



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A ESTRUTURA,
METABOLISMO E INFECCIOSIDADE DE UM PROTOZOARIO
PATOGENICO, *Toxoplasma gondii*
(Nicole and Manceaux, 1908)**

ROBERTO MITSUYOSHI HIRAMOTO

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear.

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

**São Paulo
1998**

576.Y
H.6682

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A ESTRUTURA,
METABOLISMO E INFECCIOSIDADE DE UM PROTOZOÁRIO
PATOGENICO, *Toxoplasma gondii* (Nicolle and Manceaux, 1908)**

ROBERTO MITSUYOSHI HIRAMOTO

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do grau de Mestre em
Ciências, na Área de Tecnologia Nuclear Básica.

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

SÃO PAULO

1998



Este trabalho é dedicado aos meus pais, Suemitsu e Naoko Kiramoto, pois foram as pessoas que estavam presentes, me incentivando nos estudos em todas as fases da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr, não só pela orientação, mas também pela confiança, apoio, liberdade e amizade em todas as etapas do trabalho.

A Erika Hellena Esther Hoffmann, pela amizade, carinho e auxílio durante as várias fases do trabalho.

Ao amigo Bruno Andrade Cardi, pelas várias sugestões e auxílios durante todas as fases do trabalho.

À Roselaine Perreira Alvin Cardoso e Isabel Cristina Alves técnicas do Laboratório de Protozoologia, pela amizade e pelo valioso auxílio técnico em vários estágios do trabalho.

À Marilda S. do Nascimento, do Laboratório de Protozoologia pela amizade e ensinamentos na parte de cultura celular.

A Norival Kesper Jr e Marcelo Silva dos Santos pelo auxílio nas técnicas de Eletroforese e Western Blotting.

A todas as pessoas do Laboratório de Protozoologia, pela amizade, incentivo e apoio técnico que sempre ofereceram.

Aos engenheiros Carlos Gaia da Silveira e Elizabeth S. R. Lamessari, do Departamento de Aplicações na Engenharia e Indústria - IPEN, pela irradiação das amostras.

Aos amigos da Supervisão de Radiobiologia do IPEN, em especial a Marisa Lemes e Patrícia Nascimento, por auxiliarem nas técnicas utilizadas no decorrer do trabalho.

A Andrés Jimenez Galisteo Jr, pelo auxílio nas etapas finais do trabalho, eletroforese, Western Blotting e ensaios de invasão celular.

A todos as pessoas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMUSP, principalmente a Marcelo Alves Ferreira pelo auxílio, orientação e realização nas etapas de microscopia eletrônica.

A Prof^ª. Dra. Maria Teresa Carvalho Pinto Ribela e Prof^ª. Dra. Kayo Okazaki, pelas valiosas sugestões quando do Seminário de Área.

Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratório de Protozoologia (Lim 49), pela infra-estrutura e materiais fornecidos.

A supervisão de Radiobiologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/CNEN-SP, pelo suporte institucional.

Ao CNPq pelo financiamento desta Dissertação sob a forma de Bolsa.

A FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto 1996/5875-8.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE A ESTRUTURA, METABOLISMO E INFECTIVIDADE DE UM PROTOZOÁRIO PATOGENICO, *Toxoplasma gondii*

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

O protozoário do filo Apicomplexa, *Toxoplasma gondii*, é um parasita intracelular obrigatório, que têm os felinos como hospedeiros definitivos e como intermediários diversos grupos de mamíferos e aves, incluindo o homem. No homem, geralmente a infecção pelo *T.gondii* é assintomática, no entanto alguns grupos apresentam doença grave que pode levar a morte, como é o caso dos fetos de mães primoinfectadas, pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) e transplantados. A transmissão ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de gatos contendo oocistos ou carnes mal cozidas contendo cistos. Até o momento não existem vacinas comerciais, com alguns trabalhos utilizaram a radiação ionizante para atenuar ou inibir o crescimento do parasita, com dados promissores, mas sem a otimização do processo de irradiação e sem estudos sobre alterações causadas nos taquizoítos de *T.gondii* após o processo.

Utilizando doses crescentes de radiação de ^{60}Co em taquizoítos de *T.gondii*, nós estudamos a morfologia, através de microscopia eletrônica e óptica, detecção da fragmentação de DNA, alterações no metabolismo (determinação da capacidade respiratória, síntese de proteínas, ácidos nucléicos e DNA), determinação da sobrevivência do parasita em modelos *in vivo* e *in vitro*, antigenicidade e imunogenicidade após o processo, invasão celular e proteção induzida pelos taquizoítos irradiados.

Após a definição de 200 Gy de irradiação de ^{60}Co , como a dose que elimina o crescimento do parasita *in vitro* e *in vivo*, nós não detectamos mudanças na viabilidade, nos mecanismos de invasão, estrutura de proteínas e no metabolismo do *T.gondii*.

Camundongos inoculados com parasitas irradiados, protegem parcialmente estes animais de novos desafios com parasitas não irradiados, com aumento na sobrevivência e produção de IgG. *T.gondii*, apesar da irradiação, mantém o seu poder de invasão celular. Com base em nossos resultados, concluímos que a radiação ionizante é uma possível ferramenta para uma vacina para toxoplasmose, por induzir a manutenção de suas características bioquímicas, metabólicas e fisiológicas, mas sem capacidade reprodutiva.

ABSTRACT

EFFECTS OF IONIZING RADIATION OVER THE STRUCTURE, METABOLISM AND INFECTIVITY OF A PATHOGENIC PROTOZOAN, *TOXOPLASMA GONDII*

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa), has as definitive host domestic and wild felines and as intermediate hosts most species of mammals and birds, including man. The infection in man is usually asymptomatic, but can become a severe and lethal illness in some special groups like the fetus of primoinfected pregnant woman, or in AIDS and transplanted patients. The transmission is due to ingestion of food or water contaminated with oocysts from cat feces as well as raw or rare cooked cyst containing meat. There is no available vaccine against toxoplasmosis, with some reports of the use ionizing radiation in order to attenuate or suppress the parasite. These studies are promising, but more research is needed to optimize the radiation process and to clarify those alterations caused on *T gondii*.

Using a increasing doses of ^{60}Co irradiation on *T.gondii* tachyzoites, we studied many parameters such as morphology, both at optical and electron microscopy level, detection of DNA fragmentation, metabolism alterations (cellular oxidative burst, protein, nucleic acids and DNA synthesis), determination of the parasite survival both in *in vivo* and *in vitro* models, antigenicity and immunogenicity after the process, cellular invasion and irradiated tachyzoite induced protection.

After definition of 200 Gy of ^{60}Co irradiation as the lower radiation dose that suppress parasite growth *in vitro* and *in vivo*, we found no detectable changes in parasite viability, its cell invasion capacity or in its structural proteins. DNA fragmentation like apoptosis or alterations of the parasite metabolism were similarly not affected by radiation.

Mice infection with irradiated parasites induce partial protection when these animals were re-inoculated with non irradiated virulent parasites, inducing greater specific IgG levels as well as a longer survival. Irradiated *T.gondii* maintains its the ability of invasion, even under radiation effects. Based on our results we conclude that ionizing radiation can be considered as a possible tool in vaccine production due to similar viability, invasivity and metabolism and absence of reproductive capacity, of irradiated tachyzoites.

I – INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença humana de alta prevalência, causada por um protozoário intracelular obrigatório, *Toxoplasma gondii*. A infecção é muito comum em animais, sendo uma importante causa de aborto e morte neonatal em ovelhas, cabras e porcos, os quais são igualmente suscetíveis à infecção (Dubey, 1991; Freyre *et al*, 1996; Chang *et al*, 1991).

T.gondii, apesar de infectar com frequência o homem, causa geralmente doença benigna, pois raramente causa distúrbios no seu hospedeiro e, quando isto ocorre, as perturbações são em geral, leves e temporárias. A coriorretinite (acometimento ocular) é a principal forma clínica da toxoplasmose adquirida em indivíduos imunocompetentes sendo uma das causas mais comuns de uveítes nos EUA, Europa Ocidental e América Latina (Amato Neto *et al*, 1995).

No Brasil, 60% da população já foi infectada até a idade adulta (Guimarães *et al*, 1993); na França 90% da população é infectada e nos Estados Unidos e Reino Unido, de 10 a 50% (McCabe & Remington, 1988). Embora a resposta imune seja eficiente no controle da infecção, alguns taquizoítos, após a invasão da célula hospedeira, desenvolvem-se mais lentamente. Estes, em células relativamente estáveis, como neurônios e células musculares, são capazes de resistir por longos períodos, geralmente anos, sem despertar resposta tecidual significativa (Duarte & Andrade Jr., 1994). Alguns grupos de pacientes não são capazes de montar uma resposta imune eficiente, o que leva à uma rápida proliferação do agente, causando doença devastadora e êxito letal (Gleason & Hamilin, 1974).

Na toxoplasmose congênita, quando a mãe se infecta durante a gestação, o feto é contaminado por taquizoítos através da placenta, causando lesões no sistema nervoso central (SNC) ou coriorretinite (Thomas & Pelloux, 1993). Este pode ser um quadro agudo, extenso, com alto grau de letalidade ou de lesões irreparáveis, denominada tétrede de Sabin, cujas manifestações são: a) hidrocefalia ou microcefalia; b) corioretinite; c) calcificações intracranianas e d) retardamento mental (Sabin, 1941).

