration of parasites was adjusted to 10^8 tachyzoites/ml.

2.4. Irradiation

Tachyzoite suspensions, maintained in ice-cold baths, were irradiated at 20, 50, 100 and 200 Gy, in a uniform source of ^{60}Co γ -rays in a GammaCellTM (Atomic Energy of Canada Ltd.) at a dose rate of 370 Gy/h, in the presence of oxygen. Adequate controls were maintained outside the source. After irradiation viability of all samples was determined via Trypan Blue staining.

2.5. Electron microscopy

A suspension of irradiated and untreated control parasites were fixed in 1.5% glutaraldehyde solution buffered with 0.08 M cacodylate buffer (pH 7.4). After 1 h on ice the suspension was centrifuged ($1000 \times g$, 5 min) and the pellet re-suspended in 1% osmium tetroxide. After 1 h on ice, with occasional mixing, the suspension was centrifuged ($10,000 \times g$, 1 min) and the pellet processed for embedding in Araldite[®]. Ultra-thin sections were contrasted stained with uranyl acetate, observed and micrographed in a ZeissTM EM109 electron microscope.

2.6. Cell invasion assays

LLC-MK cells were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma) with 10% foetal bovine serum (FBS) and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin. Trypsin-separated cells were seeded in Lab-tekTM chamber slides. On reaching semi-confluence, 10^5 tachyzoites, either 200 Gy-irradiated or wild-type (WT), were added. After 4 h the monolayers were washed carefully with PBS (4 $\times$), fixed with 100% methanol and Giemsa-stained. Representative field were photographed in an Axiophot planapochromatic microscope.

2.7. Mitochondrial respiratory assay

A purified parasite suspension of $10^7/\text{ml}$ in RPMI 1640 + 5% FBS + gentamicin + 1 mg/ml MTT (Sigma), was dispensed into 24-well plates and kept at 37°C , 5% CO_2 . Samples were taken at 1, 2, 4 and 18 h. Samples were fixed with an equal volume of 4% formaldehyde/sodium phosphate 0.02 M, pH 7.2 and centrifuged at $800 \times g$, 10 min. After discarding the supernatant, mitochondrial oxidative blue formazan was extracted from pellet with methanol (100%) and the absorbance read at 570 nm.

2.8. Protein and nucleic acid synthesis assays

Purified parasite suspensions (1×10^7), both irradiated and non-irradiated, were dispensed in 24-well plates in Dulbecco's MEM medium (Sigma) + 5% FBS + gentamicin and maintained at protein synthesis was determined by adding ^3H -proline ($2 \mu\text{Ci}$ per well) 37°C , 5% CO_2 . After 1, 2, 4 and 18 h aliquots were dispensed on to 2 cm^2 pieces of filter paper which were then dried and placed in 1% trichloroacetic acid (TCA) for 1 h. After two washes in ice-cold TCA and one wash in ethanol, the filters were dried and placed in scintillation vials with 10 ml scintillation fluid. Counts were determined in a WallachTM 1209 counter, at 66% efficiency, and expressed in counts per minute (cpm). For evaluation of nucleic acid synthesis, both RNA and DNA, a similar method was used ^3H -hypoxanthine, $1 \mu\text{Ci}$ per well.

2.9. Reproductive ability of irradiated parasites

The reproductive ability of the parasites, irradiated at different doses, was assessed by two approaches: (a) Tachyzoites were seeded in a limiting dilution, on LLC-MK2 monolayers in 96-well plates. The plates were incubated for 7 days, with examination for cytopathic effects every 24 h. Giemsa-stained smears of culture overlay were also examined to determine the presence of free tachyzoites. (b) Groups of five mice were infected with different inoculums of irradiated parasites and survival time observed daily. When mice became clinically sick they were anaesthetised and peritoneal lavage, with PBS, was performed. Smears were Giemsa-stained and examined. The effective radiation dose was determined when the plates had maintained their integrity for 1 week or when all mice survived without sign of infection.

2.10. Murine immunisation

After 200 Gy irradiation, groups of 5 mice were inoculated with 1×10^7 tachyzoites per mouse i.p., at the week intervals. The induced immune response of the challenges was compared to groups of mice inoculated either with formaldehyde-fixed tachyzoites or with naive parasites, and immediately treated with sulfadoxine and pyrimethamine [20]. Antibody response was determined by specific anti-*T. gondii* IgG detection ELISA using *T. gondii* extract as antigen [21]. Briefly, 96-well, high affinity ELISA plates (polystyrene multiwell plate, Sigma) were coated with $50 \mu\text{l}$ of a solution of $10 \mu\text{g}$ protein/ml antigen extract, diluted in 0.9 M carbonate buffer, pH 9.0, and incubated overnight at 4°C . After washing with PBS/0.05% Tween 20 (Sigma) (PBS-T) residual binding sites were blocked for 1 h at 37°C with PBS/3% fat-free lyophilised milk (PBSTM) in humid conditions. $100 \mu\text{l}$ aliquots of appropriate dilutions of serum samples from immunised mice were dispensed into the wells and incubated for 1 h at 37°C .

After washing with PBS-T, bound antibody was detected by peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) diluted in PBSTM, 1 h, 37°C . After washing the reaction was developed by adding $30 \mu\text{l}$ per well of OPD solution (1 mg/ml *o*-phenylenediamine, 0.03% H_2O_2 in 0.2 M phosphate citrate buffer, pH 5). The reaction was terminated by adding $50 \mu\text{l}$ 4 N HCl, and the absorbance read at 492 nm.

2.11. Western blotting

Purified parasites ($10^8/\text{ml}$, PBS/ H_2O 1:9 (v/v)) were submitted to ultrasound cycles until total cell rupture was achieved, and then centrifuged at $10,000 \times g$, 3 min. The collected supernatant was run on a 12.5% SDS-PAGE gel, with subsequent transfer to nitro-cellulose membranes [22]. The membranes were blocked with 5% PBSTM + 0.05% Tween 20, cut into 3 mm strips, dried and stored at -20°C until use. Appropriate dilutions of sera from challenged animals were reacted with re-hydrated strips for 18 h, 4°C . After careful washing with PBS-T bound antibody was detected by sequential incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma) for 60 min, washed, and developed by adding PBS + 0.6 mg/ml 4-chloro-1-naphthol + 0.03% H_2O_2 . The stained strips were dried, orientated according to molecular weight markers and digitally recorded.

2.12. Challenge of immunised mice

Groups of 5 mice were immunised with 1×10^7 200 Gy-irradiated tachyzoites per mouse (three doses), at the biweekly intervals and challenged with 1×10^3 RH tachyzoites i.p. with naive mice as controls. Symptoms and survival time were recorded weekly for 4 weeks, and data compared by Fisher's exact test. Similarly immunised mice with 255 Gy-irradiated tachyzoites per mouse were inoculated with 1, 5, 10, 20 and 25 cysts of ME-49 strain by oral gavage. Cysts were harvested from the brains of chronically infected C57BL/6j mice. Briefly, after 4-week post-infection mice were euthanased and brain, heart, lung, liver and spleen were removed, fixed (10% formaldehyde/PBS, pH 7.2) and embedded in paraffin. Pieces of fresh brain were weighed and homogenised in a Dounce loose fitting homogeniser in five volumes of PBS (mg/ml). *T. gondii* cysts were expressed as (cyst/ml) homogenate, by counting under phase-contrast in volume fixed chambers (Neubauer). Brain sections ($7 \mu\text{m}$), after HE staining, were observed and photographed for *Toxoplasma* cysts and inflammatory lesions in an Axiophot photomicroscope.

2.13. Cell immunity assays

Mice were immunised with three biweekly 1×10^7 255 Gy-irradiated tachyzoites i.p. Spleens were collected 60 days after the first immunisation. Spleens were dissociated in RPMI 1640 + 5% FBS, penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, amphotericin B 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The cells were counted, their viability determined and washed in complete

medium by centrifugation. Lymphocytes were purified by Ficoll–Hypaque gradient and diluted to 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 + 10% FBS and antibiotics. Lymphocytes, at 2×10^5 cells per well, were stimulated by 48 h exposure to sonicated extract of tachyzoites at 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. ^3H -thymidine, 1 μCi per well, was added to the wells and incubated for a further 18 h. Incorporated label was harvested and determined. Concanavalin A (Con A), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, was used as a non-specific internal control. For cytokine production, spleen cells from immunised and control mice were challenged with antigen as above, and the supernatant collected and stored at -20°C after 48 h incubation and subsequent centrifugation. Cytokines IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α were quantified in supernatants by specific OptEIA (Pharmingen) ELISA. Splenic lymphocytes from ME-49 infected mice were collected after 25-day post-infection and used for comparison, using ANOVA after variance check.

3. Results

3.1. Viability, structure and cell invasion

Purified parasites maintained their normal structure and morphology after irradiation as observed by phase-contrast

microscopy. Viability was also not affected with 95% of cells viable as detected by Trypan Blue, regardless of radiation dose, time or process. By electron microscopy, 200 Gy-irradiated tachyzoites had the same morphology as untreated cells (Fig. 1A), with no evidence of nuclear or cytoplasmic damage. Conoid, rhoptries, micronemes and apicoplast maintained their integrity. There was no evidence of clumped chromatin or other evidence of radiation-induced apoptosis or mitochondrial swelling. Unirradiated parasites invaded LLC-MK2 cells using the apical complex structures, showing adhesion, orientation and penetration (Fig. 1B). 200 Gy-irradiated parasites displayed the same efficacy and step as untreated parasites, but degenerated after invasion (Fig. 1C).

3.2. Metabolism

Irradiation (200 Gy) did not affect major metabolic functions of *T. gondii* tachyzoites. Oxidative function was maintained (Fig. 2) with levels mirroring non-irradiated controls. A slight increase in function was observed at later time points (Fig. 2A) suggesting radiation-induced metabolic activity. Amino acid incorporation, measured by ^3H -proline, was maintained (Fig. 2B). All samples displayed a clear increase

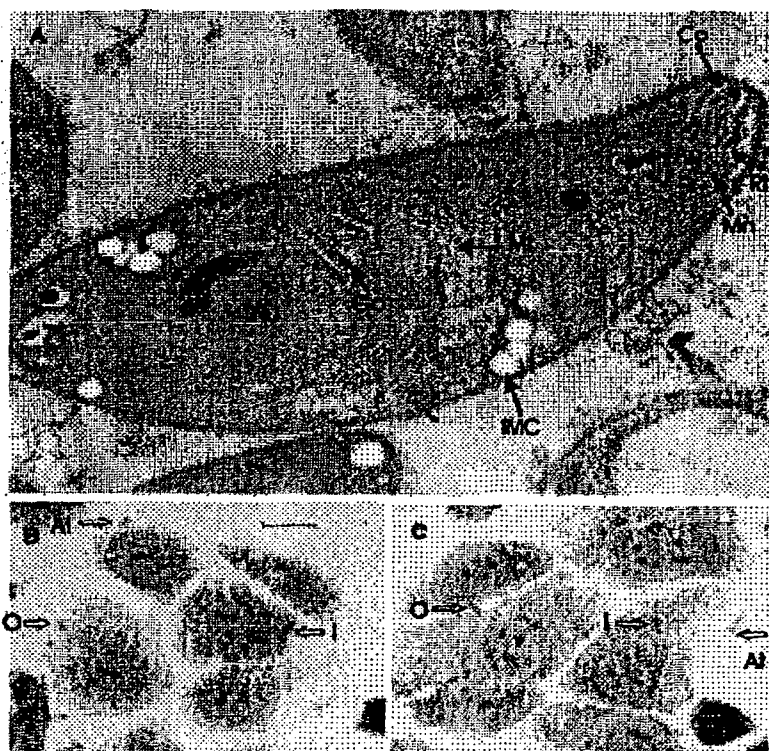


Fig. 1. Morphology and cell invasion characteristics of irradiated tachyzoites. (A) Electron microscopy of 200 Gy-irradiated tachyzoites showing preservation of structures, (20,000 $\times$). Nu, nucleus; Go, Golgi complex; Mt, mitochondrion; Ap, Apicoplast; IMC, inner membrane complex; Rh, rhoptry; Mn, micronemes; Co, conoid. (B) and (C) cell invasion in vitro on LLC-MK2 cells, Giemsa-stained. Bar represents 16 μm . At, attached tachyzoite; O, oriented tachyzoite; I, internalised tachyzoite. (B) Controls tachyzoites; (C) 200 Gy-irradiated tachyzoites.

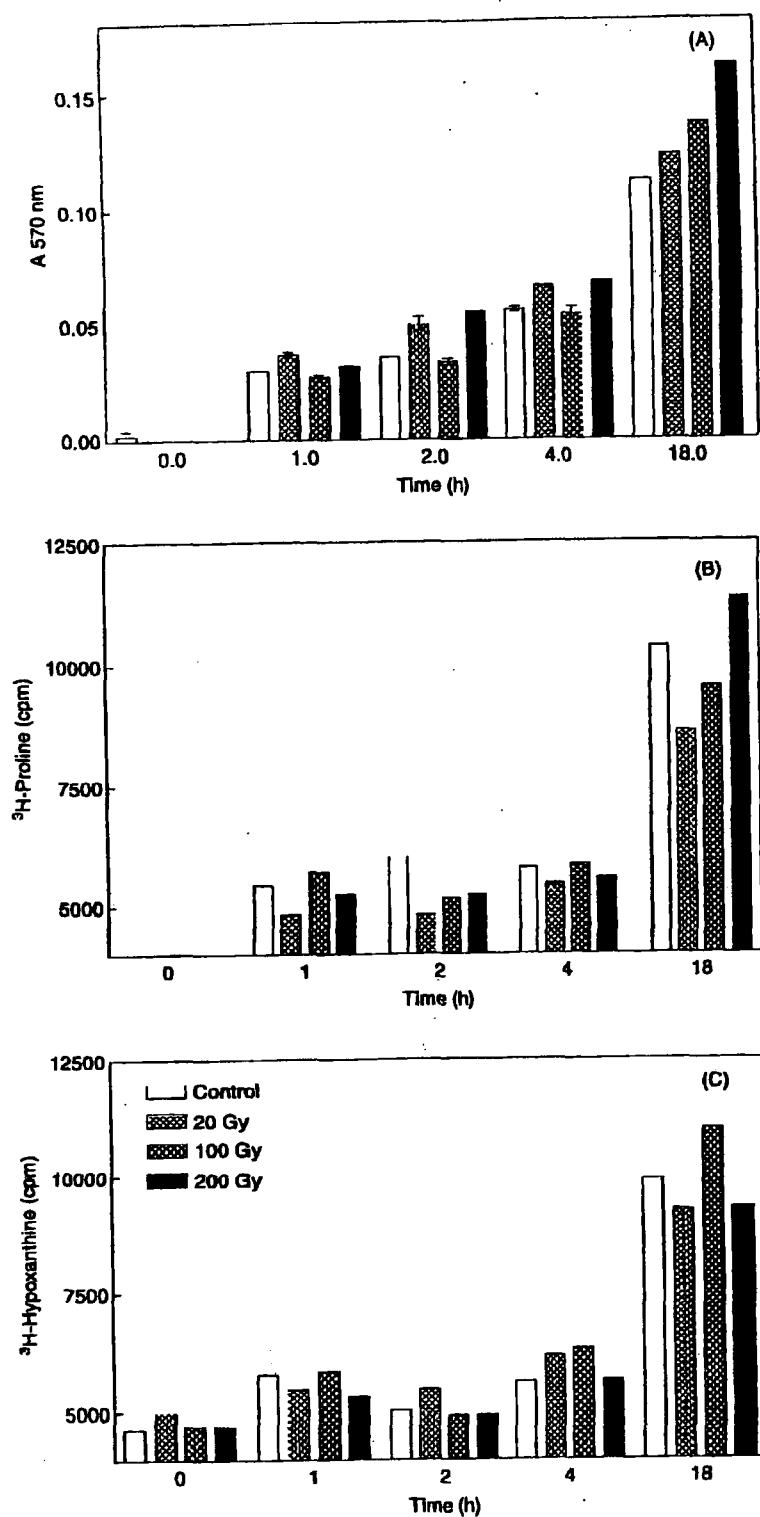


Fig. 2. Metabolic activities in *T. gondii* irradiated tachyzoites: (A) oxidative metabolism; (B) protein synthesis; (C) nucleic acid synthesis. Errors bars: SEM.

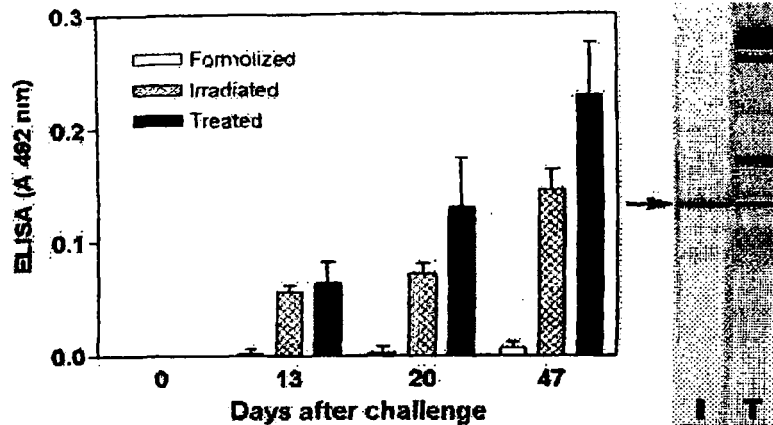


Fig. 3. Follow-up of specific IgG antibody production by ELISA in serum from groups of mice challenged with 10^7 tachyzoites i.p., formaldehyde treated, 200 Gy-irradiated tachyzoites or viable tachyzoites, with immediate treatment with pyrimethamine and sulfamethoxazol. Errors bars: S.E.M. Insert: immunoblot analysis of the specific IgG antibody response in C57Bl/6j mice. I, mice immunised with three i.p. biweekly shots of 10^7 irradiated tachyzoites; T, mice infected with *T. gondii* RH strain and treated with sulfadoxine and pyrimethamine. Arrow indicates *T. gondii* SAG1.

in TCA-precipitated radioactivity, with irradiated parasites showing a slight increase at later time points, probably due to repair of radiation effects. Nucleic acid incorporation, measured by ^3H -hypoxanthine, appeared to be time-dependent, with irradiated tachyzoites showing similar values as controls (Fig. 2C). ^3H -thymidine incorporation was also assayed but, as expected for tachyzoites, no significant incorporation occurred in any sample.

3.3. Reproduction of irradiated tachyzoites

Reproductive ability in infected monolayers was examined. In 10 replicates of 200 Gy-irradiated parasites no reproduction, and no cytopathic effects, were observed in the cell layers, 100 Gy-irradiated parasites a few foci (five per flask) of cytopathic effects were seen after 7-day incubation. Lower doses of irradiation or non-irradiated parasites promoted destruction of the monolayer in less than 5 days, with many parasites free in the medium. C57Bl/6j mice infected with native tachyzoites died after 7-day post-infection with tachyzoites in the peritoneal exudate. All mice, inoculated with 50, 100 or 200 Gy-irradiated parasites, survived with no symptoms of infection. Peritoneal exudate washings were clear of parasites up to 2-week post-infection. Despite this data presence of benign infection in some mice cannot be excluded, especially in groups which received tachyzoites irradiated at a lower dose, as the RH strain is characteristically non-cystogenic in mice [10].

3.4. Immunogenicity and protection assays

The immunogenicity of 200 Gy-irradiated, formaldehyde treated tachyzoites and a natural infection treated early then challenged, was compared. ELISA quantitatively detected IgG, the specificity being detected by Western blot

analysis, as shown in Fig. 3. Serial blood sampling of mice infected with either irradiated or native parasites, showed similar antibody profiles with titers of the former being lower. Formaldehyde-treated parasites failed to promote a significant antibody response. Antibody specificity was comparable in both models. The protection afforded by 200 Gy-irradiated parasites was investigated. Immunised mice survived longer than naturally infected control mice (RH strain) (Fig. 4, $P < 0.05$) and demonstrated less cerebral pathology when challenged with the cystogenic ME-49 strain (Fig. 5). Brain histology showed a paucity of cysts and inflammatory foci. Antigen nucleic acid was detected by PCR (B1 gene primers—kindly carried out by T.S. Okay, Instituto da Criança, FMUSP) confirming that irradiated tachyzoites only provided partial protection against both challenges.

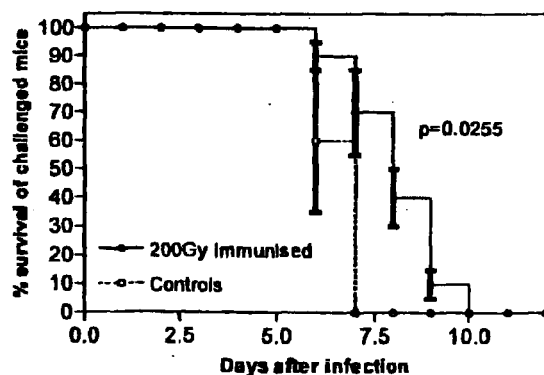


Fig. 4. Mortality of mice immunised with 10^7 200 Gy-irradiated tachyzoites, challenged on day 30 with 10^3 tachyzoites of RH strain. Solid line, immunised mice; dashed line, controls mice. Bars represent 95% confidence interval of proportions. Significance was determined by Fisher's exact test.

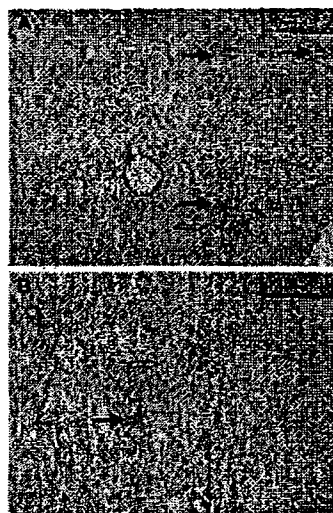
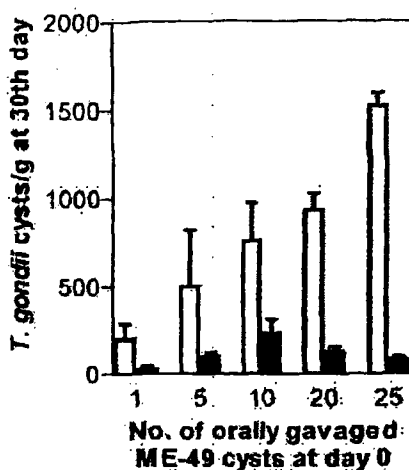


Fig. 5. Resistance of immunised mice to oral challenge with *T. gondii* ME49 strain cysts as detected by number of brain cysts 30 days after challenge. Solid bars, immunised mice with three i.p. biweekly shots of 10^7 irradiated tachyzoites; open bars, naive mice. Error Bar: S.E.M. Inserts of representative histology of brain of C57Bl/6j mice challenged with 25 cysts of *T. gondii* ME49 strain: (A) naive mice; (B) immunised with three biweekly i.p. 10^7 irradiated tachyzoites on day 60. Black arrows indicate *Toxoplasma* cysts and white arrow inflammatory foci in brains. Bars represents 50 μ m.

3.5. Cellular immune responses after immunisation with irradiated tachyzoites

Spleen cells from mice immunised with irradiated tachyzoites showed distinct proliferate responses when stimulated, in vitro, with *Toxoplasma* antigen (Fig. 6). Stimulation with Con A induced higher non-specific responses, showing the usual response of murine lymphoid cells. Cytokine production of these spleen cells was examined in vitro (Fig. 7). IFN- γ production was higher than controls but lower than levels produced by cells from naturally-infected, ME-49 strain, mice (Fig. 7A). TNF- α production was similar to chronically infected mice, being smaller than the acute

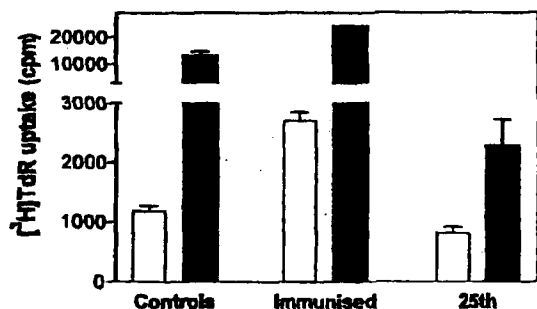


Fig. 6. Proliferative response of spleen cells in C57Bl/6j mice, stimulated by *T. gondii* antigens (open bars) or Con A (solid bars). Controls, spleens from normal mice; immunised, from mice immunised with three i.p. biweekly shots of 10^7 irradiated tachyzoites on day 60; 25th, mice infected with cysts of *T. gondii* ME49 strain by 25 days after infection. Spleen cells were cultured for 48 h, followed by addition of 1 μ Ci [3 H]-TdR and then harvested 24 h later. Error bar: S.E.M.

stages of a natural infection (Fig. 7B). The production of IL-10 by spleen cells from all groups of mice presented no significant differences (Fig. 7C). IL-12 production by spleen cells from immunised mice was lower than those from naturally infected mice and higher than control groups (Fig. 7D). The data suggests that acute infection promotes higher levels of the cytokines tested, especially IFN- γ , which was found at a lower level in immunised mice, indicating a cellular immune response to irradiated tachyzoites mirroring that of a natural infection.

4. Discussion

The results show that the primary effect of exposing *T. gondii* tachyzoites to increasing doses of radiation is to abrogate reproductive ability without significant interference with other cellular functions such as metabolic functions, protein and nucleic acid synthesis. Morphologically, no clearly defined features could be attributed to radiation effects. This is not common in most instances where cell growth is disrupted, with evidence of cellular destruction, mitochondrial swelling and loss of membrane integrity for example [23].

Previously, the effect of irradiating *T. gondii* tachyzoites at a dose of 100 Gy or 10 krad had been evaluated by their ability to reproduce and cause lethality [24]. These studies failed to detect non-lethal infection and did not utilise more sensitive in vitro assays and did not use a virulent strain of parasites. The in vitro data in this study that a few tachyzoites can survive the lower dose of radiation, enabling a non-lethal infection. Complete block of reproductive ability

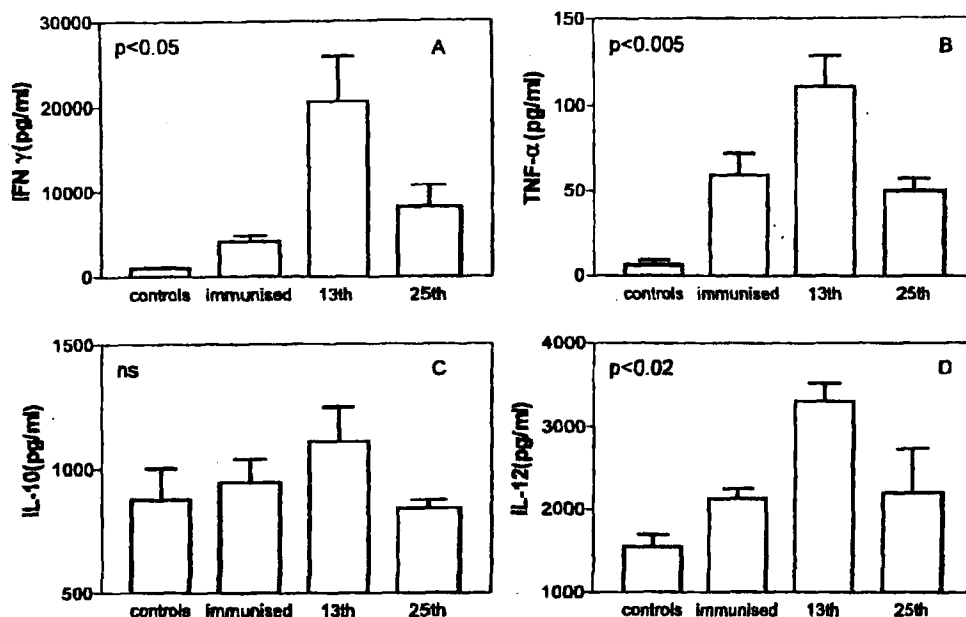


Fig. 7. Cytokine production by spleen cells in response to *T. gondii* antigen (TA) in C57BL/6j mice. Controls, from normal mice; immunised, from mice immunised with irradiated tachyzoites; 13th, from mice on day 13 of infection with cysts of Me49 *T. gondii* strain; and 25th, from mice on day 25 of infection with cysts of Me49 *T. gondii* strain. (A) IFN- γ ; (B) TNF- α ; (C) IL-10; and (D) IL-12. Bars represent S.E.M. ANOVA significance described in each graph.

was only achieved by more the 200 Gy γ -radiation in this more sensitive assay. At this dose, the data shows that the sterilising effect is not associated with major effects on parasite viability as demonstrated by the dye exclusion test, or morphology, or interference with somatic cell function, namely protein and RNA synthesis. Maintenance of nucleic acid synthesis was unexpected, as other reports documenting ^3H -uracil uptake of irradiated parasites did not examine metabolic function [25]. The tachyzoite is in fact the non-dividing form of the parasite and does not incorporate labelled thymidine (data not shown), however, hypoxanthine can be incorporated into other nucleic acids such as mRNA or tRNA by the tachyzoite [26].

The irradiated parasite's ability to invade host cells was probably due to ready-formed organelles, and follows reported steps of cell invasion processes, partially observed previously [25], and is parasite driven [27].

Double DNA breaks in chromosomal strands of irradiated tachyzoites probably results in an inability to reproduce. This effect has also been observed in actively dividing cells, which were previously irradiated, resulting in an unbalanced chromatin exchange in daughter cells and loss of essential genetic material [28]. These events may explain how the irradiated tachyzoite maintains its metabolic function and other cellular activities. The complex genetic structure of the tachyzoites, 11 chromosomes [29], may favour this effect at low doses of radiation as compared to the effect on simpler genomic structures, e.g. in bacteria [30]. The few double DNA breaks maybe located outside operons, allowing

adequate function of the genes until cell division, leading to mitotic death [31]. As we expected few random breaks along the chromatids, analysis by pulse field electrophoresis would have resulted in loss of definition of specific bands and so was not tried [32]. The triggering of apoptotic cell death by irradiation was examined by TUNEL [33]. No evidence of this was seen in 200 Gy-irradiated tachyzoites (data not shown).

The irradiated tachyzoites promoted similar antibody responses in immunised mice when compared to control treated mice, with the same bands appearing in Western blot analysis. Formaldehyde-treated parasites failed to elicit specific antibodies when administered without adjuvant. This unexpected result may be to the destruction of these tachyzoites by complement and/or neutrophils in acute response [27,34]. We have shown that irradiated tachyzoites have similar characteristics as native parasites, without their reproductive ability, but exposing their antigens sequentially to the host as in a natural infection.

Mice immunised with irradiated tachyzoites and subsequently challenged with viable parasites, survived longer (RH) and displayed less pathology (ME-49). This mirrors previous findings using other immunisation schemes; intact parasites [35], purified antigens [36] or attenuated parasites with non-sterile immunity (2). Use of recombinant protein produces results similar to those found with irradiated parasites [37,38].

The study of cytokine production is essential for the understanding of the induced immune response by *Toxoplasma*

vaccines. We found similar cytokine production, although at lower levels, when comparing the irradiated tachyzoite immunisation schedules with the usual cyst-forming experimental model, especially when comparing late infection levels. The induction of IFN- γ was notable as the elimination of infection in experimental models appears to be related to the production of this cytokine [12]. The concomitant antigen-induced production of TNF- α and IL-12 in those mice is also notable, due to the interaction with IFN- γ or NK cell activation in an effective immune response in natural infections [13]. Thus, immunisation with viable, functional parasites, minus their reproductive ability, appears to induce the same as a natural infection, avoiding problems associated with single antigen immunisation schedules [14]. Despite our promising data, the problem of vaccination against toxoplasmosis remains unsolved, as the immune response needs to be induced at the normal site of infection, the gastric-intestinal tract. Most studies utilising systemic immunisation are contentious, as the tools for studying gut immunology remain limited.

Immunity induced by *T. gondii* is complex, having both antibody and cellular components, and with tissue cysts remaining viable for the lifetime of the host. Doubts remain whether an acute infection promotes sterile immunity or if it only succeeds in abolishing clinical signs of new infection-specific opsonisation of tachyzoites leading to phagocytosis but circulating parasites remain [39].

Irradiated tachyzoites could be an alternative immunisation schedule for vaccine development, perhaps as a boosting antigen in patients with positive *T. gondii* serology and who are at risk of severe immunosuppression, e.g. undergoing cancer chemotherapy. Alternatively, they could be used as a tool in the study of the re-infection phenomenon of toxoplasmosis.

Acknowledgements

We gratefully thank for careful and extensive revision of the text of V. Yardley, Ph.D. and the expertise during technical assistance of R.P.A. Cardoso, A.R. Ferreira, M.A. Ferreira and C. Alves. And the collaboration of T.S. Okay, Ph.D. for PCR assays. This work was a part of the Doctorate program of R.M. Hiramoto for Ph.D. in Nuclear Technology. This work was financially supported by FAPESP (Grants 96/05875-8 and 99/04926-6). CNPq furnished support for R.M. Hiramoto and H.F. de Andrade Jr. A.J. Galisteo Jr. was supported by FAPESP (98/01681-0). We gratefully thank the indirect support of Radiobiology division of IPEN/CNEN-SP and LIMHCFMUSP.

References

- [1] Remington JS, McLeod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO., editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 140–268.
- [2] Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. Vet Res 1998;29:289–310.
- [3] Frenkel JK, Dubey JP, Müller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 1970;167:893–6.
- [4] Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000;30:1217–58.
- [5] Roberts F, McLeod R. Pathogenesis of toxoplasmic retinochoroiditis. Parasitol Today 1999;15:51–7.
- [6] Luft BJ, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. Clin Infect Dis 1992;15:211–22.
- [7] Machado CM, Boas LSV, Canto CL, Andrade Jr HF, Castelli J, Bohringer P, et al. Disseminated toxoplasmosis after BMT—report of a case. Bone Marrow Transplant 1992;10:475–8.
- [8] Dagher R, Lucas K. Toxoplasmosis in the patients with cancer. Infect Med 1996;13:998–1000.
- [9] Alexander J, Hunter CA. Immunoregulation during toxoplasmosis. Chem Immunol 1998;70:81–102.
- [10] Yap GS, Scharon-Kersten T, Ferguson DJP, Howe D, Suzuki Y, Sher A. Partially protective vaccination permits the development of latency in a normally virulent strain of *Toxoplasma gondii*. Infect Immun 1998;66:4382–8.
- [11] Suzuki Y, Remington JS. The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of LyT-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. J Immunol 1990;144:1954–6.
- [12] Denkers EY. T-Lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. Microb Infect 1999;1:699–708.
- [13] Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-Cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev 1998;11:569–88.
- [14] Reina-San-Martin B, Cosson A, Minoprio P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. Parasitol Today 2000;16:62–7.
- [15] Dubey JP, Thayer DW, Speer CA, Shen SK. Effects of γ -irradiation on unsporulated and sporulated *Toxoplasma gondii* oocysts. Int J Parasitol 1998;28:369–75.
- [16] Szumiel I. Ionizing radiation-induced cell death. Int J Radiat Biol 1994;66:328–41.
- [17] Bakal P, Veld N. Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. Zeitschrift fur Parasitenkunde 1979;59:211–7.
- [18] Dubey JP, Jenkins MC, Thayer DW, Kwork OCH, Shen SK. Killing of *Toxoplasma gondii* oocysts by irradiation and protective immunity induced by vaccination with irradiated oocysts. J Parasitol 1996;82:724–7.
- [19] Clark JD. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council Washington, DC: National Academy Press, 1996.
- [20] Mack DG, McLeod R. New micromethod to study the effect of antimicrobial agents on *Toxoplasma gondii*: comparison of sulfadoxime and sulfadiazine individually and in combination with pyrimethamine and study of clindamycin, metronidazole, and cyclosporin A. Antimicrob Agents Chemother 1984;26:26–30.
- [21] Camargo ME, Ferreira AW, Mimeo JR, Takiguti CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined toxoplasmosis serological patterns. Infect Immun 1978;21:55–8.
- [22] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979;76:4350–4.
- [23] Somosy Z. Radiation response of cell organelles. Micron 2000;31:165–81.
- [24] Seah SKK, Hucal G. The use of irradiated vaccine in immunization against experimental murine toxoplasmosis. Can J Microbiol 1975; 21:1379–85.

- [25] Omata Y, Aihara Y, Kanda M, Saito A, Igarachi I, Suzuki N. *Toxoplasma gondii*: experimental infection of cats vaccinated with ^{60}Co irradiated tachyzoites. *Vet Parasitol* 1996;65:173–83.
- [26] Pfefferkorn ER, Pfefferkorn LC. *Toxoplasma gondii*: specific labelling of nucleic acids of intracellular parasites in Lesch-Nyhan cells. *Exp Parasitol* 1977;41:95–104.
- [27] Sayles PC, Gibson GW, Johnson LL. B cells are essential for vaccination-induced resistance to virulent *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2000;68:1026–33.
- [28] Ager DD, Dewey WC, Gardiner K, Harvey W, Johnson RT, Waldren CA. Measurements of radiation induced DNA double-strand breaks by pulsed field electrophoresis. *Radiat Res* 1990;122:181–7.
- [29] Sibley LD, Pfefferkorn ER, Boothroyd JC. Development of genetic systems for *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1993;9:392–5.
- [30] Crawford LM, Ruff EH. A review of the safety of cold pasteurization through irradiation. *Food Control* 1996;7:87–97.
- [31] Favaudon V. Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death. *Cancer Radiother* 2000;4:355–68.
- [32] Sak A, Stuschke M, Wurm R, Budach V. Protection of DNA from radiation induced double-strand breaks: influence of replication and nuclear proteins. *Int J Radiat Biol* 2000;76:749–56.
- [33] Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard J, et al. Differential expression of growth factor in irradiated mouse testis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:203–12.
- [34] Sayles PC, Johnson LL. Exacerbation of toxoplasmosis neutrophil-depleted mice. *Nat Immunol* 1996;15:249–58.
- [35] Escajadillo A, Frenkel JK. Experimental toxoplasmosis and vaccine tests in Aotus monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1991;44:382–9.
- [36] Lunden A, Lovgren K, Uggla A, Araujo FG. Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infect Immun* 1993;61:2639–43.
- [37] Leyva R, Herion P, Saavedra R. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2001;87:70–9.
- [38] Desolme B, Mevelec MN, Buzoni-Gatel D, Bout D. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 2001;18:2512–21.
- [39] Asensi V, Carton JA, Maradona JA, Ona M, Aribas JM. Clinical value of blood cultures for detection of *Toxoplasma gondii* in human immunodeficiency virus-seropositive patients with and without cerebral lesions on computerized tomography. *Clin Infect Dis* 1993;17:511–2.

Revista de Saúde Pública

Journal of Public Health

EDITORIAL

A privatização da universidade e o genoma

ARTIGOS ORIGINAIS

Infeciosidade de cistos de *Toxoplasma gondii* em leite bovino

Arbovírus Ilheus em aves silvestres

Seroepidemiologia da citomegalovirose em comunidade urbana

Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos

Defeitos congênitos em uma região de mineração de carvão

Mortalidade por causas externas em crianças e adolescentes

Prevalência do uso de drogas e desempenho escolar entre adolescentes

Tabagismo em adolescentes no Brasil

Evolução temporal do tabagismo em estudantes de medicina

Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível socioeconômico

Avaliação da qualidade de serviço de saúde para adolescentes

Sistema de Informações Hospitalares como ajuste de risco em índices de desempenho

Aplicação do modelo de crenças em saúde na prevenção dos acidentes com agulha

Incidência de cesáreas segundo fonte de financiamento da assistência ao parto

A prescrição medicamentosa sob a ótica do paciente idoso

EDITORIAL

The university privatization and the genome

ORIGINAL ARTICLES

*Infectivity of cysts of the *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk*

Ilheus arbovirus in wild birds

Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community

Influence of social-economic factors on the pesticide poisoning

Population risk for birth defects in a coal mining region

Child and adolescent mortality due to external causes

Drug use prevalence and school performance among teenagers

Tobacco smoking among teenagers in Brazil

Trends in smoking habits among medical students

Relationship between caries, gingivitis and fluorosis and the socioeconomic status

Quality evaluation of health care service for adolescents

Brazilian Hospital Database System as risk adjustment in performance indicators

Application of the health belief model to the prevention of occupational needlestick injuries

Incidence of cesarean delivery regarding the financial support source for delivery care

Drug prescription from the perspective of elderly patients

Infectivity of cysts of the ME-49 *Toxoplasma gondii* strain in bovine milk and homemade cheese*

Infeciosidade de cistos de *Toxoplasma gondii* ME-49 em leite bovino e queijo caseiro

RM Hiramoto, M Mayrbaur-Borges, AJ Galisteo Jr, LR Meireles, MS Macre and HF Andrade Jr

Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

Keywords

Toxoplasmosis, transmission.* Milk, microbiology.* Cheese, microbiology.* Food contamination.* Food hygiene, methods. Food preservation. Toxoplasmosis, animal, chemically induced. Mice, blood. Enzyme-linked immunosorbent assay. Antibodies, protozoan. - *Toxoplasma gondii*.

Abstract

Objective

Analyze the infectivity and storage resistance of cysts of the ME-49 strain of *Toxoplasma gondii* in artificially infected bovine milk and homemade fresh cheese.

Methods

Pasteurized bovine milk was infected with 10 cysts/ml of the ME-49 strain of *T.gondii* and inoculated in different groups of mice, immediately or after storage at 4°C for 5, 10 and 20 days. Homemade fresh cheese was prepared with artificially infected milk, and also tested in groups of mice, using the same storage process. Infection was identified by the presence of cysts in the brain or serological testing in challenged mice after 5 weeks, confirmed by Western Blot and histology.

Results

The infectivity of cysts of the ME-49 strain of *T.gondii* was maintained in the milk even after storage for 20 days at refrigerator temperatures. Cysts were also able to survive the production process of homemade fresh cheese and storage for a period of 10 days in the same conditions.

Conclusions

These data demonstrated that milk and dairy products could be an important source of *T.gondii* in human contamination, reinforcing the importance of milk pasteurization before any processing or ingestion.

Descritores

Toxoplasmose, transmissão.* Leite, microbiologia.* Queijo, microbiologia. Contaminação de alimentos.* Higiene dos alimentos, métodos. Conservação de alimentos. Toxoplasma, patogenicidade. Toxoplasmose animal, induzido quimicamente. Camundongos, sangue. ELISA. Anticorpos antiprototozoários. - *Toxoplasma gondii*.

Resumo

Objetivo

Analisar a infeciosidade e a resistência de cistos de *T. gondii* em leite e queijo fresco caseiro, pela infecção artificial de leite bovino.

Métodos

O leite bovino pasteurizado foi infectado artificialmente com 10 cistos/ml de *T.gondii* cepa ME49 e inoculado em grupos de camundongos, imediatamente ou após ser estocado por 5, 10 e 20 dias a 4°C. Preparou-se queijo fresco caseiro com leite infectado, sendo testado em grupos de camundongos, utilizando a mesma conservação. A infecção foi detectada pela presença de cistos no cérebro dos

Correspondence to:

Heitor Franco de Andrade Junior
Lab. Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical - USP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
05403-000 São Paulo, SP, Brazil
E-mail: hfandrad@usp.br

*Supported by CNPq (Process n. 143364/1998-7), Fapesp (Process n. 98/1681-0, 98/13323-0, 96/5875-8 & 99/04926-6), Fundação do Desenvolvimento Administrativo (Fundap) and Laboratório de Investigação Médica do Hospital das Clínicas Faculdade Medicina USP-49.

The publication of this article was subsidized by Fapesp (Process n. 01/01661-3).
Submitted on 14/7/2000. Reviewed on 9/10/2000. Approved on 1/12/2000.

camundongos desafiados ou testes sorológicos após cinco semanas, também confirmada por Western Blotting e histologia.

Resultados

A infecciosidade dos cistos da cepa ME49 de T.gondii foi mantida mesmo quando armazenado no leite até 20 dias de conservação em condições de refrigeração a 4°C. Os cistos resistiram ao processo de fabricação do queijo e eram infectantes após um período de 10 dias nas mesmas condições.

Conclusões

Os achados mostraram que o leite e seus derivados podem ser uma importante fonte de contaminação humana pelo T.gondii, reforçando a importância da pasteurização do leite antes de qualquer processamento ou ingestão.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular Apicomplexa parasite, with a complex life cycle, that causes toxoplasmosis in humans, and domesticated and wild animals. Infection is usually asymptomatic in people with a normal immune function and occasionally results in eye involvement. Toxoplasmosis can cause severe disease in fetuses of acutely infected pregnant woman, immunocompromised individuals (Aids) and therapeutically immunosuppressed patients, as cancer or transplant recipients.² In Brazil, *T.gondii* infects around 60% of the adult population.¹³ Toxoplasmosis is acquired by ingesting food and water contaminated with oocysts from feces of infected cats or by the ingestion of raw or undercooked meat, containing tissue cysts, of infected intermediary host.

Milk was implicated as a source of infection of *T.gondii* in several reports. Toxoplasmosis was described in breast fed child whose mother had recently acquired toxoplasmosis¹ and ingestion of unpasteurized goat milk was considered a possible source of *T.gondii* infection in children of rural areas,^{3,17,20} showing the importance of milk in the spread of *T.gondii* infection. Experimentally, there are reports of chronically infected lactating mice excreting cysts in their milk.¹⁶

This transmission was attributed both to tachyzoites in the milk and suckling trauma but also to tissue cyst excretion¹⁶ due to specific exocytic lipid secretion in the mammary cell that allows the secretion of lipidic droplets with the luminal upper layer of the cell cytoplasm,⁵ described in some works of cyst isolation in milk from acutely infected goats.⁶ Despite of those few reports, studies were conducted to verify the infectivity of *T.gondii* cysts in milk, without any description of their infectivity in fresh homemade cheese, a common protein source in rural areas. The present study assesses the infectivity of cysts of the ME-49 strain of *T.gondii* in artificially infected bovine milk and derived fresh homemade cheese.

METHODS

Strains, material and animals

The ME-49 strain of *T.gondii* was cryopreserved in liquid nitrogen or by successive passages of cysts from infected brains, homogenized in phosphate buffered saline (PBS) and inoculated intraperitoneal (i.p.) in C57Bl/6j mice. RH strains have been maintained routinely in the Laboratório de Protozoologia in the past 15 years by cryopreservation or by i.p. passage in mice. All plastic ware, reagents and conjugates were purchased from one manufacturer and the solutions were prepared with high-quality water. Isogenic C57Bl/6j mice were obtained from São Paulo University's colony (Centro de Bioterismo/Faculdade de Medicina/USP) and kept in sterilized cages and absorbent media with food and water "ad libitum". The management of these animals before or during the experiments followed the Principles of Laboratory Animal Care¹⁴ and the Principles of Ethics in Animal Experimentation (COBEA).⁴

Experimental infection

Pasteurized bovine whole milk found in the market was infected with cysts of the ME-49 strain from brains of previously infected C57Bl/6j mice. The contaminated milk was administered orally to groups of eight mice, fresh or stored at 4°C for 5, 10 and 20 days. A dose of 12 cyst/mouse was used. Cysts kept and stored under the same conditions in sterile PBS were used as controls, with mice follow-up after 5 weeks.

Homemade fresh cheese was produced with manual technique, using products available in the market for Brazilian farmers. The pasteurized milk was contaminated with cysts of *T.gondii* of the ME-49 strain (12 cysts/1000 µl milk) in microcentrifuge tubes. After that, 1 µl of commercial clot was added per tube and incubated for 30 min at 37°C. After centrifuging at 800 g/5 min, the supernatant was discarded, the cheese washed out with saline solution by centrifugation, removed from tubes and stored in a refrigerator. The

cheese was offered individually to groups of four C57BL/6j mice, fresh or stored at 4°C for 5, 10 and 20 days. Ingestion was carefully observed for each mouse, usually occurring in the first half-hour. Mortality, morbidity and serological evidence of infection in C57BL/6j mice were monitored by 40 days after the ingestion.

Mice blood samples

Blood samples (5 µl) were collected from the mice tails in standardized filter papers dried and stored at -20°C until use. Before use, the soluble extract containing antibodies was obtained by extraction with 100 µl PBS during 18 hours at 4°C, with gentle agitation. The soluble extract was recovered by centrifugation and considered a 1/20 dilution of blood.