Cerca de 4.100 das 4,1 milhões de crianças nascidas nos E.U.A. todo ano, apresentam infecção congênita, sendo que a maioria não mostra sinais clínicos

ao nascer, mas apresentam alguma seqüela no decorrer da vida (Remington *et al*, 1995). Muitas destas crianças podem desenvolver coriorretinite durante a adolescência ou na fase adulta (Frenkel, 1990). 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). Na França e Áustria a incidência de toxoplasmose congênita é de 3-4 casos por cada 1000 nascimentos e no Reino Unido foram descritos 91 casos entre 1975 e 1980 (Smyth, 1994).

Outros grupos afetados pela toxoplasmose são pacientes imunocomprometidos, como aqueles portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS) e transplantados. A toxoplasmose em pacientes com AIDS é, na maioria das vezes, causada pela recrudescência dos cistos latentes, causando muitas vezes lesões no sistema nervoso central; nos transplantados, devido a imunossupressão, também pode ocorrer a reativação dos cistos ou infecção primária nos órgãos transplantados (Thomas & Pelloux, 1993). Nos Estados Unidos na primeira década da epidemia de AIDS, 20.000 a 40.000 pacientes infectados com HIV apresentaram as formas clínicas da toxoplasmose (Gellin & Soave, 1992).

Este agente apresenta um ciclo vital complexo com múltiplos hospedeiros (Figura 1). Brevemente, os felinos em geral são os hospedeiros definitivos de *T.gondii* (Frenkel *et al*, 1970), sendo que estes podem se contaminar pelas três formas infectantes do parasita: taquizoítos, presentes nas células infectadas; bradizoítos, presentes em cistos teciduais; e esporozoítos, liberados pelos oocistos. Os parasitas então se reproduzem sexuadamente nas células epiteliais do intestino dos felinos, liberando oocistos em suas fezes, estrutura essa que é muito resistente as condições ambientais e a agentes químicos.

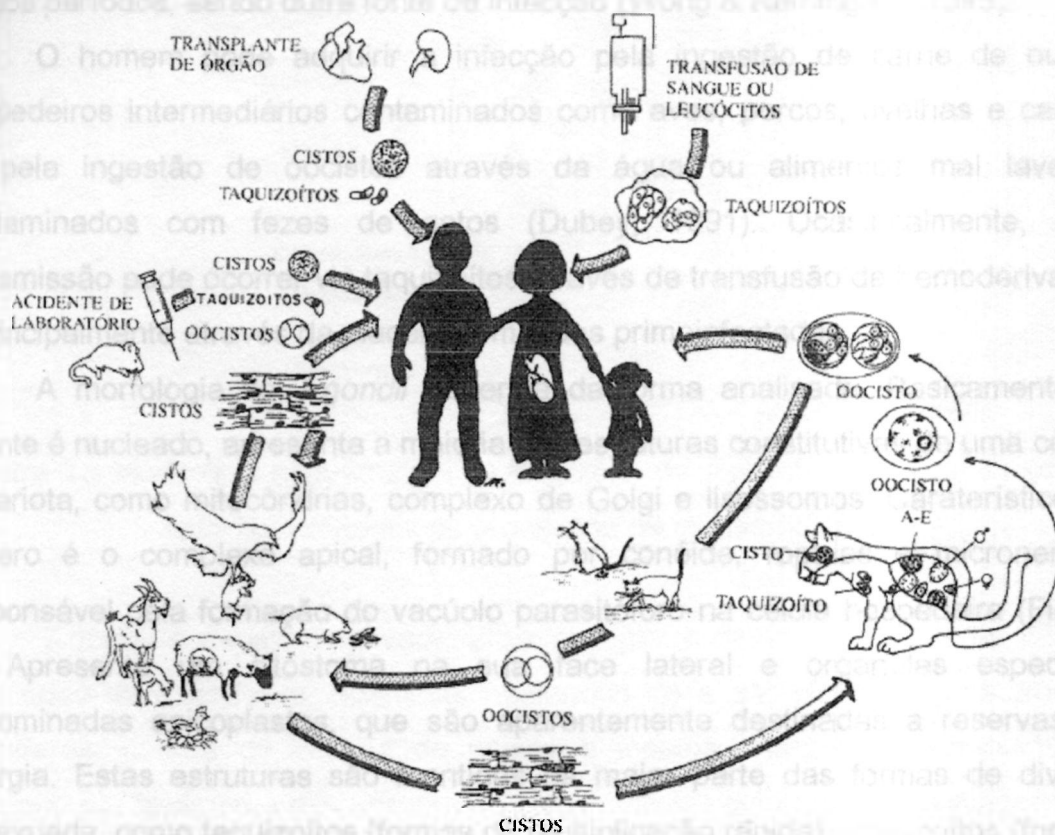


Figura 1 – Ciclo vital do *T.gondii*, com as várias fontes de infecção para o homem. A-E – formas de proliferação assexuada no intestino do felino. Símbolos sexuais representam os micro e macrogametócitos, formas de reprodução sexual no hospedeiro definitivo.

Nos demais animais que funcionam como hospedeiros intermediários, a contaminação ocorre principalmente através da ingestão de alimentos ou água contaminados com oocistos. Neste hospedeiros, as formas do parasita encontradas são taquizoítos, formas assexuadas invasivas de rápida multiplicação, ou bradizoítos, de lenta proliferação encontradas no interior dos cistos teciduais na infecção crônica, persistindo nas células dos hospedeiros por longos períodos, sendo outra fonte de infecção (Wong & Remington, 1993).

O homem pode adquirir a infecção pela ingestão de carne de outros hospedeiros intermediários contaminados como aves, porcos, ovelhas e cabras ou pela ingestão de oocistos através da água ou alimentos mal lavados contaminados com fezes de gatos (Dubey, 1991). Ocasionalmente, esta transmissão pode ocorrer via taquizoítos através de transfusão de hemoderivados e principalmente através da placenta em mães primoinfectadas.

A morfologia do *T.gondii* depende da forma analisada. Basicamente, o agente é nucleado, apresenta a maioria das estruturas constitutivas de uma célula eucariota, como mitocôndrias, complexo de Golgi e lisossomos. Característico do gênero é o complexo apical, formado por conóide, roptrias e micronemas, responsável pela formação do vacúolo parasitóforo na célula hospedeira (Figura 2). Apresenta um citóstoma na sua face lateral e organelas especiais, denominadas apicoplastos, que são aparentemente destinadas a reservas de energia. Estas estruturas são mantidas na maior parte das formas de divisão assexuada, como taquizoítos (formas de multiplicação rápida), bradizoítos (formas de multiplicação lenta em cistos) e esporozoítos (formas liberadas de oocistos) (Dubey, 1993).

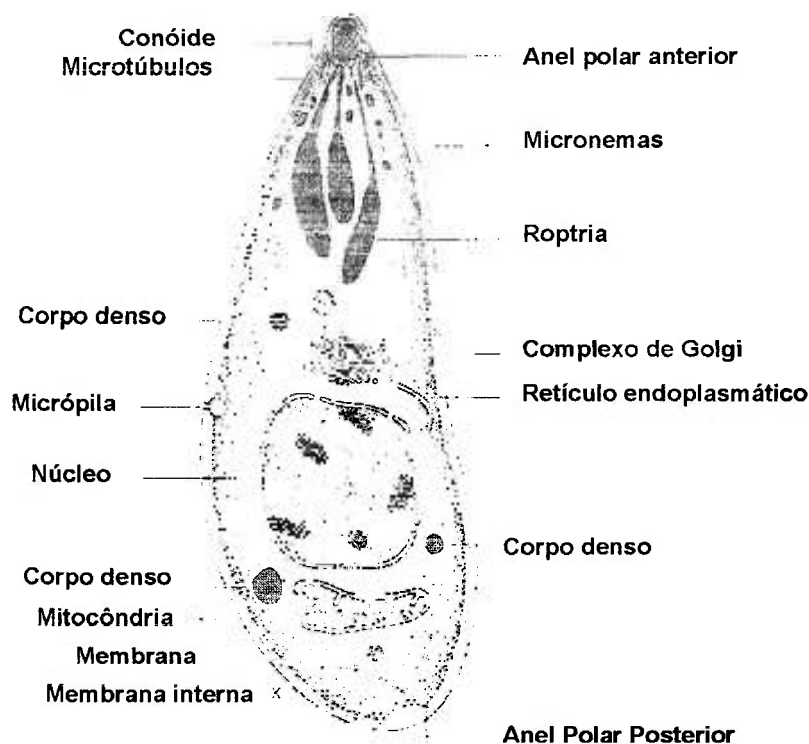


Figura 2 – Morfologia esquemática de taquizóito de *T.gondii*. Conóides e roptrias estão envolvidos nos processos de invasão celular.

T.gondii é capaz de invadir e se multiplicar dentro de todas as células nucleadas de mamíferos, hemácias nucleadas de aves, eritrócitos imaturos de mamíferos, cultura de células de peixes e insetos (Kasper & Mineo, 1994), podendo ser facilmente mantido em diversas culturas celulares ou passagens por animais (Park *et al*, 1993).

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).

Apesar de geralmente assintomática (Frenkel, 1988), estudos mais recentes têm demonstrado que a infecção crônica pode alterar o comportamento, como foi demonstrado em ratos (Webster, 1994; Webster *et al*, 1994) e humanos (Flegr *et al*, 1996).

Até o momento não existe nenhuma vacina comercial contra a toxoplasmose humana, que previna a infecção congênita, ou a formação e reativação de cistos (Gottstein, 1995). A única vacina registrada é a Toxovax, para uso em ovelhas, que utiliza taquizoítos viáveis da cepa S48 (Buxton, 1993). Em ensaio utilizando ovelhas imunizadas com esta vacina atenuada e posteriormente desafiadas com oocistos, foi mostrado uma eficiência parcial de proteção, com 80% dos fetos livres de infecção nascidos a partir de ovelhas imunizadas, ao invés de 15% de fetos livres de infecção em ovelhas sem vacinação (Buxton *et al*, 1991).