T. gondii antigen preparation and ELISA

Tachyzoites of the RH strain were harvested from the peritoneal cavity of previously infected mice in phosphate buffered saline (PBS), recovered by centrifugation, washed, counted and submitted to sonication for several periods of 4 cycles/30 seconds in an ice bath, until all parasites were destroyed, as detected by phase contrast microscopy. The solution was isotonized by 0.3 M NaCl addition (v/v) and cleared by centrifugation at 10,000 g for 3 min. The protein content of the supernatant was determined and aliquots were maintained at -70°C until use as purified antigen. Ninety-six high binding plates (Multiwell Plate/polystyrene) were coated with 50 µl/well of a solution containing 10 µg/ml of the antigen extract in carbonate-buffered 0.1 M, pH 9.0, overnight at 4°C. The plates were then washed 5 times with PBS containing 0.02% Tween 20 (PBS-T), and free protein binding sites blocked for 1 hour at 37°C with PBS containing 2% fat-free lyophilized milk in humid chamber. Serum dilutions, 100 µl, were added to each well and the plates were incubated for 1 hour at 37°C. After additional washing with PBS-T, bound IgG were detected by incubation for 1 hour with peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulin G at 37°C, followed by 5 washings with PBS-T. The bound conjugates were developed with 100 µl per well of orto-phenylenediamine dihydrochloride 1 mg/ml, H₂O₂ 0.03% in phosphate-citrate buffer 0.2 M, pH 5.0, for 30 min, stopped with 25 µl per well of HCl 4N, and the optical density (OD) read at 492 nm in an ELISA reader.

Western blot

Specific antigen reactive antibodies were detected on Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) isolated antigens.

Purified parasites, RH strain from peritoneal exudates of previously infected mice (10⁸/ml) were sonicated to disruption in PBS and immediately centrifuged for 10,000 g/3 min. The supernatant, 400 µg protein/ml, was collected and submitted to SDS-PAGE in a 12.5% separating gel, with subsequent eletrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with a 5% fat-free lyophilized milk in PBS-T, cut in 3 mm strips and stored dried at -20°C until use. Diluted serums were reacted with *T. gondii* antigen strips re-hydrated with PBS-T, for 18 hours at 4°C. After careful washing with PBS-T, the antibodies were detected by sequential incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, 60 min, with subsequent PBS washings, and developed with 4-cloro-1-naphtol 0.6 mg/ml and hydrogen peroxide 0.03% for 15 min, with constant agitation. After development, the strips were dried and scanned for documentation. Standard molecular weight protein markers were stained with Amido Black B.

Histology

All mice were killed under ethyl ether anesthesia 5 weeks after the challenge. Brain, heart, lung, liver and spleen were removed and fixed in 100 volumes of 10% formaldehyde in Sorensen buffer, with once solution replacement after 1 hour. The organs were included in paraffin, and a 7 µm thick section was obtained and stained with hematoxylin-eosin. When necessary, representatives fields were photographed in a Zeiss Axiophot microscope with planapochromatic optics.

Data analysis

A mouse was considered infected when there were *T. gondii* cysts identifiable in the squash preparation of central nervous system tissue, or when a positive serology was found in ELISA, confirmed by Western blot of specific bands. Comparison between frequencies was performed using Epi Info 6.01 statistical software, using 1-tail Fisher's exact test. Significance was considered when the probability of equality between frequencies was less than 0.05.

RESULTS

T. gondii cysts infectivity in milk

Mice mortality induced by 12 cysts in milk, related to storage, can be seen in (Table 1). Deaths due to infection in most animals occurred by neurological symptoms after 20-30 days of infection, with a decaying pattern with longer storage periods. Interestingly, when compared with PBS stored cysts, the cysts maintained in milk induce a more severe disease,

specially when compared in 10 days storage time ($p=0.038$, 1-tailed Fisher exact test).

Table 1 - Mortality (%) of C57Bl/6j mice who were orally inoculated with milk infected with cysts of the ME-49 strain of *T. Gondii*, as compared to cysts inoculated in PBS.

Mortality (%)	Days of storage before inoculation			
	0	5	10	20
Milk	100	25	50	0
PBS	75	75	0	0

PBS: Phosphate buffered saline

Serology of animals, both from survivors or before death in all animals, tested tail blood samples using ELISA as described, could be seen in Table 2. All animals were infected up to five days of storage, regardless of medium, but cysts stored in milk had a prolonged survival, infecting all animals after 20 days of storage ($p=0.038$, 1-tailed Fisher exact test), when compared to PBS stored cysts in the same period. The positive serology was confirmed with Western Blot, with clearly identifiable bands in similar control infected mice (data not shown). The histological picture of one surviving mouse, sacrificed in the 40th day, show an intense encephalitic process with several *T. gondii* cysts dispersed in brain with foci of inflammatory cells.

Table 2 - Rate of infectivity (%) of cysts of the ME-49 strain in C57Bl/6j mice, after storage in milk or PBS at 4°C, detected by the presence of specific antibodies using ELISA and Western Blot.

Infectivity (%)	Days of storage before inoculation			
	0	5	10	20
Milk	100	100	100	100
PBS	100	100	75	50

T. gondii infectivity in homemade cheese

Only one animal died in the group that ingested fresh cheese immediately after it was made. All other groups showed no deaths during the experiment. After 40 days, all mice groups were killed, followed by search of cysts of *T. gondii* in the brain, and serological testing. *T. gondii* cysts were found in the brain of all mice from the groups that had received homemade cheese fresh or stored during 5 or 10 days at 4°C, a result also confirmed by specific serology, as seen in Table 3. Mice that received cheese stored for 20 days at 4°C didn't show either brain cysts or seroconversion. The histological feature of a mouse infected with cheese stored for 10 days, confirmed by serology, presented fewer inflammatory foci and *T. gondii* cysts, despite evidence of encephalitis, suggesting a less intense disease. The infection was similar in both forms of contamination, as observed by the detection of tissue cysts, production of specific antibodies with recognition of the same protein bands, without any

Table 3 - Rate of infectivity (%) of cysts of the ME-49 strain in C57Bl/6j mice, after storage in cheese at 4°C detected by the presence of specific antibodies using ELISA, as compared to milk stored cysts.

Infectivity (%)	Days of storage before inoculation			
	0	5	10	20
Milk only	100	100	100	100
Cheese	100	100	100	0

selective effect of the milk or cheese on the agent, varying only in parasite.

DISCUSSION

These data show clearly that milk and homemade cheese could keep up the infectivity of *T. gondii* cysts for periods up to 10 days for homemade cheese and up to 20 days for milk, under regular refrigeration conditions. Transmission of human toxoplasmosis occurs mainly through the ingestion of food containing cysts of *T. gondii*, found in sheep, pigs, cow, hen and goats.^{4,5} Toxoplasmosis outbreak has been mainly related to the ingestion of undercook meat,¹ but few outbreaks could be attributed to milk ingestion despite *T. gondii* was isolated in the milk of naturally infected cows.¹⁹ The ingestion of raw milk has been considered as a possible source of the transmission of *T. gondii*,¹⁸ and parasites were isolated, by mouse inoculation, in goat milk.³ Goat milk is usually produced by small farms producers under poor conditions without pasteurization, only frozen, with low safety for contaminations,¹⁵ but most milk sold in urban areas is pasteurized, a process that eliminates the *T. gondii* infectivity.¹⁰

These data also show that milk promoted higher infectivity and mortality, revealing probably better preservation or efficiency of *T. gondii* cysts when compared to PBS as diluent solution, even in the first periods of storage. This fact could be ascribed to nutrients in the milk that contributed for maintaining the cysts viable. Another explanation is related to the first steps of host invasion. The bradyzoites, the form found in the cysts, are resistant to the gastric digestion, a method for differentiating the tachyzoites.¹² Milk proteins can generate a competitive effect in the gastric juice, resulting in better infectivity of bradyzoites, both by reducing the acid content and allowing a more restrict pepsin digestion, as demonstrated in infected milk artificially exposed to gastric conditions.¹⁶

Homemade cheese was also a good vehicle for *T. gondii* cysts. The home processing of cheese involves bacterial acidification and coagulation of the casein, but this should be a mild process to maintain the palatability of the cheese. The clot could retain

the agent during washing but the entire process reduces the viability of the cysts, as demonstrated by the cessation of transmission after 10 days of storage in the refrigerator. Despite its infectivity, the disease was quite less intense in mice that ingested experimentally infected cheese, a fact that could explain the absence of related deaths on this form of transmission that could induce a less symptomatic disease in humans.

The cheese contamination could occur in two ways, first the exogenous one, associated with low hygiene conditions, allowing the contact of milk with oocysts from cats. Endogenous contamination of the milk in the mammary gland is facilitated by cellular exocytosis of milk secretion. During pre-lactation, relatively stable mammary cells could harbor *T. gondii* cysts. Those silent cysts could be secreted from the mammary gland cells by exocytosis, coated by host cell membranes, similar to milk fat globules secretion,⁵ allowing milk contamination inside the gland. This contamination is worsened due to smaller concentration of proteolytic enzymes in the intestine of children and suckling animals, increasing the survival of *T. gondii* forms.⁹

Toxoplasmosis transmission by milk or fresh cheese, unpasteurized or inadequately processed, can be one of the important ways of contamination for this agent, as they are important food source in rural areas. Milk and cheese are one of the main sources

of proteins for children, and cheese is a cheap and easy way of getting food proteins. Any reference about the viability of the cysts of *T. gondii* in fresh cheese was not found, just in milk, mainly of ovine.⁶ The agent is destroyed after pasteurization when appropriately exposed to larger temperatures than 70°C for 10 min, but pasteurization is sometimes not appropriate or the milk is processed in large volumes with some areas without adequate temperature, a frequent problem.¹¹ Cheese production after boiling is a time consuming and expensive process, especially in small farms, despite its efficiency in the elimination of this contaminant.

The present study showed that *T. gondii* cysts could survive in the milk and fresh derived cheese, which could be considered a potential source of *T. gondii* transmission, especially in rural areas where there's no pasteurization.

ACKNOWLEDGMENTS

To Ricardo T. Gazzinelli of the Fiocruz-MG by supplying of *T. gondii* ME-49 strain; to Roselaine Pereira Alvin Cardoso for technical assistance in serological assays and antigen production (Laboratório de Protozoologia); to Cleiton Alves for technical assistance in histology preparation (Laboratório de Dermatologia), both of the Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

REFERENCES

1. Bonametti AM, Passos JN, Koga de Silva EM, Macedo ZS. Probable transmission of acute toxoplasmosis through breast feeding. *J Trop Pediatr* 1997;43:116.
2. Beaman MH, McCabe RE, Wong SY, Remington HS. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Principles and practice of infectious disease*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 2455-75.
3. Chiari CA, Neves DP. Toxoplasmose humana adquirida através da ingestão de leite de cabra. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984;79:337-40.
4. [COBEA] Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal. Available from: URL: <http://www.meusite.com.br/COBEA/etica.htm>
5. Deyrup-Olsen I, Lucht DL. Secretion of mucous granules and other membrane-bound structures: a look beyond exocytosis. *Int Rev Cytol* 1998;183:95-141.
6. Dubey JP. Persistence of encysted *Toxoplasma gondii* in caprine livers and public health significance of toxoplasmosis in goats. *J Am Vet Med Assoc* 1980;177:1203-7.
7. Dubey JP, Sharma SP. Parasitemia and tissue infection in sheep fed *Toxoplasma gondii* oocysts. *J Parasitol* 1980;66:111-4.
8. Dubey JP, Murrell KD, Fayer R, Schab CA. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J Am Vet Med Assoc* 1986;188:1035-7.
9. Dubey JP. Toxoplasmosis: an overview. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1991;22(Suppl):88-119.
10. Dubey JP. Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. *Vet Parasitol* 1996;64:65-70.
11. Fahey T, Morgan D, Gunneburg C, Adak GK, Majid F, Kaczmarek E. An outbreak of *Campylobacter jejuni* enteritis associated with failed milk pasteurization. *J Infect* 1995;31:137-43.
12. Gross U, Bohne W, Soete M, Dubremetz JF. Developmental differentiation between Tachyzoites and Bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Today* 1996;12:30-3.

13. Guimarães ACS, Kawarabay M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993;35:479-83.
14. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life. *Guide for the care and use of laboratory animals*. Washington (DC): National Academy Press; 1996.
15. Little CL, DeLouvois SJ. Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' milk on retail sale in English and Wales. A PHLS Dairy Products Working Group Study. *Epidemiol Infect* 1999;122:403-8.
16. Pettersen EK. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984;92:175-6.
17. Riemann HP, Meyer ME, Theis JH, Kelso G, Behymer DE. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. *J Pediatr* 1975;87:573-6.
18. Sacks JJ, Roberto RR, Brooks NF. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *JAMA* 1982;248:1728-32.
19. Sanger VL, Chamberlain DM, Chamberlain KW, Cole CR, Farrell RL. Toxoplasmosis. V. Isolation of *Toxoplasma* from cattle. *JAMA* 1953;123:87-91.
20. Skinner LJ, Timperley AC, Wightman D, Chatterton JM, Ho-Yen DO. Simultaneous diagnosis of toxoplasmosis in goats and goatowner's family. *Scand J Infect Dis* 1990;22:359-61.



ELSEVIER

Veterinary Parasitology 91 (2000) 23–32

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/vetpar

The prevalence and avidity of *Toxoplasma gondii* IgG antibodies in pigs from Brazil and Peru

F. Suárez-Aranda^a, A.J. Galisteo Jr.^b, R.M. Hiramoto^c, R.P.A. Cardoso^b,
L.R. Meireles^b, O. Miguel^a, H.F. Andrade Jr.^{b,*}

^a Dept. Prática de Saúde Pública/FSP, São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório de Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,
FMUSP, Av. Dr. E.C. Aguiar, 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brazil

^c S. Radiobiologia, IPEN/CNEN, São Paulo, SP, Brazil

Received 17 December 1999; accepted 17 March 2000

Abstract

Raw or inadequately cooked pork is an important source of *Toxoplasma gondii* infection, and the infection rate in animals used as human food, is an important risk predictor. The prevalence of this infection was estimated in 396 sera from 5-month old pigs obtained at abattoirs in São Paulo, Brazil (300) and Lima, Peru (96). The seroprevalence was higher in pigs from Peru (32.3%) as compared to Brazil (9.6%), as detected by ELISA and Western blot. Hemagglutination gave poor resolution which was not useful for the diagnosis of *T. gondii* infection. Specific antibody avidity is correlated with infection time, as shown in experimentally infected piglets. Using an arbitrary cut-off of 50% avidity index, Brazilian pigs were found to be more recently infected than Peruvian pigs. Pork should be considered a significant source of human *T. gondii* infection both in Brazil and Peru. Avidity assays could help in the detection of the time of *T. gondii* infection in pigs, allowing preventive management. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Toxoplasma gondii*; Pigs; Prevalence; Avidity; Brazil; Peru

1. Introduction

Toxoplasma gondii, an Apicomplexa protozoan parasite, infects man and other warm-blooded animals (Dubey, 1993). Human toxoplasmosis is generally asymptomatic in immunocompetent individuals, with occasional eye involvement, but causes devastating disease resulting in immune system immaturity or deficiency (Beaman et al., 1995). This

* Corresponding author. Tel.: +55-11-3066-7010; fax: +55-11-2805-237.

E-mail address: hfandrad@usp.br (H.F. Andrade Jr.)

infection has acquired great importance due to the HIV epidemic, causing toxoplasmic encephalitis, a disabling and lethal disease in 20% of AIDS patients (Luft and Remington, 1992). Therapeutically immunosuppressed patients, such as patients with cancer or transplant histories, may also have toxoplasmic encephalitis, mostly due the reactivation of tissue cysts (Israelski and Remington, 1993).

Toxoplasma gondii infection in women during pregnancy can result in fetal infection, with severe problems, including abortion, encephalitis, mental retardation and blindness, due to infection through the placenta and immune immaturity (Frenkel, 1990; Remington et al., 1995). Toxoplasmosis is also an important cause of neonatal deaths and abortion in sheep, goats and pigs.

The infection can be transmitted to humans by ingestion of oocysts in food and water contaminated with cat feces or by consuming tissue cysts in undercooked meat (Dubey and Beattie, 1988). Raw or inadequately cooked pork is considered to be an important source of *Toxoplasma* infection in the USA (Dubey, 1991). Infective tissue cysts have been found repeatedly in commercial cuts of pork from both experimentally and naturally infected pigs (Dubey et al., 1986; Dubey, 1988).

Toxoplasmosis in pigs was first reported in 1951 on a farm in Ohio (Sanger and Cole, 1955). *Toxoplasma gondii* infection in pigs can be confirmed by definitive histological examination or by bioassays that require isolation of organisms from fresh tissue. Usually, livestock can also be analyzed by more practical serological surveys. By this approach, the prevalence of *T. gondii* infection was found to range from as low as 4% to as high as 69% in pigs from the USA (Dubey, 1990), with similar variable results in other countries (Van Knapen et al., 1995). The prevalence of infection was also related to the type of pig production, such as intensive or extensive management, contact with pasture and age of sows. Few studies have been conducted in South American countries, with sporadic prevalence estimates in Brazilian pigs (Jamra, 1969) showing a prevalence of over 40% in 1986 (D'Angelino and Ishizuka, 1986). The main serological tests used for these assays was indirect immunofluorescence, hemagglutination and microagglutination of fixed tachyzoites, with no attempts to use ELISA or antibody avidity, a useful technique for the detection of the time of the infection (Jenum et al., 1997). The purpose of the present work was to standardize an ELISA test for the determination of seroprevalence of toxoplasmosis in pigs from Brazil and Peru. We also developed an avidity assay for the detection of early infection in these animals to facilitate better preventive management.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

The RH strain of *T. gondii* was maintained as frozen stabulates in liquid N₂ or by successive intraperitoneal (i.p.) passages in Swiss mice, in the Laboratory of Protozoology of the Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. All plastic ware, reagents and conjugates were purchased from Sigma (St. Louis, MO) and solutions were prepared with MilliQ high quality water.

2.2. Swine sera

We analyzed 396 serum samples from 5-month-old pigs obtained at abattoirs in São Paulo, Brazil (300), and Lima, Peru (96). Blood was collected during slaughter, immediately after killing. After clotting, serum was separated from the clot by centrifugation at $1000\times g$ for 10 min, aliquoted and stored at -20°C .

2.3. Experimental infection

An anti-*Toxoplasma* IgG-negative piglet was bought from a Duroc pig producer, with clean facilities and good management. Several piglets were tested for specific anti-*T. gondii* IgG and a seronegative piglet was maintained by a team of veterinarians of the Veterinary Hospital of USP, receiving commercial chow, water and mineral supplements ad libitum throughout the experimental period.

A blood sample was collected before *T. gondii* injection and used as negative control. The animal was then inoculated subcutaneously (s.c.) with 10^7 viable forms of tachyzoites of the RH strain of *T. gondii*, obtained from an infected mouse. The pig was carefully observed for 140 days, a period during which it did not present any clinical signs of the infection, with normal growth. Blood samples were collected 60, 80, 100, 120 and 140 days after infection. The samples obtained at Day 0 and Day 140 after infection were used, respectively, as negative and positive standards in all reactions.

2.4. Antigen

Toxoplasma gondii antigen was prepared as described elsewhere (Camargo et al., 1978). Briefly, tachyzoites were harvested from mouse peritoneal cavity in phosphate buffered saline (PBS), recovered by centrifugation, washed, counted and submitted to sonication for four periods of four cycles per 30 s in an ice bath, with phase contrast microscopy control, and the procedure was repeated as necessary. When most parasites were lysed, 0.3 M NaCl was added and the suspension was cleared by centrifugation at $10000\times g$ for 3 min. The protein content of the supernatant was determined (Bradford, 1976) and aliquots were maintained at -70°C until used as purified antigen.

2.5. Indirect hemagglutination

In this assay we used a commercial kit, HAP Toxoplasmosis (Salck[®]), according to manufacturer instructions. Briefly, the serum sample was inactivated for 30 min at 56°C , diluted 1:16 and added to 96 multiwell V bottom plates (25 μl per well) after the addition of 25 μl of a 1% suspension of red blood cells sensitized with *T. gondii* antigens. The plates were homogenized and incubated for 1 h in a humid chamber without shaking. The test was positive when a layer of agglutinated erythrocytes was formed in more than 50% of the bottom of the V-shaped well, and negative when a small dot of non-agglutinated RBC was formed in the center of the well. Titration was also performed using the highest dilution that induced agglutination in this test.

2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay — ELISA

The ELISA was performed as described elsewhere (Venkatesan and Wakelin, 1993). Briefly, ELISA plates (Multiwell Plate/polystyrene, Sigma®) were coated with 100 µl/well of a solution containing 10 µg/ml of the antigen extract diluted in 0.1 M carbonate buffer, pH 9.5, and incubated overnight at 4°C. The plates were then washed five times with PBS containing 0.02% Tween 20 (PBS-T), and blocked for 1 h at 37°C with PBS containing 2% fat-free lyophilized milk in a humid chamber. After this step, 100 µl of serum sample, diluted 1:100 in PBS-T, was added to each well and the plate was incubated for 1 h at 37°C. After additional washing with PBS-T, 100 µl of peroxidase-conjugated anti-swine immunoglobulin G (IgG) diluted 1:10,000 in PBS-T, was added to the wells, with incubation at 37°C for 1 h, followed by five washings with PBS-T. The reactions were developed with 100 µl per well of OPD solution (1 mg/ml *o*-phenylenediamine and 0.03% H₂O₂ in 0.2 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0). The reaction was stopped with 25 µl per well of 4 N HCl and the optical density (OD) at 492 nm was measured in a microplate reader (Labsystems Multiskan MS). The cut-off value (0.2706) was determined using 10 negative sera samples from piglets, representing the 99% upper confidence level.

The avidity was determined by ELISA using an additional incubation with 6 M urea, pH 7.0, for 5 min after test serum incubation, followed by PBS-T washing and routine conjugate and development procedures. Sera of positive and negative pigs were included as controls in all assays. The avidity index was determined as the percent of resistance of OD to urea washing. This analysis was performed only in positive ELISA sera.

2.7. Western blot

The Western blot was performed as described elsewhere (Hudson and Hay, 1989). Purified antigen was submitted to SDS-PAGE in a 12.5% running gel, with subsequent electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% fat-free milk, lyophilized in PBS-T, cut into 3 mm strips and stored until use. Sera from animals were reacted with strips containing *T. gondii* antigens re-hydrated with PBS-T, for 18 h at 4°C. After careful washing with PBS-T, bound antibodies were detected by sequential incubation with peroxidase-conjugated anti-swine IgG for 60 min followed by washings, and developing solution containing 0.6 mg/ml 4-chloro-1-naphthol and 0.03% hydrogen peroxide in PBS.

2.8. Statistical analysis

Frequencies were compared by the χ^2 -test with Yates correction, using the EpiInfo 6.01 statistical package, and were considered significantly different when the probability of equality was less than 0.05 ($P < 0.05$), with estimation of the 95% confidence interval.

Table 1

Distribution of the ELISA reaction to *Toxoplasma gondii* in Brazilian and Peruvian Swine

ELISA	Brazil			Peru		
	n	%	CI ^a	n	%	CI ^a
Positive	29	9.6	6.6–13.6	31	32.3	23.1–42.6
Negative	271	90.4	86.4–93.3	65	67.7	57.4–76.9
Total	300	100		96	100	

^a Confidence interval (CI)=95%, $P < 0.001$ (χ^2 (Yates)=27.23) (Brazil vs. Peru).

3. Results

3.1. Serological analysis

The results obtained with anti-*T. gondii* IgG detected by ELISA demonstrated 9.6% positivity in the Brazilian pig sera and 32.3% in the Peruvian pig sera (Table 1), indicating higher infection levels by *T. gondii* in Peruvian pigs.

Hemagglutination using commercial *T. gondii* antigen RBC demonstrated higher frequencies of positive sera in both populations (Table 2) as compared to those obtained by ELISA. The cut-off dilution used was compared to standard sera and most samples gave a positive reaction at lower dilutions. The kappa agreement between tests was very low, between 0.20 and 0.15, suggesting that this hemagglutination assay may not be useful for anti-*T. gondii* antibody detection in pig sera.