Outras modelos de imunizações de inoculação de parasitas vivos, de baixa patogenicidade, foram tentadas 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 recrudescência da infecção e conseqüentemente lesões graves. A imunização com parasitas mortos também foi testada, mas a imunidade apresentada em ovelhas foi de curta duração, como demonstrado pelo desafio com cepas patogênicas (Wandeland & Frenkel, 1983), mesmo utilizando adjuvante incompleto de Freund, sem proteção dos animais contra novas 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 de proteção (Velge-Roussel *et al*, 1994). Outros modelos de construção de proteínas híbridas, para melhorar a imunogenicidade resultaram em resultados contraditórios (Lunden, *et al*, 1997), provavelmente pela necessidade de uma resposta conformacional específica

tanto celular como humoral (Khan *et al*, 1988). Estes fenomenos 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 consequente 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 eficiência maior.

Uma solução para a produção de vacinas e esterilização de alimentos seria através da utilização da radiação ionizante (Dubey & Thayer, 1994). A radiação ionizante 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/ou 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(OH^\bullet) e peroxila(HO_2^\bullet). Os mesmos podem interagir com moléculas biológicas, afetando estruturas celulares e ampliando os efeitos deletérios da radiação. Os ácidos nucléicos e as proteínas são as principais moléculas afetadas. A radiosensibilidade depende da linhagem celular, podendo a morte ser por necrose ou apoptose (Szumiel, 1994). Linfócitos humanos apresentam apoptose radio-induzida e dose dependente (Lemes, 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*, 1997).

A radiação ionizante foi utilizada em outros grupos de parasitas com o objetivo da produção de vacinas (Wales & Kusel, 1992). Quando caramujos eram previamente infectados com miracídios de *Schistosoma mansoni* irradiados, os miracídios normais não conseguiam se desenvolver após penetrar nos caramujos (Antunes *et al*, 1971). 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). Nos plasmódios, parasitas causadores da malária, também pertencentes ao filo Apicomplexa, a imunização de indivíduos com esporozoítos irradiados foi capaz de induzir proteção parcial contra esporozoítos normais, mas falhou em proteger os indivíduos quando formas merozoíticas ou eritrocíticas foram utilizadas como desafio (Nusse Zweig *et al*, 1969). 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).

Song e colaboradores (1993) mostraram que os cistos teciduais de algumas cepas de *T.gondii* perdem completamente a infectividade ao serem irradiados com doses de aproximadamente 550 Gy, que é uma dose muito abaixo dos 10.000 Gy estabelecida para gêneros alimentícios pela FAE/IAEA/WHO. Em outro trabalho, utilizando cistos da cepa TG-3, observou-se que esta se torna completamente inviável diante de uma irradiação de 500 Gy, e que a 400 Gy há uma perda de infectividade de cerca de 10.000 vezes (Dubey & Thayer, 1994). Outros métodos físicos para se evitar a contaminação através de alimentos, além da radiação gama, seria o congelamento a -12°C ou o cozimento acima dos 67°C (Dubey, 1996).

A irradiação das formas proliferativas da cepa RH, mostrou que doses em torno de 100 Gy, a infectividade é parcialmente eliminada e que, em doses superiores a 150 Gy, a infectividade é totalmente eliminada (Bakal & Veld, 1979). Quando taquizoítos de *T.gondii*, cepa RH, são irradiados a 200 Gy e inoculados

em camundongos, com posterior desafio com formas não irradiadas 3 semanas após, não se evidencia morte dos animais, mas no entanto quando este desafio é realizado após 6 semanas ocorre morte de quase todos os animais (Chhabra *et al*, 1979), sugerindo que a resposta imune induzida por estes agentes é fugaz e necessita de aprimoramento.

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.

II – OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o efeito da radiação ionizante sobre *T.gondii*, visando a produção de um imunógeno seguro, com mesmas características biológicas mas ausência de capacidade reprodutiva.

ESPECÍFICOS

Detectar as possíveis alterações provocadas pela radiação ionizante na morfologia do *T.gondii*, a nível de microscopia de luz e eletrônica.

Investigar alterações metabólicas provocadas pela radiação ionizante no *T.gondii*.

Investigar alterações induzidas na mobilidade eletroforética e na antigenicidade de proteínas de taquizoítos de *T.gondii*, após a irradiação.

Investigar alterações induzidas pela radiação ionizante no comportamento biológico de viabilidade, invasividade e capacidade de apoptose.

Avaliar a capacidade reprodutiva de taquizoítos de *T.gondii* *in vivo* e *in vitro*, modificadas pela radiação ionizante.

Detectar alterações na antigenicidade e na imunogenicidade de *T.gondii*, causadas pela radiação ionizante.

Avaliar a capacidade protetora de taquizoítos irradiados frente a um desafio com parasitas viáveis.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Materiais

1.1 - Reagentes Gerais

Todos os sais e demais reagentes usados eram de qualidade pró-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.

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Tyazolyl blue) (SIGMA[®]), solução estoque 5mg/ml em PBS, mantidos em frasco escuro a 4°C.

Prolina (L-(2,3-³H) PROLINE atividade específica 1.33TBq/mmol) (Amersham International plc/Amersham UK.), diluída em meio de cultura DME (1/100) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Hipoxantina [(G-³H) HYPOXANTHINE atividade específica 218GBq/mmol] (Amersham International plc/Amersham UK.), diluída em meio de cultura DME (1/100) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Timidina ([methyl-³H] THYMIDINE) (Amersham LIFE SCIENCE atividade específica 2.96TBq/mmol), diluída em meio de cultura DME (1/500) suplementado com 10% de soro fetal bovino.

Kit de Detecção de Fragmentação de DNA (TdT-FragEL[™], Oncogene).

1.2 – Parasitas e linhagens celulares

1.2.1 - *Toxoplasma gondii*

Os parasitas utilizados foram taquizoítos da 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) com o peso variando entre 20 e 22 gramas, por meio de lavagem do peritônio 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) e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p) em novos animais. Ocasionalmente um isolado de feto com infecção congênita, do Laboratório de Protozoologia do IMTSP, foi usado para comparação de cepas (cepa IMT096) sendo mantido em estabilato de nitrogênio líquido.

1.2.2 – Linhagens celulares de mamífero

Nos ensaios foram utilizadas duas linhagens celulares, uma estabelecida, a linhagem LLC-MK2, que é rotineiramente mantida no Laboratório Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP) e outra primária, fibroblastos humanos normais, obtida a partir de explantes de prepúcio de crianças, obtida junto ao Laboratório de Virologia do IMTSP. Estas linhagens eram habitualmente mantidas por cultivo em meio RPMI 1640 ou meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DME] (SIGMA®) contendo 5-10% de Soro fetal bovino, em atmosfera de ar 95% CO₂ 5% ou criopreservados em nitrogênio líquido.

1.3 - Animais experimentais

Camundongos machos isogênicos C57Bl/6J e Balb/C, e não isogênicos Swiss, todos com peso entre 20 e 22g, foram 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 ao inóculo, 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. Todos os procedimentos com animais seguiram as normas "Principles of Laboratory Animal Care" (NHI Publication nº 86-23, revised 1985) e os "Princípios de Ética na Experimentação Animal" (COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

2 - Métodos

2.1 - Purificação dos parasitas

Os parasitas 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 2 volumes de PBS estéril, 2 volumes de exsudato peritoneal era aplicado, seguido de lavagem com PBS estéril. As frações recolhidas eram reunidas e centrifugadas a 800 g por 10 min a 4° C. 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 eram desprezadas.

2.2 – Cultivo de tecidos

As células LLC-MK2 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DME] (SIGMA[®]) suplementado com 0,35 g/l de L-Glutamina e 29,3 ml de NaHCO₃ (solução 7,5 %), tamponado com N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-ethane-sulfonic acid(HEPES), com 10% de soro fetal bovino, sem a adição de antibiótico, em garrafas plásticas descartáveis. A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ em ar.

Fibroblastos humanos normais foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA[®]), com 10% de soro fetal bovino, sem adição de antibióticos em garrafas plásticas descartáveis. A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ em ar.

2.3 - Irradiação

Os parasitas foram mantidos em banho-de-gelo, e então submetidos a irradiação, pela exposição a raios γ de uma fonte de ^{60}Co (GAMMACELL, Atomic Energy of Canada, Ltd. ou na Fonte de Cobalto Panorâmica) a taxas de dose em torno de 370 Gy, durante aproximadamente 30 minutos, de forma homogênea, em presença de oxigênio e à temperatura ambiente. As doses de radiação estão especificadas ao longo do texto.

O grupo controle permaneceu na parte externa da bomba durante todo o tempo de irradiação, para avaliação das condições ambientais.

2.4 – 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 ($\cong 5\mu\text{l}$), antes da inoculação com parasitas irradiados, e a períodos posteriores ao processo. Todas as amostras foram estocadas secas a -20°C . Antes do uso, o soro foi extraído com 100 μl de PBS sobre o papel por 18 horas a 4°C . O eluato do papel foi considerado uma diluição 1/100 e mantido congelado para uso nos ensaios.

2.5 - Microscopia óptica

Cerca de 10 μl de parasitas irradiados ou não irradiados, purificados são colocados em lâmina, a seguir é realizado esfregaço. O material seco era fixado com metanol absoluto durante 15 minutos, sendo a seguir corado com corante de GIEMSA (1/20) em solução tamponada com Tris/HCl pH 7,2 por 15 minutos. A lâmina era então lavada em água corrente, seca ao ar e observada em microscópio Olympus, sob imersão. Campos representativos eram documentados por fotomicrografia em microscópio Zeiss Axiophot, com ótica planaapocromática, com reprodução computadorizada da imagem em Scanner Genius de alta resolução (600 dpi).

2.6 - Microscopia eletrônica

Uma suspensão de parasitas contendo pelo menos 10^7 parasitas foi centrifugada a 10000 rpm (8000g) por 1 minuto em tubos cônicos de 1,5 ml em microcentrífuga, o sobrenadante desprezado e as amostras suspensas em 1,0 ml de aldeído glutárico a 1,5% com PBS. Após 1 hora em banho-de-gelo, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas misturados em 20 μ l de gelatina 2% diluída em tampão cacodilato de sódio 0,1M e gelificados. A seguir, o material sólido retirado do tubo cônico foi novamente tratado com aldeído glutárico 1,5% + paraformaldeído 1% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,08M pH 7,4 + 2,5% de sacarose por 2 horas a 4°C com agitação de 5 em 5 minutos. As amostras foram contrastadas em Tetróxido de ósmio 1% diluído em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 2 horas e posteriormente lavadas em solução fisiológica e deixadas em Acetato de uranila por 18 hs, sendo então desidratadas e incluídas em resina Araldite. Cortes ultrafinos foram observados em microscópio eletrônico ZEISS EM-10-9 e micrografados.

2.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (EGPA-SDS)

As amostras de *T.gondii* irradiados ou não irradiados foram submetidos a 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 e persulfato de amônio.

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, 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.

As amostras de parasitas foram preparadas de duas formas: íntegros e extrato solúvel pós-sonicação. Os parasitas purificados íntegros foram lavados duas vezes com salina e centrifugados a 1500g por 10 minutos em cada lavagem, diluídos em igual volume de tampão de amostra.

Todas as amostras foram aquecidas a 100°C, sendo aplicadas 10µg de cada amostra por poço e a corrida eletroforética ocorreu na presença de Tris 0.025M-Glicina 0.192M pH 8.3, a 90-110V (20-30 mA) por cerca de duas horas. O sobrenadante era diluído em igual volume de tampão de amostra e fervido a 100°C.

Após a corrida, cada gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%/metanol 45%/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 era então digitalizado em Scanner Genius de alta resolução.

Quadro 1 – Proteínas usadas como referência para EGPA-SDS

| PROTEÍNAS | PESO MOLECULAR (Daltons) |
|------------------------------|---------------------------------|
| Albumina Bovina | 66.000 |
| Ovoalbumina | 45.000 |
| 3-fosfato desidrogenase | 36.000 |
| Anidrase carbônica | 29.000 |
| Tripsinogênio | 24.000 |
| Inibidor de tripsina de soja | 20.100 |
| α-lactalbumina | 14.200 |

2.8 – Preparação de membranas transferidas com antígenos de *T.gondii*, após eletroforese (Western-Blot)

Amostras das proteínas de *T.gondii*, nativas ou irradiadas em diversas condições foram separadas por EGPA-SDS (10%) como descrito acima e transferidas para membranas de nitrocelulose 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 embebidos em tampão de transferência de Towbin (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8,1-8,5). A eletroforese era conduzida a uma amperagem contagem de 1 mA/cm² por 2 horas. Após isso, o gel residual foi corado, como descrito para EGPA-SDS, com a finalidade de verificar a eficiência da transferência. Ocasionalmente, sistema de imersão foi utilizado, em sistema tampão idêntico.

Eventuais sítios de ligação livres foram bloqueados por imersão da membrana de nitrocelulose em solução bloqueadora (Tris,HCl 50mM, NaCl 10mM-BSA 2% pH 7.4) por 18 horas sob agitação a 4°C.

A seguir, a membrana contendo antígeno foi incubada com anticorpo primário em diluição adequada, seguido de várias lavagens em PBS contendo Tween 20 0,02% (PBS-T). Anticorpos ligados foram revelados por incubação com conjugados a peroxidase específicos e em diluições adequadas. Para revelação do conjugado, utilizamos solução cromogênica [DAB. (3'.3 diaminobenzidina) 6mg; H₂O₂ 30%-7,5µl PBS x ml] ou solução de 4-cloro-1-naftol (4-cloro-1-naftol 6mg/metanol 2ml/PBS 10ml/H₂O₂ 30% 10µl) (Towbin, H. & Gordon, J., 1984).

2.9 – Teste de viabilidade dos parasitas

O teste de viabilidade dos parasitas foi realizado por meio de contagem de parasitas corados com Azul de Tripano (0,4%) diluídos em HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) pH 7,2 (Hudson & Hay, 1989). Brevemente, parasitas purificados eram incubados volume a volume na solução acima e incubados por 5-15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, eram colocados em câmaras de Neubauer limpas e o número total de parasitas e o número de parasitas corados eram contados no campo central. Se o numero total de parasitas fosse menor que

1000 no campo central, o outro campo da câmara também era utilizado. A proporção de parasitas corada era estimada em porcentagem.

2.10 - Ensaio de invasão celular por taquizoítos de *T.gondii* irradiados

2.10.1 – Invasividade em células LLC-MK2, com coloração convencional

Para estudo de invasividade, células LLC-MK2 foram cultivadas em dispositivo composto de duas câmaras sobre uma lâmina (Lab-Tek®). Após seu crescimento à subconfluência, câmaras foram desafiadas com 10^6 parasitas não irradiados (grupo controle) ou irradiados a 200 Gy, durante 4 horas. A seguir o meio de cultura foi desprezado, o conjunto lavado com PBS por três vezes, sendo então preenchidas com formaldeído 4% em Tampão fosfato 0,02M pH 7,2 . Após incubação por 1 hora, as câmaras plásticas superiores foram retiradas e a lâmina lavada com PBS, sendo o material fixado com metanol 100% e corado com Giemsa, conforme anteriormente descrito. As células foram observadas cuidadosamente em microscópio Zeiss Axiophot e fotografadas e digitalizadas, como anteriormente descrito.

2.10.2 – Invasividade em fibroblastos humanos normais, com Imunomarcação

Fibroblastos humanos foram cultivados em dispositivos de duas câmaras sobre lâminas (Lab-Tek®). Após o crescimento à subconfluência, câmaras foram desafiadas com 10^6 parasitas normais (grupo controle) ou irradiados a 200 Gy, durante 4 horas. Após este período de tempo, o meio de cultura foi desprezado, as culturas lavadas por 3x com PBS, sendo então preenchidas com formaldeído 4% em Tampão fosfato 0,02M pH 7,2. A seguir, as células foram incubadas com metanol 20% H_2O_2 1% para a inibição da peroxidase endógena com durante 5 minutos. Após três lavagens de 5 minutos com PBS, foi colocado o anticorpo primário (anti-*T.gondii*) diluído em PBS-T 0,05% durante 1 hora. Após 3 lavagens com PBS, foi colocado o conjugado peroxidase (anti-IgG de camundongo produzido em coelho 1/50), que permaneceu em agitação constante durante 1 hora. A câmara plástica da lâmina foi então removida e após lavagens cuidadosas

em água bidestilada, seguidas de incubação em PBS por 5 min., as lâminas foram incubadas com a solução reveladora, DAB (3,3' diaminobenzidina) 0,035% e H₂O₂ 0,018% em PBS, preparada na hora do uso. Quando a coloração marrom começou a aparecer, a reação foi interrompida por lavagem com PBS e as lâminas contracoradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos, passadas em água amoniacal e lavadas em água corrente, sendo reforçada a coloração com Giemsa.

2.11 - Detecção de Fragmentação de DNA

Para a detecção de apoptose após a irradiação, os parasitas foram centrifugados (concentração de 1×10^6 parasitas/ml), a 800g por 5 minutos, ressuspendidos em formaldeído 4% (em TBS) mantidos à temperatura ambiente por cerca de 5 minutos, novamente centrifugados a 800g por 5 minutos e ressuspendidos em etanol 80%. A seguir, 100 µl foram centrifugados a 1500 r.p.m. durante 3 minutos, para a preparação das lâminas. O material foi reidratado em PBS, seguido de permeabilização pela incubação por 5 minutos em 2µg/ml de Proteinase K. Para inativar uma eventual peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em H₂O₂ a 2% por 5 minutos à temperatura ambiente. O material permeabilizado e inativado foi lavado com água bidestilada e mergulhado em tampão TdT (30 mM Tris ph 7,2; 140 mM Cacodilato de Sódio e 1 mM Cloreto de Cobalto); em seguida as lâminas foram lavadas e mergulhadas em solução contendo 0,3 U/µl TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeos); 2 nM 14-dATP biotinilado; 2 nM dCTP; 2 nM dGTP; 2 nM dTTP em tampão TdT por 60 minutos em atmosfera úmida à 37°C.

Posteriormente as lâminas foram incubadas em tampão NaCl 300 mM, Citrato de sódio 30 mM por 15 min., posteriormente lavadas com água bidestilada e cobertas com solução de BSA 2%, novamente lavadas em água bidestilada, incubadas em PBS por 5 min. e em estreptavidina-peroxidase por 30 min., a 37°C. Após lavagens cuidadosas em água bidestilada, seguidas de incubação em PBS por 5 min., as lâminas foram incubadas com a solução reveladora, DAB (3,3' diaminobenzidina) 0,035% e H₂O₂ 0,018% em PBS. As lâminas foram então

lavadas com PBS e coradas com verde de metila, como coloração de fundo. A apoptose foi diferenciada pela presença de coloração nuclear marrom intensa, utilizando linfócitos humanos como padrão.