All ELISA-positive sera were tested against strips of SDS-PAGE separated *T. gondii* antigens, as described in Section 2. All Peruvian serum samples tested by ELISA recognized several *T. gondii* antigens by Western blotting, and the intensity of stained bands correlated well with IgG antibody titers. Some of the Brazilian pig sera showed a weak and undefined reaction in this test, probably due to low titers, being clearly positive only at higher titers. Hemagglutination-positive and ELISA-negative sera gave no reaction, showing a probably undefined cross-reaction in the unrelated erythrocyte assay.

3.2. Avidity assays

Analysis of sequential serum samples from the experimentally infected pig showed a clear increment in IgG anti-*T. gondii* production and in avidity index, as determined by urea

Table 2

Comparison of results obtained by indirect hemagglutination and by ELISA in seroprevalence study of *Toxoplasma gondii* in Brazilian and Peruvian swine^a

ELISA	Brazil		Peru	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Positive	14	15	25	6
Negative	49	222	39	26

^a Kappa coefficient: 0.198 (Brazil) and 0.16 (Peru).

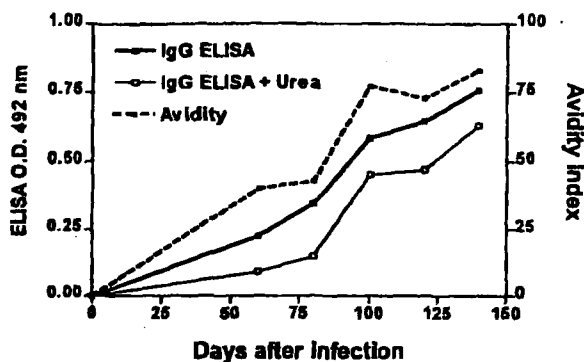


Fig. 1. Time sequence of specific anti-*Toxoplasma gondii* IgG antibody and its avidity during pig experimental infection. Solid lines show OD of IgG ELISA, solid squares total IgG, empty squares urea resistant IgG. Dotted line express the IgG avidity index as described in Section 2.

extraction (Fig. 1). Fifty percent avidity of the IgG antibodies occurred sometime between 75–100 days of infection. When the avidity index, expressed as percent of ELISA-resistant titer, was determined in Brazilian and Peruvian positive samples, a higher frequency of high avidity sera was observed in the Peruvian samples compared to the Brazilian ones, as shown in Fig. 2. When a standard cut-off of 50% was used to determine acute or recent infection, we found a higher frequency of Brazilian pigs presenting early or recent infection as compared to Peruvian pigs.

4. Discussion

Our data show that the ELISA for swine IgG specific antibodies against *T. gondii* is a useful test for the determination of the prevalence of toxoplasmosis in pigs from Brazil and Peru, as also confirmed by Western blotting detection. ELISA is a sensitive serological test,

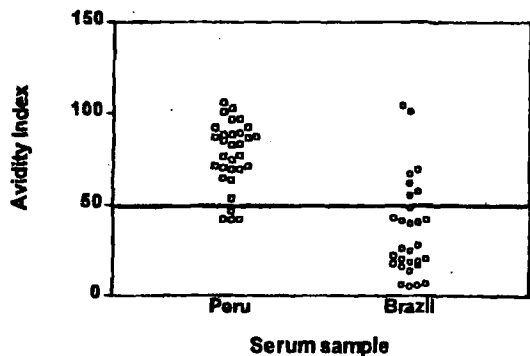


Fig. 2. Avidity index of anti-*Toxoplasma gondii* positive sera samples obtained from Brazilian or Peruvian swine. The line express the artificially defined cut-off of low and high avidity.

able to detect low antibody titers either in recent infections (Dubey et al., 1996), or in animals subjected experimentally to small numbers of infective forms for longer times of as much as 800 days (Dubey et al., 1997). Although few reports are available, ELISA is extremely efficient for the detection of IgG antibodies against *T. gondii* in swine (Hirvela-Koski, 1992; Lind et al., 1997).

The indirect hemagglutination assay employed in our experiment yielded poor detection and resolution, as also reported by others in studies in which this test gave poor resolution compared to the classical indirect immunofluorescence assay (D'Angelino and Ishizuka, 1986). This event may be ascribed to many factors, including cross-reactions with blood groups (Stormont, 1982; Shan et al., 1998), since most indirect hemagglutination reagents are made with bird red blood cells as a biological support, or to low sensitivity. The low specificity of the test emphasizes the need for proper standardization before its use in epidemiological surveys.

The 9.6% level of infection in Brazilian pigs was lower than the 22.5% prevalence values reported by Corrêa et al. (1978) and higher values of 54% for pigs reared on human food garbage and 49.2% in pigs raised on semi-intensive crop feed management (D'Angelino and Ishizuka, 1986). In those studies, the test used was the classical immunofluorescence assay without an internal control (experimentally infected pig), as used in our study.

Serologic prevalence of toxoplasmosis presents a wide inter- and intra-region variation (Dubey et al., 1995), as described in the USA, where wide variations in the prevalence of the infection occur in different farms in the same region (Weigel et al., 1995).

We also found a higher serological prevalence of toxoplasmosis in Peruvian pigs. Despite our efforts, we could obtain no information about the type of food or environment for the Peruvian pigs. In Brazil, most swine farms are devoted to intensive management, with slaughter at 5 months of age; this might explain the lower titers found in Brazilian pigs compared to those in Peru. The rearing of swine under confined conditions without pasture contact does not exclude contamination of feed with cat feces, but a study conducted in Brazil indicated low prevalence of *T. gondii* antibodies in intensively managed pigs. We cannot exclude the possibility that in the present study the Peruvian pigs were older than Brazilian pigs. When weight and age were studied in terms of the prevalence of swine toxoplasmosis, a high proportion of infected pigs was observed among larger or older pigs (D'Angelino and Ishizuka, 1986).

Other pork-transmitted parasitic infections such as *Taenia solium* are also highly prevalent among pigs and among people in the rural areas of Peru (Diaz et al., 1992; Evans et al., 1997), suggesting a more extensive pig-rearing activity in those areas.

Our experimental infection model allowed us to study the evolution of avidity in IgG-specific anti-*T. gondii* antibodies. Since pigs have an epitheliochorial placenta, without maternal antibody transmission, specific antibody detection in serum is confirmatory of infection. Production of IgM in swine experimentally infected with *T. gondii* is short lived, with only a few weeks of positivity; it cannot be used as an index of time of contamination (Lind et al., 1997). In our model, avidity increased up to 10 weeks after infection, allowing a crude estimate of the period of contamination. This is the main importance of IgG avidity detection in pig serum, without the need for several reagents for the determination of the period of contamination and sources.

The origin of pig infection by *T. gondii* may be ingestion of cysts in refuse from infected animals, of oocysts from cat feces in pastures or of milk from infected sows. Milk is a possible vehicle of *T. gondii*, since the microorganism was also detected in pig milk (Sanger and Cole, 1955). The mammary secretion (Deyrup-Olsen and Luchtel, 1998) allows for the passage of bradyzoites in milk from chronically infected animals (Pettersen, 1984). This fact could result in early infection of piglets, which could be controlled only by elimination of *T. gondii*-infected sows. This theoretical explanation is not supported by the fact that most Brazilian pigs presented low avidity antibodies in our study, suggesting that the infection would be acquired later in life, after weaning. The access to pasture is another important risk in toxoplasmosis transmission in pigs due to the risk of ingestion of oocysts shed by cats and disseminated in the soil and crops by water/rain, as described elsewhere (Davies et al., 1998). Since Brazilian pigs are reared under confined conditions without pasture contact, the most probable cause of *T. gondii* infection is contaminated food from carcasses and other garbage products of animal origin. The virulence of specific strains of *T. gondii* is another factor that interferes with the antibody response of infected swine (Omata et al., 1994).

Our data demonstrated that consumption of raw or undercooked meat from these animals can be an important source of human *T. gondii* infection (Torres et al., 1991), and is more significant in Peru than in Brazil. The serologic assays used in our study can provide adequate information both about the prevalence of *T. gondii* infection in pigs and about the period of contamination of these animals, allowing precise intervention for the control of infection on pig farms.

Acknowledgements

We gratefully thank the staff of USP Veterinary Hospital for maintaining experimentally infected swine, and the people from abattoirs in Brazil and Peru who helped F.F. Suarez with the sample collection. A.J. Galisteo Jr. is a FAPESP fellow (98/1681-0) and R.M. Hiramoto is a CNPq fellow. L.R. Meireles is a FAPESP fellow (98/13323-0). We are indebted to Mrs. Isabel C. Alves for technical assistance.

FAPESP (96/5875-8) and LIMHCFMUSP-49 supported this work.

References

- Beaman, M.H., McCabe, R.E., Wong, S., Remington, S.J., 1995. *Toxoplasma gondii*. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.), Principles and Practice of Infectious Diseases, Vol. II. Churchill Livingstone, New York, pp. 2455–2475.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Camargo, M.E., Ferreira, A.W., Mineo, J.R., Takiguti, C.K., Nakahara, O.S., 1978. Immunoglobulin G and Immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assays and defined serological patterns. *Infect. Immunol.* 21, 55–58.
- Corrêa, F.M., Salata, E., Oliveira, M.R., 1978. *Toxoplasma gondii*: diagnóstico pela imunofluorescência indireta em suínos no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.* 45, 209–212.

- D'Angelino, J.L., Ishizuka, M.M., 1986. Avaliação da prevalência de infecção toxoplásmica em rebanhos suínos pela prova de imunofluorescência indireta e hemaglutinação. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 100, 634–644.
- Davies, P.R., Morrow, W.E., Deen, J., Gamble, H.R., Patton, S., 1998. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Prev. Vet. Med.* 36, 67–76.
- Deyrup-Olsen, I., Luchtel, D.L., 1998. Secretion of mucous granules and other membrane-bound structures: a look beyond exocytosis. *Int. Rev. Cytol.* 183, 95–141.
- Diaz, F., Garcia, H.H., Gilman, R.H., Gonzales, A.E., Castro, M., Tsang, V.C., Pilcher, J.B., Vasquez, L.E., Lescano, M., Carcamo, C., 1992. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in Peruvian village. The cysticercosis working group in Peru. *Am. J. Epidemiol.* 135, 875–882.
- Dubey, J.P., 1988. Long-term persistence of *Toxoplasma gondii* in tissues of pigs inoculated with *T. gondii* oocysts and effect of freezing on viability of tissue cysts in pork. *Am. J. Vet. Res.* 49, 910–913.
- Dubey, J.P., 1990. Status of toxoplasmosis in pigs in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 270–276.
- Dubey, J.P., 1991. Toxoplasmosis — an overview. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 22 (Suppl.), 88–119.
- Dubey, J.P., 1993. *Toxoplasma*, neospora, sarcocystis, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier, J.P. (Ed.), *Parasitic Protozoa*, Vol. VI. Academic Press, New York, pp. 1–57.
- Dubey, J.P., Beattie, P. (Eds.), 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dubey, J.P., Murrell, K.D., Fayer, R., Schao, C.A., 1986. Distribution of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in commercial cuts of pork. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 1035–1037.
- Dubey, J.P., Thulliez, P., Weigel, R.M., Andrews, C.D., Lind, P., Powell, E.C., 1995. Sensitivity and specificity of various serologic tests for detection of *Toxoplasma gondii* infection in naturally infected sows. *Am. J. Vet. Res.* 56, 1030–1036.
- Dubey, J.P., Andrews, C.D., Lind, P., Kwok, O.C., Thulliez, P., Lunney, J.K., 1996. Antibody responses measured by various serologic tests in pigs orally inoculated with low numbers of *Toxoplasma gondii* oocysts. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1733–1737.
- Dubey, J.P., Andrews, C.D., Thulliez, P., Lind, P., Kwok, O.C., 1997. Long-term humoral antibody responses by various serologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 68, 41–50.
- Evans, C.A., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Verastegui, M., Garcia, H.H., Chavera, A., Pilcher, J.B., Tsang, V.C., 1997. Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Cysticercosis working group in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 33–37.
- Frenkel, J.K., 1990. Toxoplasmosis in human beings. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 196, 240–248.
- Hirvela-Koski, V., 1992. The prevalence of toxoplasma antibodies in swine sera in Finland. *Acta Vet. Scand.* 33, 21–25.
- Hudson, L., Hay, F.C. (Eds.), 1989. *Practical Immunology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Israelski, D.M., Remington, J.S., 1993. Toxoplasmosis in patients with cancer. *Clin. Infect. Dis.* 17 (Suppl. 2), S423–S435.
- Jamra, L.F., 1969. On the isolation *Toxoplasma gondii* from human food of animal origin. Partial results in the city of São Paulo (Brazil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 11, 169–176.
- Jenum, P.A., Stray-Pedersen, B., Gundersen, A.G., 1997. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1972–1977.
- Lind, P., Haugegaard, J., Wingstrand, A., Henriksen, A.S., 1997. The time course of the specific antibody response by various ELISAs in pigs experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. *Vet. Parasitol.* 71, 1–15.
- Luft, B.J., Remington, J.S., 1992. Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 15, 211–222.
- Omata, Y., Diloranzo, C., Venturini, C., Venturini, L., Igarashi, I., Saito, A., Suzuki, N., 1994. Correlation between antibody levels in *Toxoplasma gondii* infected pigs and pathogenicity of the isolated parasite. *Vet. Parasitol.* 51, 205–210.
- Pettersen, E.K., 1984. Transmission of toxoplasmosis via milk from lactating mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. B.* 92, 175–176.
- Remington, J.S., McLeod, R., Desmonts, G., 1995. Toxoplasmosis. In: Remington, J.S., Klein, J.O. (Eds.), *Infectious Diseases of the Fetus & Newborn Infant*, 4th Edition. Saunders, Philadelphia, pp. 140–268.

- Sanger, V.L., Cole, C.R., 1955. Toxoplasmosis. VI. Isolation of *Toxoplasma* from milk, placentas, and newborn pigs of asymptomatic carrier sows. *Am. J. Vet. Res.* 16, 536–539.
- Shan, B., Sugiura, T., Yamashita, U., 1998. Five monoclonal antibodies against glycophorin A of human erythrocyte recognize glycoprotein of bovine erythrocyte. *Hybridoma* 17, 55–62.
- Stormont, C.J., 1982. Blood groups in animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181, 1120–1124.
- Torres, A.L., Chinchilla, M., Reyes, L., 1991. Antibodies against *Toxoplasma gondii* in swine in Costa Rica: epidemiologic importance. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 33, 129–133.
- Van Knapen, F., Kremers, A.F.T., Franchimont, J.H., Narucka, U., 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in the Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet. Q.* 17, 87–91.
- Venkatesan, P., Wakelin, D., 1993. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol. Today* 9, 228–232.
- Weigel, R.M., Dubey, J.P., Siegel, A.M., Hocfing, D., Reynolds, D., Herr, L., Kitron, U.D., Shen, S.K., Thulliez, P., Fayer, R., 1995. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in swine in Illinois in 1992. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206, 1747–1751.

Windows 95

Insira o disco no drive do CD-ROM

Selecione **INSTAR** e
escolha **INSTAR Windows 95**

Digite **Letra: \INSTALV**,
onde **Letra** corresponde ao drive do
CD-ROM, e pressione **ENTER**.
Siga as instruções de instalação.

Para executar o aplicativo,
de duplo clique no ícone **CDN**

CGEN 0011098

EFFECTS OF COBALT 60 IONIZING RADIATION ON THE METABOLISM AND INFECTIVITY OF A PARASITIC PROTOZOA, *Toxoplasma gondii*

Roberto M. Hiramoto^{**}, Andrés J. Galisteo Jr^{*} & Heitor F. Andrade Jr^{*}

^{*}Lab. Protozoologia – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – FMUSP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470 – Cerqueira Cesar
05403-000 São Paulo, SP, Brasil

^{**}Supervisão de Radiobiologia/IPEN/CNEN-SP
Caixa Postal 11 0407
05411970, São Paulo, SP, Brasil

ABSTRACT

Toxoplasma gondii infection causes severe and lethal disease on fetus, AIDS patients and recipients of organ transplants. There are few reports of the use of ionizing radiation to attenuate or abolish parasite growth, without any detailed study on induced alterations or effective doses. We reported that the lower dose of ⁶⁰Co radiation that abolishes parasite growth was 200 Gy, and in this report, we described the viability, cell invasion, metabolism and immunogenicity of this parasite after irradiation. We analyze the viability (vital staining), metabolism, by MTT oxidative conversion, protein metabolism, by ³H-proline and nucleic acid synthesis, by ³H-hypoxanthine incorporation in short terms cultures. Parasite invasion was tested in LLC-MK2 cell in culture. The irradiated parasites show the same viability and invasiveness of viable parasites, without any interference of the radiation in the oxidative, proteic or nucleic acid metabolism. When mice injected with 10⁷ irradiated parasites by intraperitoneal route, were challenged 6 weeks later with viable parasites, they showed partial resistance to infection, with higher survival time. Antibody specificity was tested in sera from those animals, before challenging, and presented the same epitopic specificity of infected and treated animals, but diverse from mice injected with formaldehyde killed parasite, by Western-blot analysis against SDS-PAGE isolated *T.gondii* antigens. Those data suggests that irradiated parasites maintain its invasiveness, inducing a partial immunity and similar humoral immunogenicity than viable parasites, but without any evidence of reproductive capacity.

Keywords: Radiation, *Toxoplasma gondii*, invasion, and metabolism

I. INTRODUCTION

Toxoplasmosis, a high prevalent human infection, is caused by an intracellular obligatory parasite, *Toxoplasma gondii*. This infection is transmitted by the ingestion of raw or undercooked meat containing viable cysts, aside contamination of water or food with oocysts from cat feces [1]. Human chronic unapparent infection is common, with more than 60% infected people in Brazil [2]. Despite some acute severe or ocular cases, the immune response is efficient for acute infection control but without elimination of tissue cysts, viable for years, also resistant to chemotherapy [3]. Unfortunately, the disease is severe, deadly and destructive when this immune response is compromised by immaturity, disease or medical therapy, as in fetus or acutely infected mothers, AIDS patients or recipients of organ transplants [4]. Despite several attempts,

until now there no vaccine developed for this human infection, with some vaccines developed for veterinary use, but with low efficiency [5]. Several models were developed in mice, using different antigens and routes, all of them with conflicting results [6]. Ionizing radiation was used against *T.gondii* mostly in order to sterilize meat [7], but with few attempts of vaccine production, but with low efficiency [8]. These assays were conducted without any study of the radiation consequences in the parasite, with few if any quality control of the procedure. Recently, we reported that tachyzoites, the invasive form, had its reproductive ability abolished by 200Gy of ⁶⁰Co radiation, both *in vivo* and *in vitro* [9]. The radiation could destroy this ability by inducing double breaks in cell DNA, with unbalanced chromosomal distribution in daughter cells [10], or by other mechanism, as membrane peroxidation and cell lysis [11], aside other less established phenomena, as apoptosis [12].

Here, we present data on the metabolism, cell invasion, infectivity and immunogenicity of tachyzoites of *T.gondii* submitted to 200Gy ^{60}Co radiation.

II. MATERIAL AND METHODS

Materials and reagents: All reagents used in the experiments were purchased from commercial sources, with no-analysis quality. The solutions were prepared with high quality water (MilliQ). The RH strain of *T.gondii* was maintained as frozen establates or by successive passages intraperitoneal (ip) in mice, in the Lab.Protozoology. isogenic mice, C57Bl/6j or Balb/C, or out-bred Swiss mice, were obtained from the colony of FMUSP and maintained in sterilized cages and absorbent media, with food and water *ad libitum*. The animals were treated as recommended by the Animal Experimentation Brazilian College (COBEA).

Parasites purification: Parasite suspension of infected animals were recovered by phosphate buffered saline (PBS) washings of peritoneal cavity, using sterility here and hereafter. After collection, the suspension of cells and parasites were centrifuged at 2000 g, 10 min and the pellets were suspended in equal volume of PBS, passed on a needle 0.1mm for rupturing infected cells, and immediately applied on PBS stabilized SEPHADEX® G 50-80 column. After PBS washing, the free parasites were collected and centrifuged as above. After counting and viability control using Trypan Blue, the parasites were suspended at 10^8 parasites/ml in PBS. Preparations with more than 1% mammalian cell contamination or viability less than 95% were discarded.

Radiation: Tachyzoites suspension, maintained in ice cold this, were irradiated at 20, 50, 100 and 200 Gy, in a uniform source of ^{60}Co gamma rays in a GammaCell (Atomic Energy of Canada, Ltd.) at a dose rate of 370 Gy/h, in the presence of oxygen and room temperature. Adequate controls were maintained outside the source for 24 h as controls.

Cell invasion assays: After irradiation the viability was determined in all samples by the Trypan Blue staining. Briefly, the parasite suspension was diluted in one volume Trypan Blue 0.4% in Hanks' Balanced Salt Solution pH 7.2, and the total cell and stained (dead) cell count was determined by phase contrast microscopy. LLC-MK2 cells maintained in plastic ware with RPMI 1640 medium containing 10 % fetal bovine serum and gentamycin (50 µg/ml). Trypsin separated cell suspensions were grown in 24 well slide chambers (Lab-Tek®) in the same medium until semi confluence, when 10^5 parasites irradiated with 200 Gy or viable was added. After 4h, the monolayer were submitted to three careful washings with PBS and immediately fixed with methanol and stained with Giemsa. Representative fields were photographed in an Axiophot epifluorescent microscope, and reprints scanned for publication.

Metabolic assays. Oxidative assay: Purified parasite suspension, 10^7 /ml, were submitted to short term culture, with RPMI 1640 medium without phenol red and supplemented with fetal bovine serum and gentamycin as described. After centrifugation to 3000 g/10min, the cells were suspended in the same medium and volume, and distributed on 24 multwell sterile plates, with MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Tyazolyl blue) (1mg/ml), and 10% samples were collected at 1, 2, 4 and 18 hr of 37°C incubation in CO₂ 5%/humid atmosphere. The samples were fixed with 1 volume of 4% formaldehyde/sodium phosphate 0.02M pH 7.2 solution and centrifuged by 800g/10min. After discarding the supernatant, the mitochondrial oxidative blue produced by cell layer was extracted with methanol (100 µl) and the absorbance at 570 nm determined in a microplate reader. **Protein and nucleic acid synthesis assays:** Short term culture of 10^7 /ml purified parasites suspensions irradiated or not were used, with Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium, containing fetal bovine serum and gentamycin as described, in 24 multwell plates. Protein synthesis was determined by adding ^3H -proline (2µCi/well) with incubation in the same above described conditions. After 1, 2, 4 e 18 hr, 100 µl aliquots were added to 2 sq cm pieces of filter paper, dried and dispensed in icecold 5% TCA for 1 hour. After two washes in ice cold 5% TCA and 1 time in ethanol, the papers were dried and dispensed on 10 ml Liquifluor solution. The TCA precipitable counts were determined in a Wallach Cintillation counter 1209, at 66% efficiency, and expressed in cpm (counts per minute). For total acid nucleic synthesis, both RNA and DNA, were used a similar model, except that the radioactive precursor added was ^3H -Hypoxanthine, 1 µCi/well, collected at the same time, schedule and procedures.

Immunization schedules: Suspensions of purified parasites irradiated with 200 Gy, 10^8 parasites/ml, were injected i.p on groups of C57Bl/6j mice. No deaths occurred. Viable parasites were injected at similar schedules, except that the mice received pyrimethamine (5 mg/Kg)/sulphadiazine (100 mg/Kg) as treatment *per os*, during 1 week, with 10% deaths due to treatment failure. Suspensions of viable parasites, at same concentration, were also fixed with a 4% formaldehyde solution for 24 hr and injected similarly. All parasite counts were adequately controlled in order to secure that the equal numbers of parasites were used. Weekly, blood (5µl) was collected from tail in standardized filter papers, dried and stored at -20°C until use. Before use, the soluble extract containing antibodies was obtained by adding 100 µl PBS to the paper, for 18hs at 4°C, in a microcentrifuge tube. After extraction, the tube was centrifuged and the supernatant used as a 1/20 dilution of blood. **Western blotting:** Purified parasites (10^8 /ml) were sonicated in PBS and immediately centrifuged for 10000g/3 min. The supernatant was collected, resulting in a 400 µg/ml protein, that was submitted to SDS-PAGE in a 12.5% running gel, as elsewhere described [13], with subsequent electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with a 2.5%

bovine sera albumin in PBS containing 0.02% Tween 20(PBST), cuted in 2 mm strips and stored dried until use. Sera from animals were reacted with strips with *T.gondii* antigens re-hydrated with PBST, for 18 h at 4°C. After careful washing with PBST, the antibodies were detected by sequential incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma), 60 min, washings, and addition of PBS containing 0,6mg/ml 4-cloro-1-naphtol and 0.03% hydrogen peroxide. After development, the strips were dried and scanned for documentation.