2.12 - Determinação da infectividade e patogenicidade de taquizoítos da cepa RH de *T.gondii* irradiados

2.12.1 - Ensaio *in vivo*

Após a irradiação (0, 50, 100 e 200 Gy), os parasitas foram contados e diluídos a concentrações de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^{-1} parasitas/ml. Para cada dose de irradiação, foram utilizados 24 camundongos, divididos em 6 grupos de quatro animais, sendo que cada animal recebeu um inóculo de 1 ml de cada uma das concentrações de parasitas irradiados em diferentes doses, conforme descrito acima. O desenvolvimento da infecção foi observado pela mortalidade precoce em 10 dias, seguida de verificação da presença do agente em líquido peritoneal, por microscopia. Animais sobreviventes sofriam lavagens peritonias ocasionais para pesquisa de parasitas livres, sendo sacrificados após 30 dias, quando o cérebro e pulmões eram analisados quanto a presença de cistos através de microscopia óptica de contraste de fase, em preparações lâmina/lâmina (squash).

2.12.2 - Ensaio *in vitro*

Células LLC-MK2 foram semeadas em placas de cultura na concentração de 10^5 células/ml ou 10^4 células/poço. Após o crescimento à confluência, foram desafiadas com uma concentração inicial de 4×10^4 taquizoítos por poço, que a seguir foram diluídos, em câmara estéril, em meio de cultura DME com 2% de soro fetal bovino, sucessivamente (base 5) até 0,0008 parasitas/ml em duplicata, para cada parasita processado. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera saturada com 5% de CO₂. A destruição da monocamada pelo parasitas foi determinada após 5 dias, em microscópio invertido, sendo pesquisada também a presença de taquizoítos extracelulares, para confirmar o agente patogênico.

2.13 – Ensaio da capacidade respiratório utilizando MTT

Para ensaio da atividade respiratória, utilizamos o método da oxidação do MTT (Denizot & Lang, 1986). Os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800 g. O sobrenadante foi desprezado e os parasitas lavados com meio de cultura (RPMI 1640 completo com glutamina e bicarbonato, mas sem vermelho de fenol). A seguir, foram novamente centrifugados e desprezado o sobrenadante. Foi então adicionado o meio RPMI 1640, acrescido de 10% de soro fetal bovino contendo MTT (1mg/ml). A cultura foi realizada em placa de 24 poços com uma concentração de 1×10^7 parasitas/ml. Em intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retiradas 100 μ l da cultura e colocada em placa de 96 poços com igual volume de formaldeído 4% tamponado com tampão de fosfato pH 7,2, 0,02M.

Após o final da última coleta (18 horas) a placa contendo os sobrenadantes foi centrifugada por 10 minutos a 800g, o sobrenadante desprezado e acrescentado 100 μ l de metanol para extração do formazan oxidado formado. A leitura foi realizada em leitor de microplacas com filtro de 570nm.

2.14 – Determinação da atividade de síntese de proteínas

Para a determinação da síntese de proteínas, utilizamos a incorporação de prolina tritiada. Após a irradiação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800g. O sobrenadante foi desprezado e os parasitas colocados em meio de cultura DME, que não contém prolina, acrescido de ^3H -prolina ($3,7 \times 10^8$ Bq /ml), sendo a cultura realizada em placa de 24 poços, com concentração de 3×10^6 parasitas/ml a 37°C com 5% CO_2 .

Nos intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retirados 100 μ l da cultura e colocados em papel de filtro tipo Whatmann 3mm, estes sendo mantidos à temperatura ambiente até estarem completamente secos. Todos os papéis foram colocados em solução de TCA 10% por 1 hora e, posteriormente, em solução de TCA 5% por mais uma hora. Após, mergulhados em etanol, duas vezes, por 30 minutos.

Os papéis de filtro, após totalmente secos, foram colocados em tubos contendo 3ml 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), sendo efetuada a leitura de ^3H por cinco minutos. A radioatividade incorporada foi determinada em β -Cintilador(leitura de ^3H por cinco minutos) e a contagem apresentada em c.p.m(contagens por minuto).

2.15 – Determinação da atividade de síntese de ácidos nucleicos

Após a irradiação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800g e o sobrenadante desprezado. Acrescentou-se meio de cultura com ^3H -hypoxantina ($3,7 \times 10^8 \text{Bq/ml}$), sendo a cultura realizada em placa de 24 poços, com concentração de 3×10^6 parasitas/ml a 37°C com 5% de CO_2 .

Nos intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retirados 100 μl da cultura e colocados em papel filtro, os quais foram mantidos à temperatura ambiente até estarem completamente secos. Todos os papéis foram colocados em solução de TCA 10% por 1 hora e, posteriormente, em solução de TCA 5% por mais 1 hora. Após, foram mergulhados em etanol 100%, duas vezes, por 30 minutos.

Os papéis de filtro, estando totalmente secos, foram colocados em tubos contendo 3ml de líquido de cintilação, sendo efetuada a leitura de ^3H por cinco minutos. A radioatividade incorporada foi determinada em β -Cintilador e a contagem apresentada em c.p.m.

2.16 – Determinação da atividade de síntese de DNA

Após a irradiação, os parasitas foram centrifugados por 10 minutos a 800g e o sobrenadante desprezado. Acrescentou-se meio de cultura com ^3H -timidina ($10\mu\text{Ci/ml}$), sendo a cultura realizada em placa de 24 poços, com concentração de 3×10^6 parasitas/ml a 37°C com 5% de CO_2 .

Nos intervalos de tempo (0, 1, 2, 4 e 18 horas) foram retirados 100 μ l da cultura e colocados em papel filtro, os quais foram mantidos à temperatura ambiente até estarem completamente secos. Todos os papéis foram colocados em solução de TCA 10% por 1 hora e, posteriormente, em solução de TCA 5% por mais uma hora. Em seguida, mergulhados em etanol 100%, duas vezes, por 30 minutos.

Os papéis de filtro, após totalmente secos, foram colocados em tubos contendo 3ml de líquido de cintilação, sendo efetuada a leitura de ^3H por cinco minutos. A radioatividade incorporada foi determinada em β -Cintilador e a contagem apresentada em c.p.m

2.17 - Imunofluorescência Indireta (IFI)

2.17.1 - Antígenos

Os parasitas coletados do peritônio dos camundongos foram centrifugados a 800g 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 37°C por 12 horas. A seguir, o material foi novamente centrifugado a 800g, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em PBS contendo 1% gelatina, para uma concentração de 10^6 parasitas/ml. Em lâminas escrupulosamente limpas, era adicionado 10 μ l(10000 parasitas) do preparado em cada orifício da lâmina de imunofluorescência. Após secagem cuidadosa, as lâminas eram envoltas em papel alumínio, colocadas em caixa selada e mantidas a -20° C até o momento do uso.

2.17.2 - 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), como citado o eluato do papel foi considerado uma diluição 1/20.

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 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 antiFade (Glicerol-PBS 9:1 contendo 1 mg/ml de p-fenilenodiamina) sob lamínula para observação. A observação era feita em microscópio de epifluorescência com lampada de mercurio de 100 V, com sistema de filtros para fluoresceína, sendo considerada positiva a diluição onde 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 como a maior diluição de soro com reação positiva.

2.18 - Técnica imunoenzimática (ELISA)

2.18.1 - Antígeno

Para o preparo do extrato salino (antígeno), as suspensões de parasitas foram submetidas a sonicação (Sonic Dismembrator, Quigley-Rochester Inc., USA), a 40 ciclos por 5 - 10 períodos de 30 segundos, em banho de gelo, até a lise completa dos agentes, por microscopia óptica de contraste de fase. Após a lise, acrescentou-se 1 volume de NaCl 0,3M para isotonzar a suspensão. Esta suspensão era mantida por 4 horas a 4°C e a seguir centrifugada a 10.000 G por 30 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5403 (Mineo, 1982). A proteína total do extrato salino foi determinada pelo método de Bradford, utilizando gama-globulina humana como padrão (Bradford, 1976)

2.18.2 - Descrição da Reação Imunoenzimática.

As placas foram sensibilizadas com 50 µl de antígeno na concentração de 10µg/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 (PBST) + leite desnatado 2%(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, 30 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, conjugado à peroxidase(30 µl/cavidade), na diluição 1/100 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 (orto-fenilenodiamina 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 densidade óptica (D.O) foi obtida por leitura a 492 nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

2.19 – Determinação da imunogenicidade de taquizoítos de *T.gondii* irradiados em diferentes linhagens de camundongos (Balb C, Swiss e C57Bl/6j)

Grupos de camundongos foram imunizados com taquizoítos irradiados a 200 Gy, na concentração de 10⁷ parasitas por animal. Para verificar diferenças de resposta imune a este antígeno, as diferentes linhagens foram submetidas a igual processo, sendo os grupos divididos da seguinte maneira: controle 05 camundongos C57Bl/6j, Balb C 05 camundongos, Swiss 05 camundongos e C57Bl/6j 10 camundongos.

Antes do inóculo, sangue caudal de todos os animais foi coletado em papel de filtro como controle e a seguir esta coleta foi processada semanalmente. A

determinação da presença de anticorpos e seus respectivos títulos foram determinados por IFI e ELISA.

2.20 – Imunogenicidade entre taquizoítos irradiados e outros tratamentos

Para comparação da imunogenicidade dos taquizoítos submetemos os mesmos a diferentes esquemas de tratamento antes da imunização.

Parasitas irradiados: após a irradiação (200 Gy), os parasitas foram inoculados em grupos de camundongos C57Bl/ 6J; com 1ml de salina contendo 10^7 parasitas irradiados. Para controle, animais eram inoculados com a mesma fração não irradiada, para determinação da virulência do agente antes da irradiação. Ocasionalmente, doses subsequentes foram administradas em intervalos de 1 mês.

Parasitas formolizados: parasitas de exsudato peritoneal de camundongos foram purificados, contados em câmara de Neubauer e diluídos a concentração de 10^7 parasitas/ml em uma solução de PBS com formol a 2%, incubados por 1 hora a 37° C e inoculados em camundongos SWISS.

Parasitas viáveis em animais tratados: os parasitas de exsudato peritoneal de camundongos foram purificados, contados em câmara de Neubauer, diluídos a concentração de 10^7 parasitas/ml e inoculados em camundongos SWISS. Os animais receberam por via oral uma solução de Sulfadiazina (100 mg/Kg) e Pirimetamina (5 mg/Kg), após 18 horas do inóculo, o que foi repetido durante o período de 4 dias em intervalos de 24 horas.

2.21 - Reconhecimento das proteínas de *T.gondii* por anticorpos em soros de camundongos inoculados com parasitas irradiados, formolizados e não irradiados (tratados)

As amostras das proteínas de *T.gondii* foram separadas por EGPA-SDS (12,5% gel de corrida) e transferidas para membrana de nitrocelulose conforme acima descrito com tampão de transferência de Towbin (25mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol). A transferência foi realizada em aparelho de transferência

semi-seco Trans-Blot RD (BIO-RAD®) a uma voltagem constante de 10V durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o gel foi corado, como descrito para EGPA-SDS com a finalidade de verificar a eficiência da transferência.

As tiras contendo o antígeno foram bloqueadas com BSA 2,5% + PBS-T (0,5%) durante 1 hora sob agitação constante. A lavagem foi realizada logo em seguida com PBS-T (3 vezes de 5 minutos) e incubadas "overnight" com soros de camundongos inoculados com taquizoítos de *T.gondii* processados de diferentes formas, previamente positivos à reação de ELISA. Por fim, as tiras foram lavadas novamente com PBS-T e incubadas com conjugado peroxidase (anti-IgG de camundongo produzido em coelho 1/50) durante 1 hora. Nova lavagem foi feita e a revelação se deu pela adição de uma solução de 4-cloro-1-naftol 0,6 mg/ml e H₂O₂ 0,03% em PBS. A reação foi interrompida por lavagens repetidas da membrana com água destilada.

2.22 – Ensaio de proteção induzido por taquizoítos irradiados

Camundongos previamente imunizados com uma ou duas doses de 10⁷ taquizoítos irradiados com 200 Gy, foram desafiados após 30 ou 60 dias com 10³ taquizoítos viáveis, conforme mostra o Quadro 2. O tempo de sobrevida dos animais foi acompanhado diariamente, a sobrevida foi analisada em cada grupo pela média de dias de sobrevida por grupo. Grupo desafiados com taquizoítos irradiados foram reunidos para permitir uma melhor identificação do tempo de sobrevida, com análise não paramétrica de Mann – Whitney.

Quadro 2 – Esquema de imunização prévia fornecida a 05 grupos de camundongos C57Bl/6j.

| Grupo | Nº animais | Inóculo |
|-------|------------|---|
| 01 | 03 | Grupo controle, não recebeu nenhum inóculo prévio. |
| 02 | 05 | 10 ⁷ parasitas irradiados (200 Gy), 60 dias antes do desafio. |
| 03 | 05 | 10 ⁷ parasitas irradiados (200 Gy), 60 e 30 dias antes do desafio. |
| 04 | 05 | 10 ⁶ parasitas irradiados a 200 Gy, 30 dias antes do desafio. |
| 05 | 05 | 10 ⁶ parasitas irradiados a 200 Gy, 30 dias antes do desafio (os parasitas foram irradiados e permaneceram sob refrigeração 18 horas). |

V – RESULTADOS

I – Estudos morfológicos

1.1 – Avaliação morfológica convencional.

Após irradiação com as várias doses estudadas, os taquizoítos foram corados pelo método de Giemsa e fotografados, como vistos na Figura 3. Como pode ser observado, a irradiação não induziu nenhuma alteração significativa na morfologia dos parasitas, a este nível de observação.

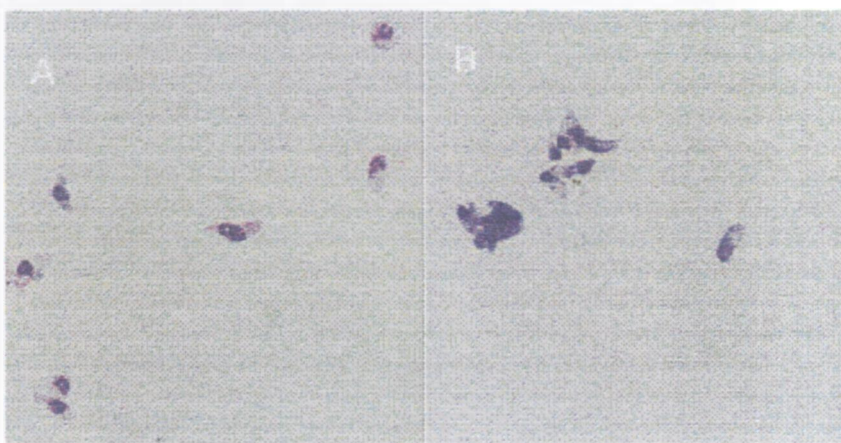


Figura 3 – Reprografia computadorizada de taquizoítos de *T.gondii*, corados com Giemsa, não se observa diferença entre os parasitas irradiados e não irradiados. Aumento 100X. **A** – Taquizoítos irradiados 200 Gy. **B** – Taquizoítos não irradiados.

1.2 - Avaliação ultra-estrutural do *T.gondii* irradiado

Para estudos morfológicos ultraestruturais utilizamos preparações de taquizoítos irradiados a 200 Gy, através de microscopia eletrônica como descrito em Métodos.

Na Figura 4, mostramos uma micrografia eletrônica de um taquizoíto representativo, obtido após irradiação com 200 Gy. Neste, as estruturas sub - celulares estão conservadas. Podemos observar núcleo, complexo de Golgi e membrana trilamelar com boa preservação estrutural.

As estruturas típicas, complexo apical, com conóide, roptrias e micronema, mostravam excelente integridade. Além disso, apicoplastos intactos foram identificados em seu citoplasma.

A membrana trilamelar manteve sua camada externa mostrando o agente adequado para a invasão e restos de digestão podiam ser identificados no polo oposto ao complexo Apical. Próximo a membrana, uma estrutura semelhante ao citostoma podia ser identificada.

Estes dados de conservação estrutural mostraram que a radiação não afetou a estrutura do agente no tempo estudado.

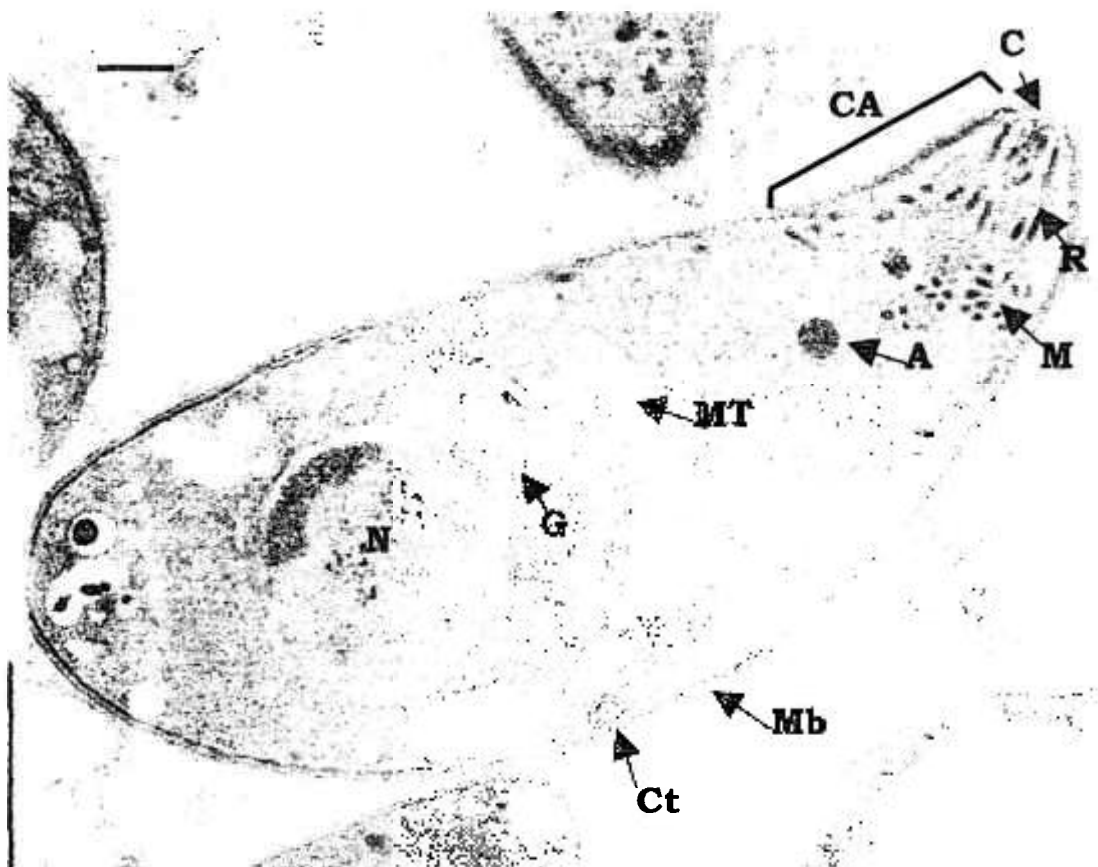


Figura 4 - Micrografia eletrônica de um taquizoíto de *T.gondii* irradiado com 200 Gy. Pode-se observar a manutenção da morfologia das organelas e estruturas internas; (**N**) núcleo, (**G**) complexo de Golgi, (**MT**) mitocôndrias, (**Mb**) membrana trilamelar, (**CA**) complexo Apical, (**C**) conóide, (**R**) roptrias, (**M**) micronemas, (**A**) apicoplasto, (**Ct**) citostoma(?). A barra representa 1µm.