Protection assays of viable parasites challenge: Mice previously immunized 1 or two months before with one or two ip injections of 10^7 tachyzoites irradiated with 200 Gy, were challenged with ip injection of 10^3 viable parasites. The survival time of each animal was followed daily. Adequate controls non-immunized were added in each experiment. The mean survival time was compared with controls, by the Mann Whitney test [14], using a significance level of 0.05.

III. RESULTS

The viability of the parasites was not affected by irradiation, maintaining more than 95% of viable unstained parasites, as detected by Trypan Blue dye test, in none of our several preparations (quantitative data not shown)

For cell invasion ability, we tested irradiated parasites on LLC-MK2 cells. In Fig 1A, representative field of this assay showed that non irradiated parasites presented the three stages of the invasion, adhesion, and orientation and penetration [15], clearly identified in the preparation.



Figure 1. Scanned micrograph of LLC-MK2 cells challenged with viable irradiated tachyzoites, stained by Giemsa. A - Viable *T.gondii* tachyzoite challenge (→) B - 200 Gy irradiated tachyzoites challenge

When 200 Gy irradiated parasites were tested, the same process, with nearly equal efficiency, could be demonstrated (Fig. 1B)

Metabolic assays: The oxidative metabolism of irradiated parasites with 20, 100 and 200Gy could be seen in Fig 2, showing that the energetic consumption of the parasites was not affected by radiation, at any doses, and also there are some dose dependent increment at longer times, demonstrated by the increase of oxidated formazan accumulation in the cells.

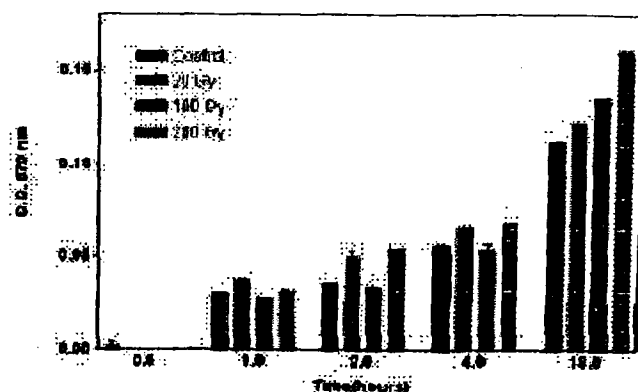


Figure 2. Oxidated formazan of MTT (respiratory burst) by tachyzoites of *T.gondii*, non-irradiated or irradiated at 20, 100 or 200Gy.

Protein synthesis was evaluated by TCA precipitable ^3H proline incorporation, using short-term cultures of irradiated tachyzoites. In the Fig. 3, is clearly seen the increment of labeled TCA product, protein, by the cells in viable parasites. The irradiated parasites (20,100 and 200 Gy) presented similar levels, showing that protein synthesis was not affected by radiation.

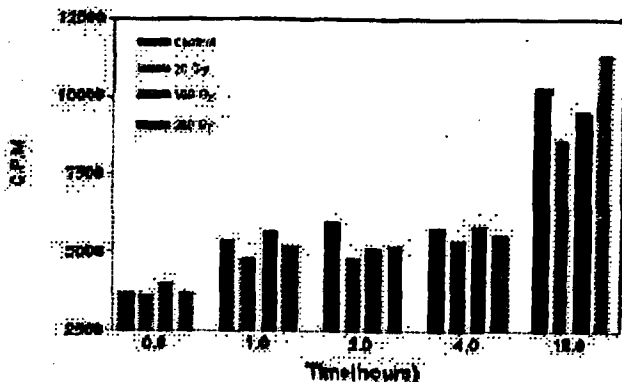


Figure 3. Incorporation of ^3H proline on TCA precipitable protein by viable or 20, 100 and 200Gy irradiated tachyzoites of *T.gondii*.

In order to observe the nucleic acid synthesis in four preparations we tried to use ^3H thymidine as a precursor of DNA synthesis, but in two experiments, no incorporation was found in viable parasites. This fact could be explained by the non-dividing stage used. For this reason, we studied the ^3H hypoxanthine incorporation, a precursor that is involved both in DNA or RNA synthesis in those parasites. The experiment was performed as described, and the TCA precipitable counts in viable and irradiated parasites could be seen in Fig. 4. As shown, there is a clear time dependent increase in nucleic acid

incorporation in viable parasites, which is similar to observe with 20, 100 and 200Gy irradiated parasites.

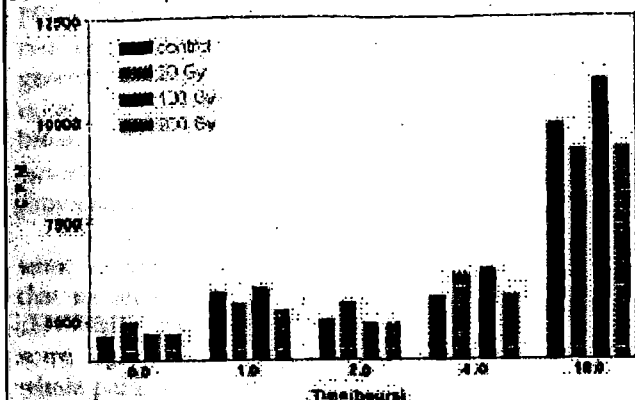


Figure 4. Incorporation of ^3H hypoxanthine in TCA precipitable nucleic acids in short term culture of purified tachyzoites of *T.gondii*, viable or irradiated with 20, 100 or 200 Gy.

Specificity of antibodies induced by irradiated parasites: We tested the antibody specificity induced by irradiated parasites, in Western Blot analysis. A scanned epiography is show in Fig.5. As clearly seen, the antibodies induced by irradiated parasites are clearly similar to the natural infection with viable parasites, unlike formaldehyde treated parasites.

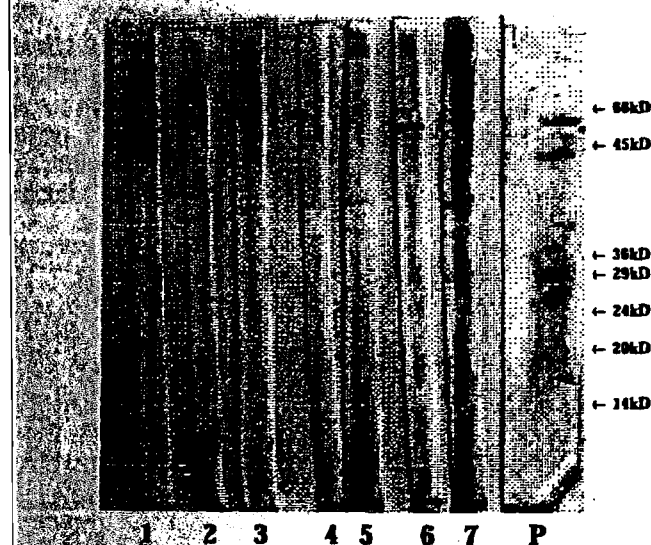


Figure 5. Antibody specificity of sera from mice challenged with *T.gondii* (Lanes: 1 - No serum; 2 - Normal mice serum; 3 - Mice serum inoculated with irradiated parasites at 200Gy, one dose; 4 - two doses; 5 - one serum inoculated with irradiated parasites at 200Gy, three doses; 6 - one serum inoculated with formaldehyde treated parasites, three doses; 7 - treated mice serum with pyrimethamine/sulphadiazine; P - Molecular weight markers).

Protection from challenge with viable parasites: The survival of mice previously immunized with 200 Gy irradiated parasites were observed, comparing with control mice. The challenge was low but causes the death of all animals, but immunized mice presented a clear longer survival, as shown in Fig.6, with several immunization schedules, which did not presented clear differences. This allows us to consolidate all data from immunized

animals, as shown in Fig.7, with a significant increase in survival ($p=0.0265$, Mann-Whitney test).

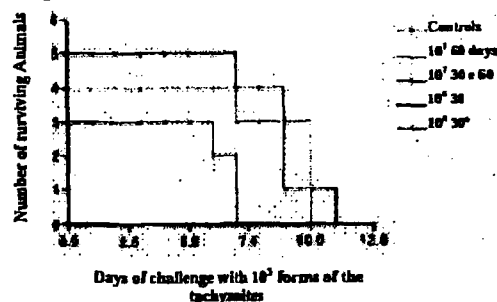


Figure 6. Daily survival of mice with several schedules of immunization with 200 Gy irradiated parasites.

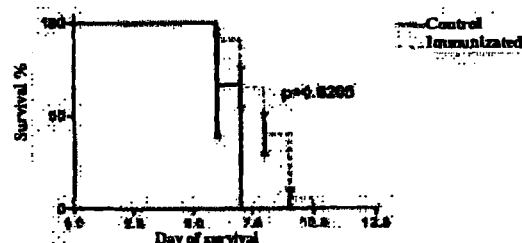


Figure 7. Consolidated survival time of immunized mice compared to non immunized controls.

IV. DISCUSSION

Our data clearly showed that the ionizing radiation modifies only the reproductive ability of tachyzoites of *T.gondii*, without affecting early viability, cell invasion, oxidative respiration and metabolism, for protein or nucleic acid synthesis.

Despite some immunological approaches, most studies dealing with the action of ionizing radiation on *T.gondii* relegate those functional aspects to a secondary level [6,7,8]. Our studies on antibody specificity show that this approach could induce a humoral response similar as comparable to that of viable agents, which is not induced by chemically treated parasites.

The technique that was used in this experiment has been used by others authors, for similar parasites [16,17], but has been not used for *Toxoplasma* tachyzoites until now.

The use of labeled proline provided a quantitative approach to the protein synthesis of this agent and at least two proteins rich in these residues were found [12,13]. As this incorporation was not affected by radiation, is quite acceptable that this metabolic path is maintained after irradiation, with consequent implications. The nucleic acid synthesis was present in the tachyzoite, judged by labeled hypoxanthine incorporation, which could be explained by mRNA or ribosomal RNA synthesis [10], due to Go stage of the parasite, that starts its cell division only after entering the host cell [3]. As our assays show that this incorporation was not affected by radiation, it is probable that these syntheses would be maintained. Double breaks in DNA strands are widely located in the cell genome, and,

probably, could exist away from the exact sequences of genes coding RNA, usually a small part of the genome [10]. Thus, our data are compatible with this action of radiation that impedes only the correct balance of the genome between daughter cells in cell division, inducing a mitotic death of the agent. The repair of single strand breaks of DNA in *T.gondii* was reported as highly efficient, specially those induced by OH[•] [18], which could also provided a quick repair of mRNA areas in the genome.

As antigens, irradiated tachyzoites provided the same antibody specificity of viable parasites, suggesting that its antigen processing paths are very similar, unlike chemically treated antigens. These data are conflicting with some reports that found the same antigenicity of extracts or whole parasites [6], but in our system no adjuvant was used nor higher amounts of antigen.

In our protection assays a low efficiency protection was achieved, similar to those found by others [8]. This fact could be induced by the way, which the challenge was provided, quite different from the usual contagion. New schedule of testing, using per Os contamination could demonstrate more clearly a usefulness of irradiated parasites in these studies. Another fact was the extreme virulence of RH strain, similar to rarely naturally found parasites, unlike cyst inducing less aggressive more frequent strain [3].

Concluding, our data show that ionizing radiation could be an excellent tool for abolish the reproductive ability of *T.gondii* tachyzoites, without affecting most of its functions, allowing the immune system to recognize the same of the viable agent without risk of progressive infection or residual cysts, with remarkable importance in vaccine production.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Roselaine A. P. Cardoso for him help in laboratory preparations and Eng. Carlos Gaia da Silveira and Eng. Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari from IPEN to technical assistance during irradiation. FAPESP no 1996/5875-8 and LIMHCFMUSP49 supported this work. R.M. Hiramoto was a fellow from CNPq.

REFERENCES

- [1] DUBEY, J.P. Toxoplasmosis - An overview. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 22(Suppl): 88-119, 1991.
- [2] GUIMARÃES, A.C.S., KAWARABAYASHI, M., ORGES, M.M., TOLEZANO, J.E. & ANDRADE JR., F. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in São Paulo Metropolitan region. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 35:479,483, 1993.
- [3] DUBEY, J.P. - Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: KREIER, JP (ed.) Parasitic Protozoa vol. 6 Academic Press New York p. 1-57, 1993.
- [4] THOMAS, P.A. & PELLOUX, H. Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. Parasitol. Today, 9(2): 61-63, 1993.
- [5] BUXTON, D., THOMSON, K., MALEY, S. WRIGHT, S. & BOS, H.J. Vaccination of sheep with a live incomplete strain (S48) of *Toxoplasma gondii* and their immunity to challenge when pregnant. Vet. Rec., 129(5): 89-93, 1991.
- [6] KRAHENBUHL, J.L., RUSKIN, J. & REMINGTON, J.S. The use of killed parasites in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. J. Immunol., 108(2): 425-431, 1972.
- [7] SONG, C.C., YUAN, X.Z., SHEN, L.Y., GAN, X.X. & DING, J.Z. The effect of Cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol., 23(01): 89-93, 1993.
- [8] BAKAL, P.M. & VELD, N. Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. Z. Parasitenkd., 59(3): 211-217, 1979.
- [9] HIRAMOTO, R.M., ALMEIDA, B.S.V., CARDOSO, R.P.A. & ANDRADE JR.H.F. *Toxoplasma gondii*: Effects of 60-Co ionizing radiation in its viability and infectivity, detected in vitro in LLC-MK2 cells and in vivo on C57Bl/6j mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91: (S) 40, 1996.
- [10] VOET, D. & VOET, J. Biochemistry. 2nd ed., New York, John Wiley & Sons, pp. 56-70, 1995.
- [11] BERROUD, A., LE ROY, A. & VOISIN, P. Membrane oxidative damage induced by ionizing radiation detected by fluorescence polarization. Radiat Environ Biophys. 35 (4): 289-295, 1996.
- [12] LEMES, M. - O uso de apoptose de linfócitos periféricos humanos como método alternativo em dosimetria biológica dos efeitos da radiação ionizante do cobalto-60. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 1997.
- [13] HUDSON, L. & HAY F - Practical Immunology 3rd ed. Blackwell, New York, 1989.
- [14] WOOLSON, R. F. Statistical methods for the analysis of biomedical data. John Wiley & Sons, New York, 1987.
- [15] DUBREMETZ, J.F. Host cell invasion by *Toxoplasma gondii*. Trends Microbiol 6(1): 27-30, 1998.
- [16] SHAIQ, M.F., CHEN, J.G. & CHANG, F.Y. A comparison of various methods for the determination of viability of parasitic flagellates. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health, 18(4): 538-546, 1987.

[17] BERG, K., ZHAI, L., CHEM, M., KHARAZMI, A. & OWEN, T.C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol. Res.*, 80(3): 235-239, 1994.

[18] HUGHES, H.P., BOIK, R.J., GERHARDT, S. A. & SPEER, C.A. Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates and a new mathematical model for parasite killing. *J. Parasitol.*, 75(4): 489-497, 1989.

ASTMH

50th Annual Meeting

Announcement and
Registration Details

November 11–15, 2001

Hilton Atlanta Hotel and Towers | Atlanta, Georgia USA



**AMERICAN SOCIETY OF
TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**

50th ANNUAL MEETING

NOVEMBER 11 -15, 2001

THE HILTON ATLANTA HOTEL & TOWERS

ATLANTA, GEORGIA

Search the Program Book

(by abstract word, title, subject, author and presentation time)

on-line at <http://www.astmh.org/>

Late breaker abstracts, and post-publication changes in the program and abstracts may be found on the Web page.

The Scientific Program Committee welcomes your input to the format and planning of this and future meetings of the ASTMH. Organization of symposia and participation in meeting planning through the Program Committee is encouraged for all interested ASTMH members.

was compromised within 4 to 8 hours after the addition of either *T. vaginalis* isolate. In addition to conducting cytotoxicity studies, we examined the influence of *T. vaginalis* on HIV-1 replication. Resting CD8-depleted peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were incubated overnight with JH31 or Balt42 and HIVLAI, washed, and placed in culture. Alternatively, PBMCs were incubated with HIVLAI plus filtered *T. vaginalis* culture filtrate medium (CFM) or fresh medium (TYM) overnight. Treatments were added back once after washing to selected cultures. Viral replication was monitored using the p24gag ELISA. JH31 and Balt42 induced a 3- to 4-fold increase in HIV replication over HIVLAI control by day 5 and a >10-fold increase by day 7. CFM induced HIV-1 replication to similar levels when added back after washing; CFM added only on addition of virus and not after washing induced replication to a lesser degree. *T. vaginalis*-induced HIV-1 replication was associated with cellular activation. Collectively, these data suggest that *T. vaginalis* degradation of urogenital epithelial monolayers and induction of HIV-1 replication could in part be responsible for the epidemiologic association of trichomoniasis with sexual transmission of HIV-1.

- 206 TRICHOMONAD INDUCTION OF MONOCYTIC INFLAMMATION AND TNF α . Voyich JM, Fultz JE, Burgess DE. Veterinary Molecular Biology, Montana State University, Bozeman, MT.

The sexually transmitted trichomonads, *Tritrichomonas foetus* (cattle) and *Trichomonas vaginalis* (humans) can adversely affect pregnancy. The mechanism of pathogenesis leading to this outcome is not known. However, the presence of inflammatory cytokines such as IFN γ and TNF α is known to lead to pre-term delivery and, in some cases, abortion. We have previously shown that PBMC from animals immunized with purified and whole extract antigens of *T. foetus* respond to *in vitro* parasite challenge by production of IFN γ . In the current study the influx of macrophages into the reproductive tract in mice was shown by immunohistochemistry and flow cytometry analysis after intravaginal exposure to trichomonads. These results are similar to the pattern of monocyte infiltration reported previously during *T. foetus* infections and reveal a potential mechanism of pathogenesis by which *T. vaginalis* may contribute to difficulties in pregnancy. To investigate the potential of parasites to directly activate macrophages we studied the effect of parasites on the ability of the murine macrophage line J774A.1 to produce TNF α . We show by real time PCR evidence of direct induction of TNF α message by macrophages upon exposure to live and UV irradiated *T. vaginalis* and *T. foetus*. Increases in TNF α message ranged from 4-12 fold in macrophages exposed to *T. vaginalis*, and 2-8 fold upon exposure to *T. foetus*. In addition, functional TNF protein was detected in the supernatants from *T. vaginalis* and *T. foetus* parasite stimulated macrophages by WEHI 164. Collectively, the ability of trichomonads to cause macrophage influx (mouse models) and TNF α production suggests the presence of a mechanism of pathogenesis that is known to be detrimental to pregnancy outcome. Currently, we are analyzing supernatants for presence of TNF α and TNF β and investigating the activation state of recruited macrophages within the murine reproductive tract.

- 207 200 GY STERILIZED TOXOPLASMA GONDII TACHYZOITES MAINTAIN METABOLIC FUNCTIONS AND MAMMALIAN CELL INVASION, ELICITING CELLULAR IMMUNITY SIMILAR TO NATURAL INFECTION IN MICE. Hiramoto RM, Galisteo Jr. AJ, Andrade Jr. HF. Radiobiology Division, IPEN/CNEN, S. Paulo, Brazil; Protozoology Lab, Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo, USP, S. Paulo, Brazil; Protozoology Lab, Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo, USP, S. Paulo, Brazil.

Caused by *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis is a highly prevalent worldwide usually benign disease, but it could be disabling or severe, both by affecting the eye, or CNS and other organs in patients with immune system immaturity, as the fetus, or compromise, as in cancer chemotherapy or AIDS patients. Several attempts were made for vaccine development, but until now, only one commercial veterinary vaccine, with partial protection, is used in New Zealand. Here, we study the effects of ionizing radiation on the parasite, for blocking its reproductive ability but maintaining most of their cellular functions, to be used as a candidate vaccine. The reproduction of *T. gondii* tachyzoites, RH strain on LLC-MK2 cells and mice, was completely blocked by 200 Gy ^{60}Co irradiation, without ultra structural alterations as shown by electron microscopy. The irradiated parasites maintains the same respiratory response and also protein and nucleic acid synthesis, as detected by MTT oxidative conversion, ^3H -proline and ^3H -hypoxanthine incorporation in short term cultures. Cell invasion was maintained in cell cultures, but without reproduction with subsequent degeneration. By antibody detection through ELISA and Western blotting, the humoral response of mice to irradiated parasites was similar to drug treated infected mice but higher than in mice immunized with tachyzoites killed by

formaldehyde. Spleen cell immune responses were also similar to natural infection, as tested by cytokines production (IL-10, IL-12, IFN- γ and TNF- α and lymphoproliferative response to *T. gondii* antigens. Mice immunized with irradiated tachyzoites show longer survival time after tachyzoite challenge or hardly any cerebral disease after cyst challenge. Irradiated tachyzoites maintain most of their metabolic function, without reproductive capacity, providing a new approach for experimental toxoplasmosis and vaccine development.

- 208 DIFFERENTIATION BETWEEN VIABLE AND DEAD *ENCEPHALITOZOON CUNICULI* ORGANISMS WITHIN RAW264.7 MACROPHAGES. Stovall ME, Green LC, Didier ES. Tulane Regional Primate Research Center, Covington, LA; Xavier University of Louisiana, New Orleans, LA.

Microsporidia are single-celled obligately intracellular parasites which cause opportunistic and emerging infections in a wide range of hosts. One species which infects humans and mammals, *Encephalitozoon cuniculi*, replicates within resident or resting macrophages but is killed in activated macrophages. The purpose of this study was to determine if a staining method that was developed previously to discern between live and dead extracellular microsporidian spores also could be used to detect live and dead intracellular microsporidia. Toward this aim, cultures of the murine macrophage cell line, RAW264.7, were inoculated with *E. cuniculi* in the absence or presence of a macrophage activating agent, phorbol myristic acid (100 ng/ml). At various time points, the cultures were stained with Sytox Green and Calcofluor White M2R. When viewed under fluorescence microscopy at an excitation wavelength of 395-415 nm, the macrophage cytoplasm stained orange and the microsporidian spores stained as turquoise ovals. When viewed at a wavelength of 470-490 nm, the viable microsporidia excluded the Sytox Green while dead spores stained yellow. The validity of this method for staining intracellular microsporidia was corroborated such that after 24 hours in culture, statistically significantly greater numbers of dead microsporidia were observed in the activated macrophages versus non-activated macrophages (means of 4.5 ± 1.23 vs 1.1 ± 0.99 per macrophage, respectively; $P < 0.001$) while the mean number of live spores per macrophage in both groups did not differ significantly. After 48 and 72 hours in culture, however, significantly fewer viable spores were detected per activated macrophage than non-activated macrophage. The results of this study indicate that dual staining with Sytox Green and Calcofluor White M2R will be useful for tracking the survival of intracellular microsporidia in immunotherapeutic and chemotherapeutic studies.

- 209 PURIFICATION OF *ENTEROCYTOZOON BIENEUSI* SPORES FROM STOOL BY PERCOLL GRADIENT AND FILTRATION. Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES. Department of Biology, Xavier University of Louisiana, New Orleans, LA; Department of Microbiology, Tulane Regional Primate Research Center, Covington, LA.