2 – Análise eletroforética e de antigenicidade

2.1 – Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (EGPA-SDS)

As proteínas de taquizoítos de *T.gondii* foram analisadas por EGPA-SDS, com gel de resolução de 10%, conforme descrito em Métodos. A amostra foi preparada a partir de 10^6 formas, purificados de exsudato peritonial, obtidos pré e pós irradiação, conforme pode ser visto na Figura 5. Parte da preparação foi estudada diretamente por dissolução no tampão de amostra da eletroforese, enquanto outra foi sonicada e clareada por centrifugação, representando proteínas solúveis em meio salino. Os achados foram semelhantes entre as amostras normais e irradiadas, não se observando qualquer alteração das bandas características ou mesmo a formação de agregados de alto peso molecular.

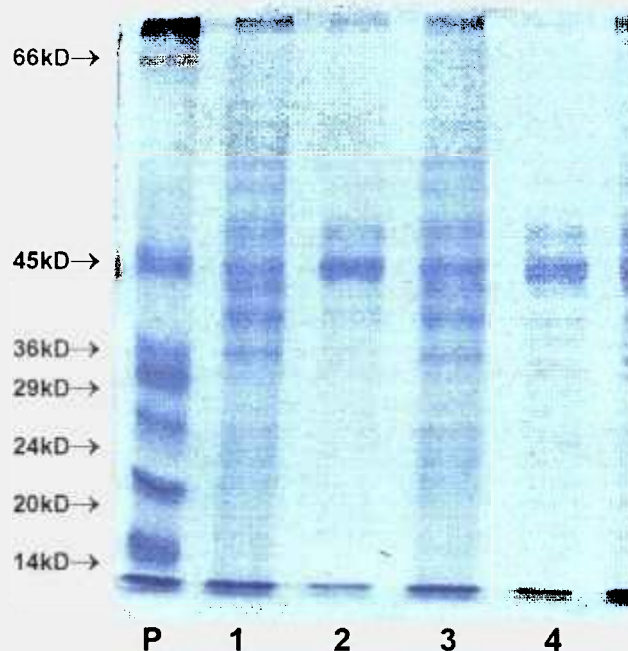


Figura 5 - Padrão eletroforético de taquizoítos de *T.gondii* controles (total e extrato salino) e submetidos a irradiação gama (^{60}Co)(total e extrato salino) na dose de 200 Gy.

Amostras de *T.gondii* (Cepa RH) e seus respectivos tratamentos: **P** - Padrão de proteínas para comparação de peso molecular(MW); **1** - RH controle(total); **2** - RH controle(extrato salino); **3** - RH irradiado 200 Gy (total) e **4** - RH irradiado 200 Gy(extrato salino).

2.2 – Reconhecimento das proteínas do *T.gondii* por anticorpos específicos (Western blot)

Para avaliar a manutenção da antigenicidade das proteínas de taquizoítos de *T.gondii* após irradiação de 200 Gy, procedemos a EGPA-SDS de taquizoítos totais e extratos salinos de duas cepas, uma amplamente utilizada no ensaio, a cepa RH e outra, recentemente isolada de feto humano infectado, a IMT-96. A eletroforese foi seguida de transferência e revelação das bandas, com anticorpos específicos anti-*T.gondii*, produzidos em coelho, por meio de Western blot (Figura 6). Novamente, foi observada a manutenção da antigenicidade após a irradiação, sem diferença significativa no reconhecimento dos antígenos por soro de coelhos hiperimunes independente da cepa de *T.gondii* utilizada (RH ou IMT96), mostrando que as frações antigênicas da cepa de uso eram semelhantes também às de cepas recentemente isoladas.

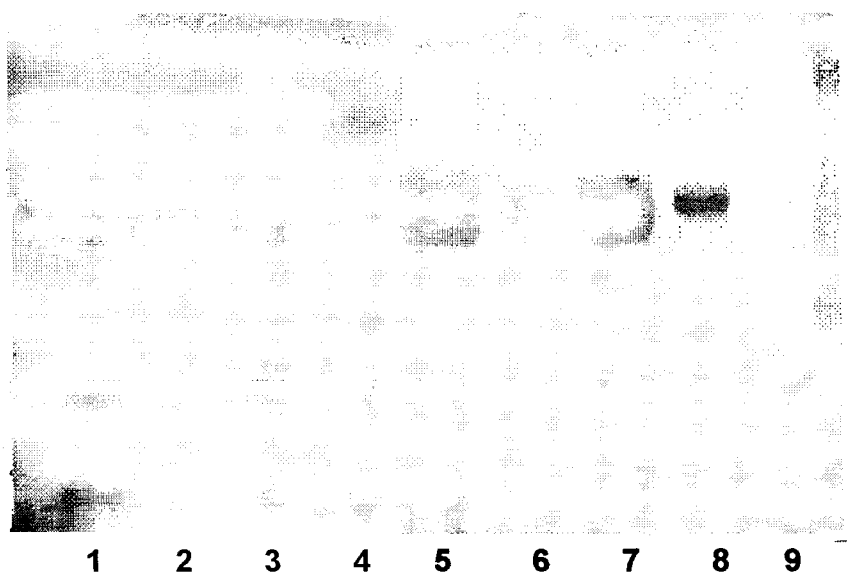


Figura 6 - Western Blot de antígenos de *T.gondii* submetidos a radiação gama (^{60}Co), ensaiados frente a soro de coelho imunizado contra taquizoítos *T. gondii* não irradiados (cepa RH):

Amostras de *T. gondii* (Cepas RH e IMT) e seus respectivos tratamentos:

- | | |
|------------------------------------|--|
| 1 - RH controle (total) | 5 - IMT-96 controle (total) |
| 2 - RH controle (e.salino) | 6 - IMT-96 controle (e.salino) |
| 3 - RH irradiado 200 Gy (total) | 7 - IMT-96 irradiado 200 Gy (total) |
| 4 - RH irradiado 200 Gy (e.salino) | 8 - IMT-96 irradiado 200 Gy (e.salino) |
| | 9 - Padrão de peso molecular |

3 – Estudos fisiológicos

3.1 – Viabilidade, por afinidade tintorial

A viabilidade dos taquizoítos foi acompanhada durante o processo de irradiação em todos os ensaios realizados, por meio da afinidade tintorial pelo Azul de Tripiano, dos taquizoítos mortos conforme descrito em Métodos. Assim nas doses de 50, 100 e 200 Gy analisadas, a proporção celular corada (morta) foi sempre inferior a 5%. Em cada preparação pelo menos 1000 taquizoítos eram analisados. Como controle da coloração taquizoítos formolizados exibiam sempre 100% de células coradas e mortas. Esta viabilidade não foi afetada quando da manutenção em banho de gelo ou conservação em geladeira por até 72 horas, nem durante o processo de irradiação.

3.2 – Invasividade celular

Para ensaio da invasividade optamos por duas abordagens, uma utilizando apenas colorações usuais e outra usando imunomarcação com anticorpos específicos contra *T.gondii*, utilizando linhagens celulares estabelecidas (LLC-MK2) e células humanas diplóides normais, fibroblastos.

3.2.1 – Invasividade em células LLC-MK2, com colorações convencionais.

Culturas celulares contendo monocamada de células LLC-MK2 na subconfluência, cultivadas como em Métodos, foram desafiadas com taquizoítos normais ou irradiados com 50, 100 e 200 Gy, na proporção de 10 taquizoítos por célula, incubados por 4 horas, fixados com metanol e observados em microscópio óptico (Modelo Axiophot, marca Zeiss, Alemanha).

Na Figura 7, observamos a reprodução computadorizada de fotos de culturas celulares, 4 horas após o desafio acima descrito. Identificamos células contendo o agente e, na Figura 7A, vemos os taquizoítos não irradiados no interior das células, mostrando a invasão de células. O processo de entrada parece ser regido por adesão, orientação e penetração, identificáveis pela posição

do agente em relação a membrana da célula hospedeira. Formas podiam ser identificadas no interior do citoplasma, mostrando a integridade do parasita.

Quando formas irradiadas eram analisadas, os mesmos processos de invasão podiam ser facilmente identificáveis, em todas as doses de radiação testadas, sendo que apresentamos na Figura 7B os resultados dos taquizoítos irradiados com 200 Gy, mostrando um comportamento semelhante aos controlés não irradiados e a integridade do sistema de invasão após irradiação.