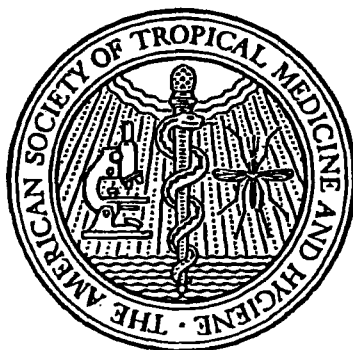
Microsporidia are obligate intracellular parasites now recognized to be opportunistic pathogens in immunosuppressed individuals such as AIDS and organ transplant patients. Recently, they have also been recognized as a cause of diarrhea in malnourished children and travelers. *Enterocytozoon bienersi* is the most commonly reported microsporidian to infect humans. Long-term cultivation of *E. bienersi* has not been possible, making it difficult to obtain enough spores for most experimental protocols. The purpose of this study was to develop a method of purifying large numbers of *E. bienersi* spores relatively free of contaminating debris and other organisms. Clean preparations of *Enterocytozoon bienersi* spores were obtained from stool by the combined use of 80 and 90% SIP Percoll gradients. The material obtained from these gradients was further purified by passage through 10 μ m and 5 μ m filters. Microscopic examination of the final product demonstrated only small amounts of debris and a few yeast cells. This preparation was used to immunize rabbits and the resulting antiserum was shown to react by immunofluorescent antibody to *E. bienersi* without significant cross reactivity to other fecal debris. This protocol provides a means of obtaining large numbers of clean spores without cultivation.

- 210 EFFECTS OF ALBENDAZOLE ON *ENCEPHALITOZOON* MICROSPORIDIA. Leitch CJ, Scanlon M, Visvesvara GS, Shaw AP. Department of Physiology, Morehouse School of Medicine, Atlanta, GA; Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA.

**PROGRAM AND ABSTRACTS OF THE 48TH ANNUAL MEETING
OF THE AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**

**Washington Hilton Towers
Washington, D.C.
November 28–December 2, 1999**

**Supplement to
THE AMERICAN JOURNAL OF
TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE**



**PLEASE BRING THIS COPY TO THE MEETING
ADDITIONAL COPIES WILL BE \$10.00**

the host-parasite interface, i.e. the feeder organelle. We have localized a ~200 kD integral membrane protein, CpABC-1, from *C. parvum*, to the host-parasite boundary, possibly the feeder organelle. We have cloned and characterized the CpABC-1 gene. The predicted amino acid sequence of CpABC-1 has significant structural similarity with the cystic fibrosis conductance regulator (CFTR) and the multidrug resistance protein (MRP) subfamily of ATP-binding cassette (ABC) proteins. We have identified a second ABC protein gene, CpABC-2, in *C. parvum*. CpABC-2 is a single copy gene located on chromosome 2. The CpABC-2 gene identified a 5.3 kb mRNA in sporozoites. Preliminary sequence analysis identified CpABC-2 as a member of the MRP subfamily of ABC proteins. ATP-binding cassette proteins are associated with xenobiotic resistance phenotypes in many taxa.

- 74 ANTIBODY AND INTRAEPITHELIAL LYMPHOCYTE RESPONSES DURING *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* INFECTIONS IN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT ATHYMIC NUDE MICE. Adjei AA, Curran BC, Castro M, Shrestha AK, Delsid LD, Velez M, Fritz H, and Enriquez FJ. Department of Veterinary Science and Microbiology, The University of Arizona, Tucson, AZ.

Differences in susceptibility to *Cryptosporidium parvum* infection between two strains of adult athymic nude mice prompted us to investigate the immune mechanism(s) that may control resistance to infection in these T-cell deficient mice. We studied fecal oocyst shedding, serum and fecal parasite-specific antibody responses, fecal immunoglobulin levels, and phenotypes of small intestinal Intraepithelial lymphocytes (IEL) in athymic C57BL/6J and BALB/cJ nude mice following oral inoculation with IC. parvum oocysts. Inoculated C57BL/6J nude mice shed significantly fewer IC. parvum oocysts than inoculated BALB/cJ nude mice from day 52 to day 63 post inoculation ($P < 0.05$). Inoculated C57BL/6J nude mice had significantly higher fecal parasite-specific IgA and IgM levels than inoculated BALB/cJ nude mice ($P < 0.05$) and significantly higher serum parasite-specific IgA levels at 63 days post inoculation ($P < 0.03$). In contrast, inoculated BALB/cJ nude mice had higher fecal levels of non parasite-specific IgA and IgM than inoculated C57BL/6J nude mice ($P < 0.05$). Analysis of IEL surface markers revealed that inoculated C57BL/6J mice had a higher percentage of +, CD4+, and both CD8+ + IEL than inoculated BALB/cJ nude mice. Conversely, inoculated C57BL/6J nude mice had a lower percentage of + IEL than inoculated BALB/cJ nude mice ($P < 0.05$). We conclude that parasite-specific fecal IgA and IgM antibodies, +, CD4+, and/or CD8+ + IEL may be associated with resistance to *C. parvum* in C57BL/6J nude mice; and that thymus-independent regulatory and effector responses in the intestine may be a mechanism by which athymic nude mice resolve *C. parvum* infection.

- 75 MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF *CYCLOSPORA* AND *CRYPTOSPORIDIUM* INFECTIONS AMONG US MILITARY PERSONNEL IN INDONESIA. Higgins JA, Kerby S, Trout J, Fayer R, Xiao L, and Fryauff D. USDA-ARS, Beltsville, MD; GeoCenters/Special Pathogens Branch, USAMRIID, Ft Detrick; MD, CDC, Atlanta, GA; and NAMRU-2, Jakarta, Indonesia.

Upon posting to Indonesia, US military personnel can acquire acute or chronic diarrheal disease, in which *Cyclospora* and *Cryptosporidium* oocysts are observed in the feces. We isolated oocysts from fecal specimens, obtained from these non-indigenous patients during their visits to clinics in Jakarta, and extracted DNA for use in PCR assays. Using the Relman et al. 18S rRNA nested PCR, we amplified nested product (294 bp) from 3 of 6 specimens. Sequencing of these products indicated >99% homologies with the published sequence of *C. cayetanensis*. More recently, we have had some success in amplifying a larger (1 kb) 18S rRNA fragment from another fecal specimen by modifying the PCR parameters. The results of ongoing efforts to characterize these isolates at the molecular level will be presented. Some *Cyclospora* patients had additional oocyst-like objects present in their feces, with light microscopy morphology similar to *Cryptosporidium*. We will present data on our attempts to characterize these *Cryptosporidium* isolates as well. Our observations to date indicate that diarrheal disease among US military personnel in Indonesia may be due to co-infections with these two protozoal species, with obvious implications for diagnostic and therapeutic approaches.

- 76 EFFECTS OF ^{60}CO IONIZING RADIATION ON *TOXOPLASMA GONDII* TACHYZOITES. Hiramoto RM, Galisteo Jr AJ, Ferreira MA, and Andrade Jr HF. Lab. Protozoologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, São Paulo, Brazil; Instituto de Pesquisas Energética e

Nucleares, São Paulo, Brazil; Dept. Patologia, Fac. Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Toxoplasmosis is a protozoan disease which present acute infection with subsequent long lasting non-sterilizing immunity, with remaining tissue cysts. This immunity are capable to control new infections, providing the hope of the development of a vaccine, with parasite fractions or non reproductive organisms. Ionizing radiation are specially efficient in the induction of genetic damage that could abolish completely the reproduction of agents, but without affecting its immediate viability and physiology. Its use in *Schistosoma* experimental immunization schedules suggested that could be a useful tool for the development of vaccines for complex organisms. The effects of ^{60}Co γ -rays on the morphology, metabolism, infectivity, and antigenicity of *Toxoplasma gondii* was studied. The growth of tachyzoites on LLC-MK2 cells was completely blocked by 200 Gy ^{60}Co irradiation. We analyzed the metabolism of irradiated tachyzoites by MTT oxidative conversion, ^3H -proline protein incorporation and ^3H -Hypoxanthine nucleic acid synthesis in short term cultures. Infectivity was tested in cell cultures with Giemsa and Immunohistochemistry. Antigenicity was tested by serially antibody detection by ELISA and Western blotting, comparing with drug treated infected mice or in mice immunized with formolized parasites. *T. gondii* maintained its morphology after irradiation, as shown by electron microscopy. The irradiated parasites presented the same respiratory response, protein synthesis and nucleic acid incorporation as non irradiated parasites in short term cultures. Cell invasion was similar in irradiated and controls tachyzoites, but no reproduction and degeneration occurs in irradiated parasites. Mice immunized with irradiated tachyzoites show longer survival time after tachyzoite challenge and less cerebral disease after cyst challenge. Irradiated *T. gondii* tachyzoites maintain most of their metabolic function, without reproductive capacity, providing a new approach for experimental toxoplasmosis and vaccine development.

77. AMINOPEPTIDASES OF MICROSPORIDIA. Millership JJ, Chappell CL, Okhuysen PC, and Snowden KF. Department of Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX; and University of Texas - Houston Health Science Center, School of Public Health and Medical School, Houston, TX.

Microsporidia are eukaryotic, obligate intracellular parasites that infect a wide range of hosts. They are found with increasing frequency as opportunistic infections in immunocompromised individuals. *Encephalitozoon intestinalis* is among the most frequently diagnosed causes of diarrhea in immunocompromised humans (particularly AIDS patients). Presently, no broadly effective labeled drug treatment exists for all microsporidial species that infect humans. Aminopeptidases are proteinase enzymes that sequentially hydrolyze N-terminal amino acids of oligopeptides. Many, but not all, of these enzymes are zinc metalloenzymes. Parasite aminopeptidases have been implicated in host cell invasion, immune evasion and host protein digestion. This study investigates the aminopeptidase activity of 4 human isolates of microsporidia, *Enc. intestinalis*, *Enc. cuniculi*, *Enc. hellem* and *Vittaforma corneae*. Aminopeptidase activity was assessed using a fluorometric assay that cleaves amino acid groups bound to a fluorescent substrate (7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC)). In total, 6 amino acid groups (Met, Leu, Ala, Phe, Arg and Gly) were utilized and the activity measured for each species of microsporidia. Amino acid cleavage varied among species and the enzyme activity observed for each amino acid also varied among species. No endopeptidase activity was measured using an N-terminal blocked substrate (Z-Met-AFC), for all 4 microsporidial species. The substrate cleaved most readily for each species of microsporidia was utilized in the characterization of aminopeptidase activity. The characterization of each enzyme included thermal stability, optimal pH, selected inhibitor profiles and partial purification. The purpose of this research was to identify potential targets for immunotherapeutic or chemotherapeutic agents against microsporidia.

78. JACOBUS PS-15, A DIHYDROFOLATE REDUCTASE INHIBITOR, CURED PNEUMOCYSTIS CARINII PNEUMONIA IN MICE. Bartlett MS, Shaw MM, Durant PJ, Smith JW, and Jacobus DP. Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN; and Jacobus Pharmaceutical Co., Inc., Princeton, NJ.

the assumption that lineage III represents a "recent" recombinant of lineages I and II. These results suggest that while sexual reproduction occurs rarely, it is sufficient to uncouple genes from each other and thus cannot be neglected. Additionally, a new cougar isolate possessed multiple unique polymorphisms. Consequently, the genetic distance between this isolate and the nearest lineage was larger than that between, at least, one pair of the lineages, suggesting that it represents an additional lineage. A final analysis of these patterns will be presented.

- 827 **SURVIVAL AND INFECTIVITY OF CYSTS OF THE ME-49 TOXOPLASMA GONDII STRAIN IN ARTIFICIALLY INFECTED BOVINE MILK AND HOME MADE CHEESE.** Mayrbaur-Borges M, Hiramoto RM, Galisteo Jr AJ, Meireles LR, Cardoso RPA, Macre MS, and Andrade Jr HF. Lab. Protozoology, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, Brazil.

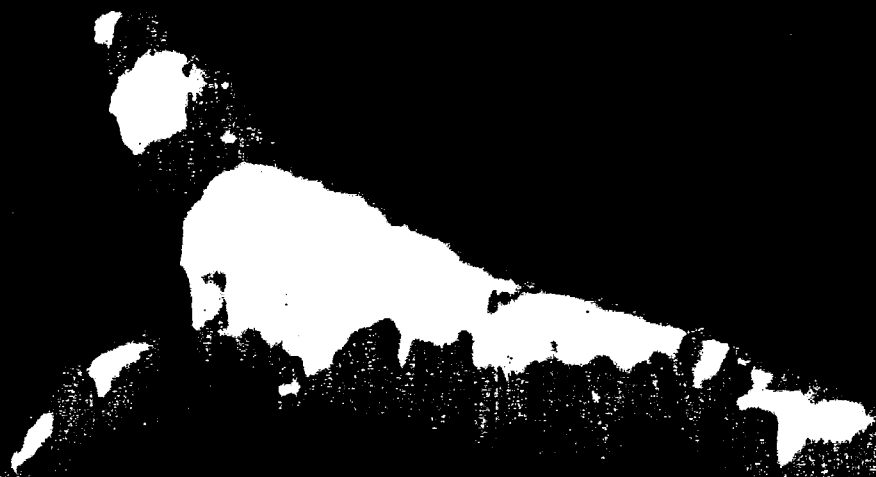
Toxoplasma gondii is transmitted by ingestion of oocysts, in raw vegetables or water; and cysts, in undercooked products from animal origin, like meat and milk. Bovine milk was found to be contaminated with *T. gondii* due to bad hygiene and oocyst contamination, but the secretion in mammary gland could also results in cyst secretion in milk which could resist to the cheese production process, usually performed in small farms of isolated rural areas. We study the survival and infectivity of cysts of ME-49 strain of *T. gondii*, in bovine milk and home-made cheese. Milk was contaminated with cysts and stored at 4°C up to 20 days, both as milk or home made cheese, and used to orally infect groups of C57Bl/6j mice (12 cysts/mouse). Contaminated milk induced a high mortality, 8/8 at 0 storage day and 4/8 at 5 and 10 days of storage at 4° C, when compared to PBS stored cysts in the same periods (6/8 day 0, 0/8 at day 10). Infectivity, detected by serology and histology, was maintained also at 20 days of storage in milk (4/4), but PBS stored cysts showed a progressive loss at higher times (3/4 at 10 days and 2/4 at 20 days). The cysts in cheese induces mortality in occasional mice in early times (1/8 at 0 and 1/8 at 5 days), but maintains infectivity immediately after cheese preparation (9/11), after 5 days (8/8) and 10 (4/4) days of storage, only abolished after 20 days of storage (0/4). Those data showed that *T. gondii* cysts survival was improved in milk, probably due better gastric survival of bradyzoites, and only minimally affected by home made cheese production. The refrigerator storage of those products maintains their infectivity by 20 days in milk and 10 days in home made cheese, suggesting that the contamination of milk and cheese with *T. gondii* must be studied as a possible source of human infection.

- 828 **EVALUATION OF NOVEL MONOCLONAL ANTIBODIES FOR USE IN TOXOPLASMA GONDII ANTIGEN CAPTURE ASSAY.** Grushka D, Serhir B, Carey K, Ward GE, MacLean JD, and Ward BJ. National Center of Parasite Serology, McGill University, Montreal, QC, Canada; Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Vermont, Burlington, VT; and McGill Tropical Diseases Center, Montreal, QC, Canada.

Toxoplasma gondii is one of the most common parasitic infections of man. Although several commercial tests exist for toxoplasma serodiagnosis, the unambiguous diagnosis of many clinically important toxoplasma infections remains problematic. This is particularly true in establishing the timing of infection in pregnant women and demonstrating reactivation of disease in immunocompromised hosts. The systemic nature of toxoplasmosis raises the possibility that the detection of circulating tachyzoite antigens may be of use in these situations. To date, experience with antigen detection techniques in human toxoplasma infections is limited. We have developed a series of antigen capture EIAs using a panel of novel monoclonal antibodies (MAB) directed against a range of tachyzoite antigens (45.15, 17.9, A3.2, C8.4, B3-90). After optimization using a pool of these MABs to capture and negative serum spiked with whole tachyzoite lysate antigen; we were able to detect circulating antigen in 12/19 (63%) patients with symptomatic toxoplasmosis. Using single MABs to capture, we observed that most of the reactivity in the pool was accounted for by clone 45.15 (70 kDa inner membrane complex protein) with lesser contributions from clones 17.9 (31 kDa antigen from dense granules) and C8.4 (57 kDa surface/external antigen). Although early reports suggest that toxoplasma antigen levels in serum are transient, the magnitude and kinetics of antigenemia with the specific toxoplasma products recognized by our panel of MABs remain to be determined. Our assays will be further refined and applied to defined toxoplasma sera from otherwise healthy and immunocompromised subjects to determine the clinical utility of detecting the targeted toxoplasma antigens.

XXVIII ANNUAL MEETING ON BASIC
RESEARCH IN CHAGAS DISEASE
&

XVII ANNUAL MEETING OF THE
BRAZILIAN SOCIETY OF
PROTOZOOLGY



Hotel Glória
Caxambu, MG

November

5-7, 2001

**XXVIII ANNUAL MEETING ON BASIC RESEARCH
IN CHAGAS DISEASE**

&

**XVII ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN
SOCIETY OF PROTOZOOLOGY**

Hotel Glória, Caxambu, MG, Brasil

November 5-7, 2001

Organizing Committee

**Ricardo Tostes Gazzinelli
Santuza Ribeiro Teixeira**

Brazilian Society of Protozoology

**President: Paulo Filemon Paolucci Pimenta
Vice-President: Wanderley de Souza
Secretary: Ricardo Tostes Gazzinelli
Treasurer: Leda Quercia Vieira**

the locality of Tomina, Chuquisaca department, Bolivia. Children (n=177; 3 to 11 years old) were screened for antibodies directed against TESA using TESA blot and ELISA; and antibodies against H49 and B13 antigens using the corresponding recombinant peptides in ELISA. Analysis was also performed by two conventional serologic tests (ELISA; indirect hemagglutination) using the extract of epimastigotes as antigens. We found that 36.16% of serum samples (64 over 177) did not react with TESA or the recombinant antigens H49 and B13. Three false-positive results were obtained with the conventional serologic tests, confirming the high specificity of TESA and the recombinant antigens in the serological diagnosis of Chagas disease. Sixty-four percent of serum samples (113 over 177) gave positive results with TESA assays or with conventional serologic tests. It is noteworthy that an acute case was only detected by TESA blot and ELISA due to the presence of SAPA (Shed Acute Phase Antigen) in these assays. Antibodies to the recombinant antigens H49 and B13 were detected in 86-88%. These results indicate that the population under study includes children in different stages of the *T. cruzi* infection. The sensitivity and specificity of TESA were higher than those displayed by the conventional serologic tests and the recombinant antigens H49 and B13. This study will be extended to other individuals living in this high endemic rural region for Chagas disease.

This research is sponsored by: FAPESP, CNPq, CAPES, CYTED (Spain)

IM43 - CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION BY PBMC IN HUMAN CHAGASIC CARDIOMYOPATHY ACTIVITY

Talvani AJ, Rocha MOC2, Klein A3, Gomes I, Falcão PL1, Teixeira MM1

1- Departamento de Bioquímica Imunologia, ICB/UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-010, Belo Horizonte, MG; 2- Pós-graduação Medicina Tropical, UFMG; 3- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brasil

Human Chagas disease is an insidious infection caused by *Trypanosoma cruzi* whose main target of destruction is the heart. The pathophysiological events determining the evolution into the more severe forms of chronic chagasic cardiomyopathy (CCC) are not known and not good markers of prognosis exist. Chemokine receptors (CKR) may be used as immunological markers of Th1/Th2 polarization. Here, we evaluated 45 individuals with indeterminate form/mild CCC (minor changes on the EKG) or severe CCC (presence of heart failure or left anterior bundle branch hemi-block with complete right bundle branch block). The expression of CKRs (CXCR4, CCR1, CCR2 and CCR5) and intracellular cytokines (INF-g and IL-10) by monocytes (CD14) and lymphocytes (CD4 and CD8) ex vivo or after culture with antigen were evaluated by flow cytometry. CCR5, a ligand to RANTES, was detected ex vivo in high levels on CD8 T cells from mild CCC, but not in severe CCC. After 24 h-culture with trypomastigote antigen, CD14 cells from patients with mild CCC expressed higher levels of CCR1, IL-10 and INF-g than those with severe CCC. In conclusion, our results show that the expression of CCR5 by CD8 lymphocytes ex vivo mark a subset of patients with the milder forms of Chagas heart disease.

This research is sponsored by: CAPES, WHO (970728, A0009)

IM44 - PRELIMINARY RESULTS IN COMMITTED CYTOKINE PRODUCTION BY SPLEEN CELLS (IFN-, IL-10 AND IL-12) DURING RODENT PLASMODIUM CHABAUDI MALARIA

Vieira DP, Hiramoto RM, Garnica MR, Galisteo Jr AJ, Andrade Jr HF

Laboratório de Protozoologia, IMTSP, Av. Dr. Edéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000, São Paulo, SP, Brasil

Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, with high prevalence, morbidity and mortality in tropical countries. The disease is caused by intraerythrocytic growth of the parasite, with clearance of parasitized red blood cells in the filtration network in the spleen, an environment that allows the killing of the parasite inside the red-blood cells, by free radical delivery as oxygen or NO-mediated responses. The response of the spleen after the first malaria attack is greatly enhanced, an state called premunition, that must involve stable cell commitments. Cytokines influence the response of cells, regulating the immune response (specific and unspecific), resulting in optimal protection. We sequentially study the production of the cytokines IFN-g, IL-10 and IL-12 and their mRNAs, including INF-a, by suspensions of spleen cells from C57BL/6j mice at the 4th, 6th, 8th, 10th, 12th, 14th and 16th days of *Plasmodium chabaudi* AS infection. Supernatants of 48hs cultures of cell suspensions (2 x 10⁷ cells/well/ 96 well microplate/ 37°C/5% CO₂) were collected by centrifugation and stored at 20° C until use, with cell pellets suspended in TRIzol at -80°C until nucleic acid processing. We measured the IFN-g, IL-10 and IL-12 production by quantitative ELISA (OpTEIA Pharmigen) in cell supernatants. The whole production of IFN-g by the cells peaked at 8th day, exactly at control of parasitemia, decaying thereafter. The production of IL-10 grows after the 6th day, peaking at 10th day but IL-12 levels presented a more complex pattern, with increase in the 4th and 6th days of infection, decaying thereafter for increased upsurge at the 16th day of the infection, along to the complete parasitemia control. Similar patterns of cytokine production were observed after ConA stimulation. Late mRNA production of IFN-g, IL-10, IL-12 and TNF-a was determined by quantitative RT-PCR, using GAPDH mRNA as control. RT-PCR results show also increased production of cytokines in cells obtained from the ascending parasitemia period, decaying after parasitemia control except for IL-10, usually related to B-cell growth and antibody production. These data indicates that the malaria infection induces prolonged commitments of cell population in spleen during the parasitemia control, unrelated to cytokine production, with subsequent specific antibody production, that may not been correlated with pRBCs clearance. These preliminary data suggests that the prolonged commitments of spleen cells must be involved in malaria control, and further studies must be necessary for clarifying the participation of parasite antigens or antibodies in this process.

This research is sponsored by: FAPESP (99/04926-6) and LIMHCFMUSP-49

IM48 - CYTOKINE PRODUCTION AND PROLIFERATIVE RESPONSE IN SPLENIC CELLS OF C57BL/6J MICE IMMUNIZED WITH 255 GY IRRADIATED TACHYZOITES OF TOXOPLASMA GONDII

Hiramoto RM1, Galisteo Jr AJ2, Terentowicz HCK2, Cardoso RPA2, Andrade Jr HF2

1- S: Radiobiologia IPEN/CNEN, SP; 2- Laboratório de Protozoologia, IMTSP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000, São Paulo, SP, Brasil

Toxoplasma gondii, an intracellular obligatory protozoan, had a complex life cycle, with felines as definitive host, and warm-blooded mammalian and birds as intermediate host. Widespread among humans and generally asymptomatic, this agent could induce devastating disease in fetus, AIDS patients and recipients of organ transplants. Cell-mediated immunity that result in cytokine production is required for host resistance against infection with '*T. gondii*'. Here we study the cytokine levels and proliferative response in splenocytes from C57BL/6J mice immunized with 255 Gy irradiated tachyzoites, as 3 sequential 10⁷ i.p. or oral route, comparing with splenocytes from same mice infected with 10 cysts of Me49 strain. After 15 days of last shot or oral infection, spleen were disrupted in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and antibiotics, and 2 x 10⁵ cells/well were plated in 96 well plates and stimulated with *T. gondii* antigen or Con A. After 48 h of incubation at 37°C under 5% CO₂, cultures were pulsed for 18 h with 1 µCi of [³H] thymidine, supernatants were collected and frozen at -20°C until use and the cells were harvested and incorporation of radioactivity determined using a scintillation counter. Cytokine production (IFN-γ, IL-12 and IL-10) was measured in culture supernatant by ELISA. The uptake of thymidine by splenocytes from infected mice cultured with Con A was markedly reduced in comparison to spleen cells from uninfected control mice. Spleen cells from immunized mice (i.p. or oral) presented increased proliferation in comparison to the uptake in splenocytes from infected mice, but decreased in relation to the spleen cells from uninfected mice. '*T. gondii*' antigen-induced proliferation of spleen cells was smaller, both in cells from mice infected with Me49 strain or uninfected controls; but was increased in spleen cells from mice immunized with irradiated tachyzoites. *T. gondii* antigen-stimulated splenocytes from i.p. immunized mice produced higher levels of IFN-γ and IL-10, while spleen cells from infected or oral immunized mice showed smaller cytokine production. IL-12 were undetectable by ELISA in all culture supernatants. Suppression of proliferative response or lowering cytokine production by spleen cells of infected mice may be associated to the spread of *T. gondii* within the host, allowing the development of chronic infection. In spleen cells from i.p. immunized mice, the increased proliferation and cytokine production (IFN-γ, IL-10) of spleen cells demonstrates that irradiated tachyzoites induced a significant cellular immune response, allowing research in their use as a candidate vaccine.

This research is sponsored by: R.M.Hiramoto is a fellow of CNPq, FAPESP(99/04926-6) and LIMHCFMUSP-49

IM49 - PROTECTIVE MONOCLONAL ANTIBODY RECOGNIZE STAGE-SPECIFIC MEROZOITE ANTIGENS OF P. C. CHABAUDI AJ

Elias RM, Sardinha LR, Bastos KRB, Brumatti G, Amarante-Mendes GP, Alvarez JM, D' Império Lima MR

Department of Immunology, ICB, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1364, 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Aiming to clarify the role of the antibodies in the protection against the infection for the *Plasmodium chabaudi chabaudi* AJ, a lethal and synchronous murine malaria parasite, we have been using the MAb 1C29F9, a representative clone of the hybridomas obtained in our laboratory, capable to inhibit the erythrocytes infection in vitro. We evaluated the capacity of the MAb to recognize a parasite-purified extracts and blood samples, enriched for merozoites. Western Blot analysis of *P. c. chabaudi* AJ extracts probed with MAb revealed a band of 250 kDa antigen, however, it was not revealed by *P. c. chabaudi* AS extracts. FACS analysis of blood samples showed the capacity of the MAb to recognize antigens in the *P. c. chabaudi* AJ infected erythrocytes, but not in the *P. c. chabaudi* AS infected erythrocytes. The mean of parasitemia monitored in BALB/c mice inoculated with MAb before *P. c. chabaudi* AJ infection did not exceed 60%, however, all untreated mice developed fulminant infection and died. Therefore, MAb induced protection in the *P. c. chabaudi* AJ infected mice, and this protection seems to be specific, since this MAb did not recognize antigens from *P. c. chabaudi* AS in Western Blot and FACS analysis.

This research is sponsored by: FAPESP

IM50 - ARE ADHESION MOLECULES PLAYING A ROLE IN THE ENTRANCE OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS INTO THE MYOCARDIUM DURING TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION?

Marino APMP1, Azevedo MIP1, Teixeira MM2, Lannes-Vieira J1

1- Laboratory of Autoimmunity and Immunoregulation, Department of Immunology, IOC, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ; 2- Department of Biochemistry and Immunology, ICB, UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-010, Belo Horizonte, MG, Brasil

During an infection, change in the pattern of lymphocyte migration represents a key event in the evolution of an immune response since it enables lymphocytes to gain access to infected and/or inflamed tissues. Recently, using C3H/He mice infected with the Colombiana strain of *T. cruzi*, we found that the distribution of CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁺/CD8⁺ T cells in the myocardium mirrors the frequency of cells expressing the CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype among CD4⁺/CD8⁻ and CD4⁺/CD8⁺ peripheral blood T cells. Consistently, vascular cell adhesion molecules 1 (VCAM-1)-positive endothelial cells and VLA-4⁺ mononuclear cells were found in the inflamed myocardium. Moreover, our results suggest that the preferential recruitment of CD8⁺ T cells into the heart tissue is driven by IFN-γ and INF-γ-induced chemokines as RANTES (Santos et al., Microbes and Infection, 2001). Thus, we hypothesized that VLA-

4/VCAM-1-mediated interactions participate in the early preferential adhesion/migration of CD8+ T cells into the infected cardiac tissue leading to the establishment of the T. cruzi-elicited myocarditis. To approach this question, we studied the early events involved in the entrance of inflammatory cells into the heart tissue. Here we show that in early acute phase (14 days post-infection - dpi) a few CD4+ and CD8+ T cells are found in the cardiac tissue, whereas a predominance of Mac-1+ is observed. Further, rare VLA-4+ cells are detected in this tissue. At 28 dpi a prevalence of CD8+ T cells is already observed and the majority of the inflammatory cells are VLA-4+. Interestingly, at 14 dpi most of the cardiac blood vessels are VCAM-1Dull/Neg, whereas at 28 dpi the majority of blood vessels express high density of VCAM-1. The cytofluorimetric analysis of adhesion molecules on peripheral blood mononuclear cells showed that at 14 dpi significant increase in the expression of VLA-4 is observed on CD4 (from 19% in normal to 24-27% in the infected mice) and CD8 (from 44% in normal to 56-76% in infected mice) T cells. Further, at 28 dpi 80-81% of the CD8+ T cells express VLA-4High, whereas 38-45% of the CD4+ T cells present this activated phenotype. Altogether, our results strongly suggest that besides contributing to the maintenance of the preferential migration of CD8+ T cells during the chronic infection, VLA-4/VCAM-1 interactions are playing a role in the early preferential entrance of activated T cells contributing to the establishment of the CD8-mediated myocarditis.

This research is sponsored by: CAPES, CNPq, IOC-FIOCRUZ, PAPES-FIOCRUZ

IMS1 - IMMUNOLOGICAL PROFILE AND INTERSTITIAL FIBROSIS IN THE SYRIAN HAMSTER MODEL OF CHRONIC CHAGAS DISEASE CARDIOMYOPATHY

Bilate AMB1, Salemi V1, Ramires F1, Brito T2, Mady C1, Kalil J1, Cunha-Neto E1

1- Heart Institute (InCor); 2- Institute of Tropical Medicine, University of São Paulo Medical School, São Paulo, SP, Brasil

T. cruzi infected Syrian hamsters develop a chronic cardiomyopathy resembling human disease. Association of crossreactive cardiac myosin-B13 T and B cell responses among Chagas cardiopathy patients has been reported. We characterized the immunological profile, interstitial/perivascular fibrosis and heart function after 12 mo post-infection (PI). Hearts from animals infected with 100,000 (G3) and 35,000 (G2) Y strain T. cruzi parasites displayed a 4-fold and 2-fold increase in interstitial fibrosis compared to controls (G1), while perivascular fibrosis remained similar. Animals who developed ventricular dysfunction (VD) before 8 mo PI, displayed elevated interstitial fibrosis, ventricular dilation and died before 12 mo PI, while those with late VD showed lower fibrosis and survived. Anti-B13 protein IgG antibodies showed a positive correlation with interstitial fibrosis in G2/G3. Pooled sera from all groups recognized heavy and light chains of cardiac myosin by Western blot analysis, but each group recognized distinct secondary bands. Splenic cells from infected animals failed to proliferate to Con A, B13 protein and cardiac myosin. The correlation between anti-B13 antibodies and fibrosis, that was associated to early, severe cardiomyopathy and death, suggests a link between recognition of antigenic targets and disease progression.

This research is sponsored by: FAPESP, CNPq and HHMI

IMS2 - IRRADIATED L(L) AMAZONENSIS PROMASTIGOTES INDUCED IN VITRO ANTIBODY PRODUCTION AND LYMPHOPROLIFERATIVE RESPONSES TO LEISHMANIA ANTIGEN HIGHER THAN NATURAL INFECTION

Bonetti FC1, Hiramoto RM1, Paiva BR2, Andrade Jr. HF2, Nascimento N1

1- Protein Chemistry Laboratory - LBM-IPEN/CNEN, São Paulo, SP; 2- Protozoology Laboratory, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brasil

Leishmania, a pathogenic protozoan, cause different diseases in men, transmitted by sand fly vectors. The human diseases, in America caused by this group of protozoa are divided in coetaneous or tegumentar and visceral, known as kala-azar. In this work, our principal study object was the Leishmania (L) amazonensis, that cause cutaneous leishmaniasis in Brazil. Antibody production and proliferative response in the spleen cells of BALB/c mice immunized with 1500 Gy irradiated promastigotes, as 3 sequential 107 subcutaneous route, were compared with spleen cells from mice experimentally infected with L.L. amazonensis mice in the footpad, using uninfected mice of the same background as controls. Spleen was removed and disrupted in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS and antibiotics. The 96 well plates were previously adsorbed with Leishmania antigens (10ug/ml), sterilized with radiation and used for in vitro antibody production assays, with 2 x 10⁶ cell/well plated. After 48 h of incubation at 37°C under 5% CO₂, cultures were pulsed for 18 h with 1 mCi of [³H] thymidine (1 mCi/ml), for lymphoproliferation assays. The cell suspension was transferred to another plate, harvested automatically and filter bound DNA radioactivity determined using a scintillation counter. In the former plate, the antibody produced was detected by adding anti mouse IgG conjugated with peroxidase, and the bound antibodies revealed with peroxidase substrates. The detected optical density was used as an index of antibody production by spleen cells. Morphologic studies by electronic microscopy were realized after ionizing radiation. The splenocytes of immunized mice with Leishmania amazonensis irradiated with 1500 Gy produced higher levels of antibodies without cutaneous lesions, while the spleen cells of the mice infected with naive L. (L.) amazonensis generated lower antibody production and lymphoproliferative response. A third group of mice immunized with promastigotes irradiated at lower doses (800 Gy) resulted in infection with good antibody response despite clinical infection, which was also PCR proven. Mice immunized with three 1500 Gy promastigotes presented absence of skin lesions after challenge with viable promastigotes, but complete sterilization trials are in progress. Our data shown the feasibility of in vitro antibody production assays in experimental leishmaniasis, an useful tool in the study of vaccines candidates, as irradiated promastigotes.

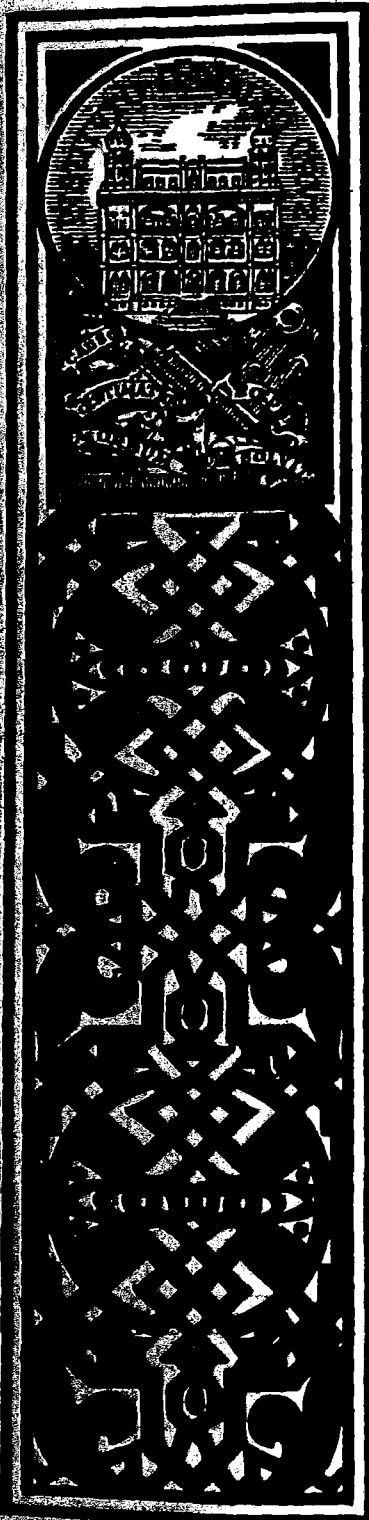
This research is sponsored by: FC Bonetti is a fellow of CNPq, FAPESP (99/04926-6) and LIMHCFMUSP- 49

IMS3 - PRODUCTION IN VIVO AND CHARACTERIZATION OF POLICLONAL ANTIBODIES AGAINST CARDIAC

Vol. 95, Suppl. II 2000

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research



MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Proceedings

XXVII Anual Meeting on Basic Research in Chagas Disease
XVI Anual Meeting of Brazilian Society of Protozoology
Hotel Glória, Caxambu, MG Brasil

6-8 November 2000

Meeting Coordinators

Alvaro José Romanha
Rodrigo Corrêa-Oliveira
Paulo Filemon Paolucci Pimenta

Special Issue
Suppl. II Vol. 95
November 2000

asymptomatic patients. Our results showed an association between absence of clinical malaria and high antibody levels to PfPRSP-19, thus suggesting an "anti-disease" immunity in the populations exposed to low levels of malaria transmission in the Amazon endemic region for many years.

Supported by CNPq/FAPEMIG

IMPAIRED PROLIFERATIVE RESPONSE IN SPLENIC CELLS OF THE C57BL/6J MICE INOCULATED WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF THE *TOXOPLASMA GONDII*

Hiramoto R.M., Galisteo Jr A.J., Cardoso RPA, Andrade Jr HF
 1- S. Radiobiologia IPEN/CNEN SP & 2- Lab. Protozoologia, IMTSP
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 05403-000, São Paulo, SP, Brasil.
 E-mail: hiramoto@ig.com.br, hfandrad@usp.br

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular protozoan can infect birds and mammals. In the man the toxoplasmosis is usually asymptomatic, causing serious disease mainly in immune-compromised individuals (AIDS, transplant recipients and cancer patients) and fetus, leading frequently to death or causing severe and irreversible lesions in the central nervous system. Vaccination was attempted with live or attenuated or irradiated or killed parasites, and also with crude extracts and different antigenic fractions, showing conflicting results. Immunization, with irradiated tachyzoites, induce specific antibody production and partial protection in mice challenged with virulent ME49 strain but without studies on the proliferative of splenic and intestinal lymphoid cells. In this work, we immunized groups of C57BL/6J mice with three sequential i.p. injection of 10^7 255 Gy RH strain irradiated tachyzoites. After 60 days, mice were sacrificed and the spleen was removed and dissociated. The spleen cells were seeded at a cell density of 2×10^5 cells per well of 96-well flat-bottom tissue culture plates. Cells were stimulated with *T. gondii* antigen (5 or 10 μ g/ml) or Con A (5 μ g/ml). After 48 hours of incubation at 37°C under 5% CO₂, cultures were pulsed for 18 h with 1 μ Ci of [³H] thymidine ([³H]TdR), and the cells were harvested. Incorporation of [³H]TdR was determined with scintillation counter (Wallac 1209 Rackbeta). Stimulation with Con A of spleen cells from normal and immunized with irradiated tachyzoites C57BL/6J mice was low. There was a significant increase in the incorporation of [³H]TdR for the spleen cells of immunized mice with irradiated tachyzoites as compared to the spleen cells of normal mice, when antigen of *T. gondii* was used as stimulant. This data showed that irradiated tachyzoites induced a significant cellular immune response in spleen, a desired effect as cellular immune response are the main processes in infected cell destruction in the host. Further studies in lymphoid cells response from the gut are in progress, as this is the site of invasion of the host in *Toxoplasma* usual transmission.

R.M. Hiramoto is a fellow of CNPq. A.J. Galisteo Jr is a fellow of FAPESP (98/1681-0).

Supported by FAPESP (99/04926-6) and LIMHCFMUSP-49

IMPAIRED CYCLOOXYGENASE PRODUCTS ARE NOT INVOLVED IN THE DOWN MODULATION OF NITRIC OXIDE PRODUCTION OF MACROPHAGES AFTER *TOXOPLASMA GONDII* INFECTION

Guilherme LVC, Seabra SH,² Keller DG,¹ De Souza W,² Da Matta RA¹
 1- UENF/CBB, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual; 2- UFRJ, IBCCF, Laboratório de Ultraestrutura Celular
 Herlton M. Cyr- renato@cbb.uenf.br

It has been shown that *Toxoplasma gondii* infection down modulates nitric oxide (NO) production of activated macrophages (Seabra, S.H. et al., Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. II, 93:285, 1998). There are no data on a possible mechanism utilized by this parasite to explain this NO down modulation. However, eicosanoides are released in the culture medium after *T. gondii* infection (Thardin, J.F., Infect. Immun., 61: 1432-41, 1993). Since these products are potent deactivating factors of macrophages, two (aspirin and indomethacin) cyclooxygenase inhibitors were used to determine the possible involvement of the enzyme products on the down modulation of NO production after *T. gondii* infection. Mouse peritoneal macrophages and a chicken macrophage cell line (HD11 - produce NO after LPS treatment) were used as host cells. Peritoneal macrophages were harvested from mice, seeded on coverslips and cultured for 24 hours in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum. HD11 were maintained in culture flasks with DMEM containing 5% chicken serum. Twenty-four hours before the interaction, unprimed HD11 were seeded on coverslips and cultured as before. Tachyzoites, of the RH strain, were obtained by peritoneal washes of infected mice. After the interactions, peritoneal macrophages were activated with interferon- γ (IFN) and Lipopolysaccharide (LPS), and HD11 with LPS. Macrophages were washed with PBS and infected with a 10 to 1 *T. gondii*/macrophage ratio. After 2 hours of interaction macrophages were washed with DMEM and new medium supplemented with aspirin or indomethacin, containing serum, IFN and LPS (peritoneal macrophages) or LPS (HD11), was added. Supernatants were collected after 24 and 48 hours and assayed

Vol. 94, Suppl. II 1999

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research



IM-103 - RESPONSE OF C57BL/6J MICE IMMUNIZED WITH IRRADIATED TACHYZOITES OF *TOXOPLASMA GONDII* RH STRAIN TO ORAL CHALLENGE WITH ME-49 STRAIN

Hiramoto, R.M.^{1,2}, Galisteo Jr., A.J.², Raiz Jr.³, R., Cardoso, R.P.A.², Okay, T.S.³ & Andrade Jr., H.F.²
 1- S.Radiobiologia IPEN/CNEN SP, 2- Lab.Protozoologia, IMTSP & 3- Instituto da Criança/HCFMUSP
 Av.Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470 - 05403-000 - São Paulo, SP, BRAZIL. email: rnhiramoto@hotmail.com, hfandrad@usp.br

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular protozoan, with felines as definitive hosts and mammals and birds as intermediate hosts. Toxoplasmosis is acquired by the ingestion of food or water contaminated with oocysts from feline stools or raw meat containing cysts. The disease is usually asymptomatic in immune-competent individuals, occasionally with eye lesions. In immune-compromised (AIDS/organs recipients) patients or fetus, the disease can be extremely severe, leading frequently to death or disability. The ionizing radiation was demonstrated to be efficient to eliminate cysts of *T.gondii* in meat or to abolish the reproductive capacity of the parasite, allowing its use for immunization, with promising results. Here, we irradiated tachyzoites of the RH strain of *T.gondii* with 255Gy and immunized groups of C57BL/6j mice with 3 sequential 10⁷ i.p. shots, with posterior oral challenging with 20 cysts from the ME-49 strain. The mortality, immune response and histological lesions in brain, lung, liver, spleen were analyzed. No animal deaths were observed, in contrast with 30% that occurred in non-immunized groups. Specific antibody response was detected through ELISA, showing an increase in the IgG levels after the immunization. For cell cooperation, *in vitro* assays were performed with culture of purified spleen lymphocytes on *T.gondii* antigen coated microplates, with subsequent antibody detection by ELISA. Higher production of IgG was observed with cooperation between lymphocytes from immunized mice as compared with controls. Through histology, it was difficult to identify tissue cysts or lesions in immunized mice, as compared to controls, which presented several cysts and necrotic lesions in the brain, as well as other organs as lung and liver. Greater follicular response occurred in spleen of immunized and challenged mice. RT-PCR for ribosomal RNA on nucleic acids from brains of immunized challenged mice demonstrate small amounts of *T.gondii* rRNA, showing that the induced immunity protect from lesions, but allows brain colonization by cysts. Those promising results demonstrate that ionizing radiation can be important tool in the sterilization of *T.gondii* tachyzoites, allowing both immunity and protection from disease, in the prospects of a vaccine for toxoplasmosis, specially to at risk groups.

R.M. Hiramoto is a fellow of CNPq. A.J. Galisteo Jr is a fellow of FAPESP (98/1681-0). This work was partially supported by FAPESP(96-5875-8) and LIMHCFMUSP-49

IM-104 - STANDARDIZATION OF ANTI-*TOXOPLASMA GONDII* DOG IGG ELISA FOR THE DETECTION OF SEROPREVALENCE OF TOXOPLASMOSIS IN STREET DOGS FROM SÃO PAULO METROPOLITAN REGION

Meireles, L.R., Pompeu, E.*, Cardoso, R.P.A. & Andrade Jr., H.F.
 Laboratório de Protozoologia - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo & *Centro de Bioterismo /FMUSP
 Av.Dr. E.C.Aguiar, 470 - E-mail hfandrad@usp.br

Toxoplasmosis is a high prevalent protozoan disease, which affects at least 20% of the world population. Generally benign or asymptomatic, occasionally it can affect the eye or fetuses, with great social and economic burden, specially in countries with higher prevalence, as Brazil. This disease is transmitted by ingestion of oocysts in water or food contaminated with cat stools, the definitive host, or by ingestion of raw meat containing resting tissue cysts, from warm-blooded intermediate hosts. The dog, mainly the free living, could be used as an index of environmental contamination, as they usually fed in small preys like cats. The infection in dogs is generally asymptomatic, but occasionally causes systemic disease, often with respiratory and neurological involvement. We developed a specific anti *T.gondii* dog IgG ELISA, testing 128 samples from street dogs from São Paulo Metropolitan Region, that were captured by Zoonosis Health Services. ELISA was standardized using positive sera tested with indirect immunofluorescence assay; using microplates coated with saline extract of RH strain tachyzoites from experimentally infected mice. Microplates variation was corrected by a standard cut-off serum, and estimated as artificial units. There were a 77/128(60,15% - 51.5 - 68.4 95% C.I.) positivity in this assay. When dental age and sex were analyzed, the proportion of infection was similar in both sexes (24/44 female and 53/84 males), most age groups presented similar prevalence, showing that the infection occurs early in the dogs life. Take together, these data shows that the prevalence of toxoplasmosis in street dogs was similar to the human seroprevalence in same region, and reflects similar food source and environmental conditions, that could be used in epidemiological interventions for disease control.

L.R.M. is a fellow from FAPESP(98/13323-0). FAPESP (96/5875-8) and LIMHCFMUSP supported this work.

B-U-73 – SURVEY ON PORCINE TOXOPLASMOSIS FROM SWINE FARMS IN SOUTHERN REGION OF BRAZIL

Silva, R. A. M. S.1, Barato, P.2, Bonassi, C. A.2, Vidal, C. E. S.1, Mores, N.1 & Dalla-Costa, O. A.1, Dubey, J. P.3
1-EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, Br 153, km 110, Vila Tamanduá, CEP: 89700-00
Concórdia, SC, Brasil.

2-Universidade do Contestado, Curso de Ciências Biológicas, Bairro Salete, Parque de Exposições, CEP: 89700-00
Concórdia, SC, Brasil.

3-Parasite Biology and Epidemiology Laboratory, Livestock and Poultry Science Institute, Agricultural Research
Service, U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Maryland 20705-2350, USA.

Toxoplasma gondii, a protozoan parasite that infect all species of mammals and birds. Felines, the definitive hosts, are the only animals that pass oocysts into environment. Pigs are commonly infected with *T. gondii* and pork is an important potential source of human infection with the organism.

Serum samples from 223 pigs of 65 farms pig from of Paraná (PR), Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS) states, Brazil were examined for cross reacting antibodies to *T. gondii* by the use of the modified agglutination test (MAT). Anti-*T. gondii* titers of $\geq 1:200$ were found in 12.69% (8/63) of pigs from PR, 10.00% (10/100) of pigs from SC and in 26.66% (16/60) of pigs from R.S. Toxoplasmosis in pigs has worldwide distribution and are numerous reports about infection in several countries. In Canada during 1991/1992, market-age pigs were sampled and the seroprevalences ranged from 3.5 to 13.2% (Gajadhar et al, *J Parasitol.* 84:759-63, 1998). Van Knapen et al (Veterinary Quarterly, 17:87-91, 1995) in the Netherlands showed very low seroprevalences of *T. gondii* in finishing pigs (1.8%). *T. gondii* antibodies have been demonstrated in 3% of slaughter pigs in Denmark (Nielsen & Wegener, *Rev Sci Tech*, 16:513-24, 1997). In Brazil are numerous reports on surveys on porcine toxoplasmosis. A review study by Dubey (*Vet. Parasitol.*, 19: 181-223, 1986) reported founds in Brazil from 11% to 67%. Our results are an indicative that the situation is the same after 13 years of Dubey's report. As yet, there are no interventions designed to reduce swine exposure in the region. Freezing to -20 degrees C, cooking to an internal temperature of 67 degrees C, or gamma irradiation (0.5 kGy) can kill tissue cysts in meat.

B-U-74 – SURVIVAL AND INFECTIVITY OF CYSTS *TOXOPLASMA GONDII* (ME-49 STRAIN) IN HOME MADE FRESH CHEESE PRODUCED WITH ARTIFICIALLY INFECTED MILK

Hiramoto, R.M.^{1,2}, Galisteo Jr., A.J.¹, Mayrbauri-Borges, M.¹, Cardoso, R.P.A.¹, Macre, M.S.¹ & Andrade Jr., H.F.¹

1- Lab. Protozoologia, IMTSP & 2- S. Radiobiologia IPEN/CNEN SP

Av. Dr. Enéas C. Aguiar 470 – 05403-000 – São Paulo, SP, BRAZIL. email: hfandrad@usp.br

Toxoplasmosis, caused by the protozoan *Toxoplasma gondii*, is a benign disease, with occasional eye involvement, affecting around 60% of Brazilian adult population. The infection is transmitted through the ingestion of food and water contaminated with oocysts of the feces of felines, definitive hosts, or raw meat containing tissue cysts in meat from warm blood animals, intermediate hosts. Milk dairy products were frequently home made in small farms of rural areas in Brazil, without milk pasteurization, being one of the most important protein sources in these areas. The raw milk was described as source of infection in man, however a study on the survival of the parasite in dairy products was never studied. We verify the survival and infectivity of *T. gondii* cysts in milk products, by artificially infection of pasteurized bovine milk with 10 viable cysts from ME49 strain *T. gondii* infected mice brain. Fresh cheese was produced by artisanal technique, using market reagents available to Brazilian farmers. These cheeses was offered individually to groups of four C57Bl/6j mice, fresh or stored in 4° C for 5, 10 and 20 days. The ingestion of the cheese was monitored, with mice follow-up by 5 weeks. Only one animal died in the group that ingested fresh cheese immediately after the production, in all other groups no mortality was observed. Control mice, orally infected with 10 cysts in milk, presented a 50% mortality in same period. After 5 weeks, mice were killed, with search of cysts of *T. gondii* in the brain, with serological survey of the infection. We found *T. gondii* cysts in brains of all mice from groups that received contaminated fresh cheese or stored during 5 or 10 days at 4° C. These data were confirmed through ELISA, with presence and progressive increase of specific IgG antibodies in these groups. Mice that received cheese stored for 20 days at 4° C neither presented nor brain cysts or seroconversion. Antibody specificity was also confirmed through Western blotting and histology of the brain of all of the infected mice. Our data prove that *T. gondii* survives the process of fresh cheese production, without significant loss in the viability and infectivity, until 10 days of storage in common refrigerator temperatures, demonstrating that milk dairy products could be an important source of human contamination, reinforcing pasteurization of all milk before any processing or ingestion.

A.J. Galisteo Jr is a fellow of FAPESP (98/1681-0). R.M. Hiramoto is a fellow of CNPq. This work was partially supported by FAPESP(96-5875-8) and LIMHCFMUSP-49

Vol. 93, Suppl. II 1998

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research

XXV Annual Meeting on Basic Research in
Chagas Disease



11-13 November 1998

ISSN-0074-0276

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Proceedings

XXV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease

XIV Meeting of Brazilian Society of Protozoology

Caxambu, MG, Brazil, 11-13 November 1998

Chairpersons

Aldina Barral

Edgar Carvalho

Manoel Barral-Neto

Wanderley De Souza

**Special Issue
Suppl. II Vol. 93
November 1998**

cific IgG to *P. falciparum* extract antigen (Pf) was measured in samples collected from 175 individuals presenting with *P. falciparum* or *P. vivax* blood parasites and from nonparasitemic individuals. One hundred and forty-four individuals (82,3%) were positive for Pf. Among these, sixty individuals (34,8%) presented specific IgG antibodies to EB200, with titres varying between 1/85 to 1/6912. No reactivity were found for tested sera to either the R23.1, R23.2 proteins or AARP peptides. These results showed the development of specific IgG anti-EB200 in natural *Plasmodium*-infected individuals living in areas where malaria is hipoendemic. Both the EB200-specific IgG1 and IgG3 levels and the affinity of EB200-specific antibodies produced are under investigation in our laboratory.

Supported by Fapesp, CNPq.

IM-125

PREVALENCE OF *TOXOPLASMA GONDII* INFECTION IN PIGS FROM BRAZIL AND PERU, DETECTED BY SEROLOGICAL ASSAYS

Galisteo Jr. AJ, Suárez F*, Cardoso RPA, Hiramoto RM**, Andrade Jr. HF

Laboratorio de Protozoologia, IMTSP *Depto. Prat. Saúde Pública, FSP **S. Radiobiologia IPEN/CNEN SP, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil. E-mail: hfandrad@usp.br

Toxoplasmosis, a high prevalent zoonotic infection, had worldwide distribution and is acquired by ingestion of food contaminated with oocysts from cats stools, the definitive host, or by raw or undercooked meat of warm blood animals, intermediate hosts. Generally asymptomatic, this infection could cause eye involvement, or more severe disease, with deaths or abortions in fetus or immune-compromised patients. This infection had a great importance with the HIV epidemic, affecting 20% of AIDS patients with toxoplasmic encephalitis, a disabling and lethal disease. The sources of the infection, specially those attributed to animal products, was limited research, generally related to the ability of the animal to carry the infection, with few reports dealing with the prevalence of those infection on animals used for human nutrition. To evaluate the seroprevalence of this infection in pigs, we analyze 397 sera from 5 months old pigs of trading abattoirs from São Paulo, Brazil(300) and Lima, Peru(97). We detect specific antibodies by indirect hemagglutination, specific anti-*T. gondii* IgG by ELISA and Western Blotting, with some experiments of antibody avidity with urea as chaotropic reagent. Control sera was obtained from an experimentally infected pig, with week blood collection for antibody titers and avidity assays. This infection evokes a clear specific antibody response, with time increment in antibody avidity. Enzymatic assays, ELISA and WB, provides a high prevalence of specific antibodies in pigs both from Peru(34%) and in Brazil(9%), but a high proportion of animals had very low positive titers, most clearly seen in pigs from São Paulo(36%), that could be explained by maternal transmission of antibodies during delivery. The avidity assays showed no correlation with antibody titers, with most positive animals also with a high avidity index. The hemagglutination assays were less efficient in the definition of infection, with both false negative and false positive sera, despite its feasibility. We cannot avoid that other coccidian swine infection could present crossed reaction in this assay. These data demonstrate that pigs could be considered a significant source of human *Toxoplasma gondii* infection, with care and education in the cooking of pork-containing foods. Some serological improvements are needed in the diagnosis of this infection. A.J. Galisteo Jr. is a fellow of FAPESP(98/1681-0). RM Hiramoto is a fellow of CNPq. This study was a part of the thesis of F.Suárez FAPESP (96/5875-8) and LIMHCFMUSP-49 supported this work.

IM-126

PRIMARY *IN VITRO* STIMULATION OF SPLENIC CBA MOUSE CELLS WITH *LEISHMANIA MAJOR* OR *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Santana, CD de*, Lemos V, Freitas LAR de, Veras PST

Laboratório de Patologia e Biologia Celular, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, BA, Brasil

*Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

CBA mice are resistant to infection with *L. major* (*Lm*) but are susceptible to infection with *L. amazonensis* (*La*). *In vivo* studies showed that in this model resistance is associated with a Th1 type of cell-mediated immune response, whereas susceptibility is associated with Th2 type. These observation points to the possible role of factors of the parasite in the modulation of immunoregulatory mechanisms of the host response. Several studies have demonstrated that early events, occurring in the first week after infection, determine the type of the immune response mounted by the host. The primary *in vitro* stimulation (PIV) assay has been proposed to dissect the early events involved in the establishment of the immune response in leishmaniasis and a good correlation with the *in vivo* response have been described. Thereby, we used this system to search for differences in the model of CBA infection with *Lm* or *La*. CBA splenocytes were primed *in vitro* with *Lm* or *La* and supernatants of the cultures from the first to the seventh days were assayed by ELISA for the presence of IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10. Additionally, NO production was measured by Griess reaction. Our results show that the amounts of IFN- γ , IL-10 and NO increased in function of the time of stimulation, the number of parasites used and the concentration of spleen cells added in the

BI-19

⁶⁰CO IONIZING RADIATION EFFECTS IN THE PHYSIOLOGY AND CELLULAR INVASION OF *TOXOPLASMA GONDII* TACHYZOITES

Hiramoto RM, Galisteo Jr. AL*, Cardoso RPA*, Andrade Jr. HF*

Serviço de Radiobiologia IPEN/CNEN *Laboratório de Protozoologia, IMTSP, Av. Dr.E.C.Aguar 470, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil (E-mail: hfandrad@usp.br)

Toxoplasma gondii is an intracellular obligatory protozoon, with a complex life cycle, with felids as definitive host, and warm-blooded mammalian and birds as intermediate host. The infection is transmitted through the consumption of cysts on infected meat by or oocysts of cat's feces in contaminated food or water. Widespread among humans and generally asymptomatic, this agent could induce devastating disease in fetus, AIDS patients and recipients of organ transplants. The ionizing radiation was used to sterilized meat and immunized animals against *T. gondii*, with encouraging results, and here we study the physiological alterations and cellular invasiveness of 200 Gy irradiated tachyzoites. After the irradiation, we study the physiology of the agent by precursor incorporation in short term cultures, aside to metabolic assays using MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Tyazolyl blue) as revealing agent of oxidative metabolism, and morphological study of its invasiveness on LLC-MK2 and human fibroblasts. The irradiated parasites presented the same oxidative response, protein synthesis (³H-proline) and nucleic acid(³H-hypoxantina) incorporation as their non-irradiated counterparts. These irradiated parasites had the same capability of cell invasion and parasitic vacuole formation on both cells tested, as compared to non-irradiated agents. No further growth of the parasite was observed in those cultures, with some clearly degeneration of the irradiated agent after invasion, suggesting that the irradiation induced a mitotic death by double strand breaks in DNA. Those data reinforces the fact that, at those level of radiation, the only effect was the reproductive blockade of the parasite, with preservation of most of their metabolic and physiologic activity, an desirable effect in vaccine development.

RM Hiramoto is a fellow of CNPq. AJ Galisteo Jr. is a fellow of Fapesp (98/1681-0). Fapesp (96/5875-8) and LIMHCFMUSP-49 supported this work.

BI-20

A NEW MODEL FOR THE STUDY OF THE DAMAGE AND RECOVERY OF SYMPATHETIC NERVE TERMINALS INDUCED BY *TRYPANOSOMA CRUZI* AND OTHER PRO-INFLAMMATORY AGENTS USING THE RAT DUCTUS DEFERENS

Arantes RME, Galvão LMC, Santos MMF, Machado CRS

Departamentos de Morfologia e de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

We have developed and standardized an experimental model for studying inflammatory processes induced directly in the smooth muscle layer of the rat ductus deferens aiming at assessing their effects on the sympathetic innervation. Besides an easy surgical accessibility, the rat vas deferens has a rich post-ganglionic sympathetic innervation that remains unaffected by *Trypanosoma cruzi* infection (Y strain) via the peritoneal cavity. Adult Holtzman rats (180 animals) comprised the following groups according to the material injected directly in the ductal wall: alive trypomastigotes (Y strain), dead trypomastigotes, supernatant of *T. cruzi* culture, carrageenan and methylated albumin. In this later case sensitized and non-sensitized animals were used. Controls were provided by sham-operation, inoculation of sterile saline or culture medium. Ductus deferens fragments were withdrawn at 48 hours, 4, 8, 10, 12, 14, 20 days and processed for histological study and for the histochemical demonstration of catecholamines by a glyoxylic acid technique. In groups inoculated with *T. cruzi* forms or culture supernatant the hearts were also histologically studied. Regarding the experiments with alive trypomastigotes, the kinetic of the inflammation was faster in the ductal smooth muscle than in heart. In the ductus, the most intense mononuclear exudate and parasitism occurred at days 8-12. Afterwards there was a fast recovery, the normal histological pattern being reached at day 20. By this time the heart still exhibited intense inflammatory infiltrate. The glyoxylic-acid-induced fluorescence showed intense and diffuse reduction of nerve terminals in the ductus at days 8 to 14. At day 20, the recovery of the normal pattern of innervation was still incomplete, in spite of the normal histology. All other procedures induced focal rarefaction of nerve terminals restricted to tissue damage, with faster recovery. We conclude that the nerve lesions occurred in parallel with the inflammatory process and that the regeneration of the smooth muscle was faster than that of the nerve terminals. Our model is suitable for *in vivo* interventions aiming at inhibiting hypothetical mechanisms supposed to be implicated in the pathology of Chagas' disease. This is our next objective.

supported by Pronex-1996, Fapernig and CNPq.

São Paulo, 21 de maio de 2002.

Ilmo(a). Sr(a).

Dr(a) Roberto Mitsuyoshi Hiramoto
CNEN/IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242
05508-000 – São Paulo, SP

Trabalho: 688

Título: Taquizoitos de Toxiplasma Gondi Irrradiados 255 Gy Induzem Diminuição de Cistos e Lesões Cerebrais, em Camundongos Desafiados com Cistos de Cepa ME-49.

Prezado(a)(s) Autor(es)(as),

É com satisfação que informamos que o seu trabalho foi aceito para apresentação e publicação nos anais do *VI Encontro Nacional de Aplicações de Técnicas Nucleares* a ser realizado no Rio de Janeiro, no período de 11 e 16 de Agosto de 2002, no *INAC- 2002: International Nuclear Atlantic Conference*.

Para publicação do trabalho nos *Anais da Conferência*, solicitamos que as recomendações anexas, sugeridas por dois revisores, sejam incorporadas na versão final do trabalho, se julgadas procedentes. Caso alguma recomendação seja julgada improcedente, a *Comissão Editorial* do *VI ENAN* deverá ser notificada, em folha à parte, a ser enviada junto com a versão final do trabalho.

Na versão final do trabalho, favor fazer as seguintes alterações:

- Eliminar do topo do texto o **Protocol Number: XXX** e o **Abstract Code: XXX**.
- Acrescentar, logo abaixo do **Resumo** (espaçamento de uma linha), as palavras chaves que deverão estar escritas em inglês, mesmo que o trabalho tenha sido escrito em português ou espanhol. A finalidade das palavras chaves é a de facilitar a consulta do trabalho no CDROM do Evento e deverão ser escritas no formato abaixo:

Key Word: word 1, word 2 ... até word 5.

- Enviar duas cópias em papel da versão final do trabalho no formato A4 e o arquivo 688.doc, obrigatoriamente em Microsoft Word 97, em disquete de 3 ½" ou CDROM. As páginas não devem ser numeradas.
- Retornar as 2 cópias do trabalho revisado junto com a versão final do trabalho.
- Enviar no mesmo disquete ou CDROM o arquivo 688_abs.doc, para publicação no "Livro de Resumos", contendo apenas o título do trabalho, autores, instituição e resumo em inglês, mesmo que seu trabalho final tenha sido escrito em português ou espanhol.

Em virtude dos prazos impostos para a confecção dos Anais da Conferência, o original do trabalho deverá ser enviado impreterivelmente até o dia 3 de junho de 2002. Qualquer atraso acarretará na não inclusão do trabalho nos Anais da Conferência.

Posteriormente, enviaremos informações do local, dia e hora da apresentação do trabalho.

Atenciosamente,


Margarida Mizue Hamada
Coordenadora da Comissão Editorial do VI ENAN.

255 GY IRRADIATED TACHYZOITES OF *Toxoplasma gondii* INDUCE DECREASE OF CYSTS NUMBER AND CEREBRAL LESIONS IN MICE CHALLENGED WITH ME-49 STRAIN

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 Gallisteo 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.

Key Word: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis and ionizing radiation.

1 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 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 seriais 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 peritonial 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 inóculo 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 homogeneizados 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).

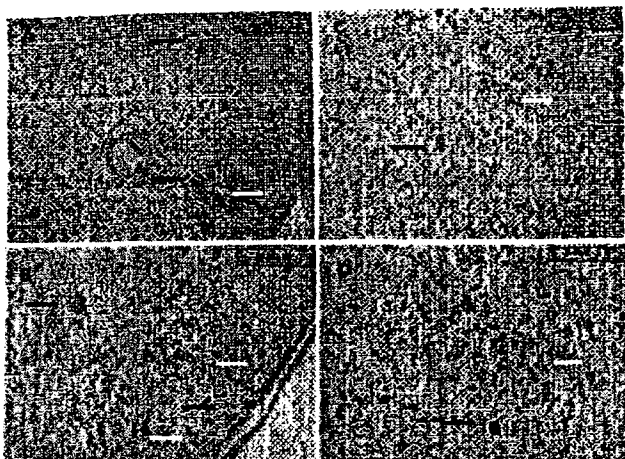


Figura 1. Histologia do cérebro de camundongos C57BL/6j desafiados com 25 cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*. (A e B) camundongos normais; (C e D) imunizados com três doses i.p. a cada 15 dias com 1×10^7 taquizoítos irradiados a 255 Gy. As setas pretas indicam cistos de *T. gondii* e as setas brancas 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).

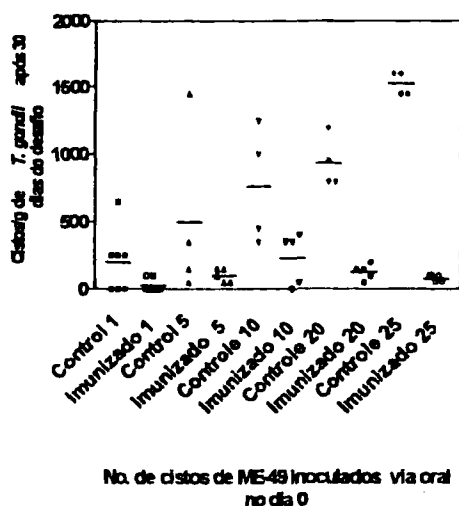


Figura 2. Quantificação do número de cistos encontrados no cérebro de camundongos inoculados via oral com cistos da cepa ME-49 de *T. gondii*, 30 dias após o desafio. As barras indicam a média. Controle, camundongos normais; Imunizado, camundongos imunizados com três doses i.p. a cada 15 dias com 1×10^7 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 nucleicos e quando animais são imunizados com taquizoítos irradiados há produção de anticorpos específicos e aumento na sobrevivência 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 sobrevivência 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 aos 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 sobrevivência dos animais, quando desafiados [15, 16, 17]. Outros esquemas de imunizações utilizaram antígenos purificados, mas apesar de induzir aumento de sobrevivência 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.

REFERÊNCIAS

- [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., Ugglä, 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.

MEDICINA Técnica deixa parasita da toxoplasmose com suas funções vitais intactas, mas estéril, melhorando a imunização

Radiação gera vacina contra toxoplasma

RENALDO JOSÉ LOPES
FEE-LANCE PARA A FOLHA

A radiação costuma ser associada a todo tipo de tragédia, de Hiroshima a Chernobyl. Mas doses calculadas dela estão ajudando pesquisadores da USP a desenvolver vacinas contra protozoários, os microrganismos mais complexos do planeta. Uma delas já mostrou bom potencial contra o *Toxoplasma gondii*, o causador da toxoplasmose, contra o qual até hoje não há vacina eficiente.

A idéia de usar a radiação numa vacina nasceu do trabalho conjunto de cientistas do Instituto de Medicina Tropical, ligados à Fe-

culdade de Medicina da USP, com os do Ipen (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

É o que explica Heitor Franco de Andrade Júnior, coordenador da equipe. "Um trabalho feito pelo pessoal do Ipen tinha mostrado que as toxinas do veneno de cobra, quando eram irradiadas com raios gama, induziam uma resposta melhor nos macrófagos [células do sistema imune]", afirma.

Foi então que surgiu a idéia de usar esse princípio para criar uma forma de imunização mais confiável contra o *Toxoplasma gondii*, um microbio que, apesar de estar por todo lado no Brasil — para dar uma idéia, 60% da população do Estado de São Paulo tem ou teve a criatura no organismo —, é capaz de causar estragos sérios em pessoas com deficiência imunológica (como doentes de Aids e transplantados) e em mães grávidas e fetos.

Andrade explica que o toxoplasma é um parasita "inteligente" do ponto de vista evolutivo, porque raramente mata seu hospedeiro. Adaptado a boa parte dos mamíferos e também a algumas aves, o microbio só se reproduz acuradamente no intestino dos seus hospedeiros definitivos, os felinos.

Sexo no intestino

"O toxoplasma não quer te matar. O que ele quer é fazer sexo no intestino de um gato", brinca Andrade. É que, como qualquer criatura com reprodução sexuada, o toxoplasma se diversifica e se torna mais adaptável ao trocar genes usando o sexo. Ele se espalha por

outras espécies graças às fezes dos gatos, que carregam cistos com o parasita, posteriormente ingeridos por ratos, ovelhas, porcos, bois e pelo homem.

Em seu trabalho, os cientistas usaram o microbio inteiro como antígeno, ou seja, como fator capaz de provocar a imunidade contra o *T. gondii*. O pulo do gato, porém, é que o protozoário precisa de uma dose de radiação antes, que não o mata, mas é suficiente para impedir que ele se reproduza no organismo do hospedeiro.

O protozoário "castrado" continua com todas as suas outras funções vitais intactas. Para todos os efeitos, é como se o hospedeiro que o recebe tivesse sido imunizado pelo microbio sadio. Isso, acreditam os pesquisadores, tornaria a vacina muito mais eficiente. Os testes em camundongos mostraram um grau de imunização tão grande quanto o produzido pelo protozoário sadio.

O trabalho mostrando o desempenho da vacina foi publicado neste mês na revista científica "Vaccine". Para Andrade e seus colegas Roberto Hiramoto (autor principal do artigo) e André Galistero Júnior, o próximo passo é encontrar uma maneira de administrar a vacina por via oral, da maneira como ocorre naturalmente a infecção do protozoário.

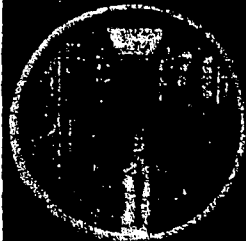
De acordo com Hiramoto, o mesmo método está sendo testado no protozoário *Leishmania*, causador da leishmaniose, doença que faz 30 mil vítimas por ano no país. "Mas ainda estamos verificando os efeitos da radiação nele", ressalva.



Protozoário *Toxoplasma gondii* poderá ser combatido com vacina feita com radiação ionizante

Conheça os
maiores
navios
do mundo.

Exclusivo para assinantes da Folha



Exclusivo para assinantes da Folha

Exclusivo para assinantes da Folha

PANORÂMICA

MEDICINA

**Droga combate
câncer avançado
de pulmão**

Uma pílula que está sendo testada em seres humanos conseguiu melhorar os sintomas de pacientes com câncer avançado de pulmão e mesmo diminuir o tamanho do tumor

AMBIENTE Brasil pressiona por santuário para baleias em reunião realizada no Japão

A reunião plenária da CIB (Comissão Internacional da Baleia) que começa hoje no maior porto baleeiro do Japão, Shimonoseki, terá uma queda-de-bra-

Shimonoseki, serão necessários 24 votos para que a criação do santuário seja aprovada.

A proposta de criação do santuário do Japão