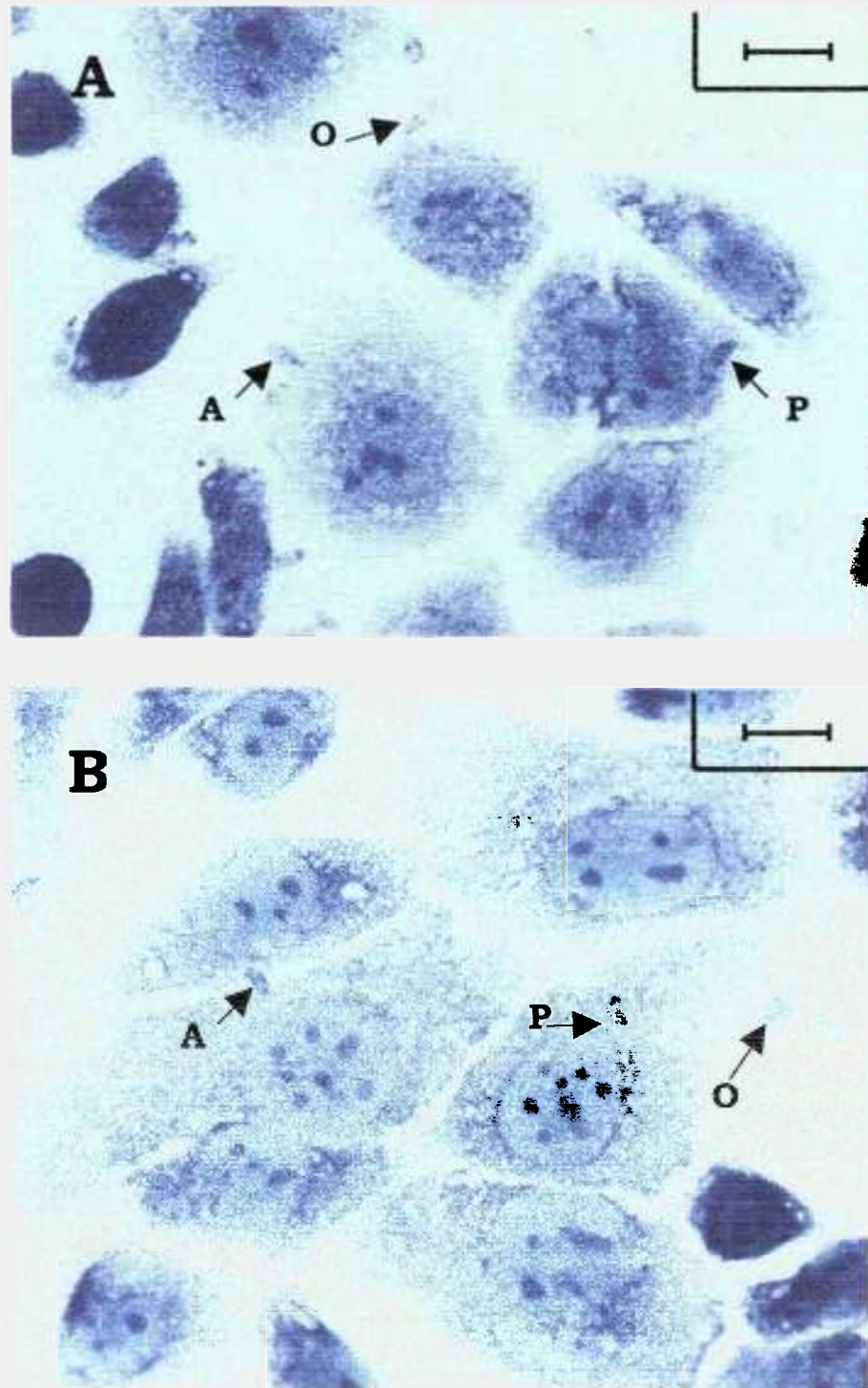


Figura 7 – Reprografia computadorizada de células LLC-MK2 desafiadas com taquizoítos de *T.gondii* durante 4 horas, coradas com GIEMSA. A barra representa 16µm. **A** – Taquizoítos de *T.gondii* não irradiados. Podem ser observados parasitas durante todos os processos de invasão celular: (**A**) adesão, (**O**) orientação e (**P**) penetração. **B** – Taquizoítos de *T.gondii* irradiados a 200 Gy. Podem ser observados parasitas durante todos os processos de invasão celular: (**A**) adesão, (**O**) orientação e (**P**) penetração.

3.2.2 – Invasividade em fibroblastos humanos normais, com imunomarcção.

Para avaliar a inespecificidade de penetração em hospedeiros e afastar a possibilidade de fagocitose mediada pela célula hospedeira, também analisamos a invasividade dos taquizoítos irradiados em outro tipo celular não fagocítico. Fibroblastos humanos normais foram desafiados de maneira semelhante ao anterior e os resultados podem ser vistos na Figura 8. Novamente a monocamada subconfluyente foi desafiada com 10 taquizoítos irradiados ou não por célula, incubados por 4hs, fixados por formaldeído e corados por imunomarcção conforme descrito em Métodos.

Na Figura 8A pode-se observar taquizoítos promovendo uma grande invasão do fibroblasto humano, com vacúolo parasitóforo evidente e coloração marrom envolvendo sua superfície, impedindo a visualização das estruturas internas. Novamente, puderam ser identificadas formas nos três estágios da invasão pelo *T.gondii*. O espaço vacuolar era evidente, sugerindo a penetração ativa do agente. Na Figura 8B, em preparação semelhante, com taquizoítos irradiados com 200 Gy, os achados foram semelhantes. Não houve marcação no citoplasma da célula hospedeira, que poderia sugerir a degradação do antígeno, embora algumas formas intracelulares mostrassem degeneração morfológica como condensação e retração citoplásmica. As doses menores de radiação mostram resultados semelhantes aos apresentados na Figura 7B.

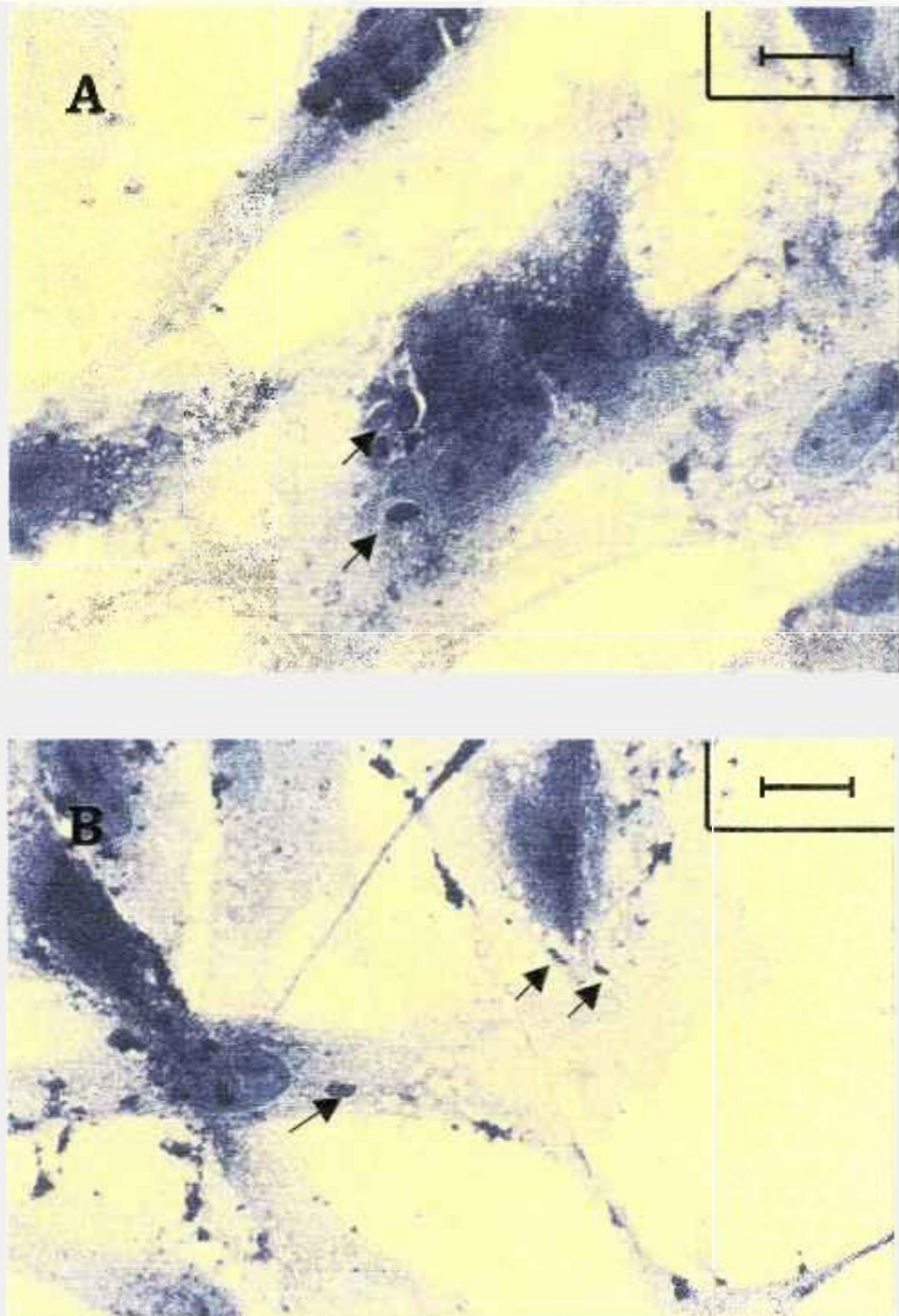


Figura 8 – Reprografia computadorizada de fibroblasto humano normal desafiado agudamente com taquizoítos de *T.gondii*, durante 4 horas e preparadas pela técnica de Imunomarcção. A barra representa 16 μ m. **A** - Taquizoítos de *T.gondii* não irradiados. Podem ser observados parasitas interiorizados nas células, dentro do vacúolo parasitóforo, dispersos no citoplasma (\rightarrow). **B** - Taquizoítos de *T.gondii* irradiados a 200 Gy. Podem ser observados parasitas degenerados interiorizados nas células, dentro do vacúolo parasitóforo, dispersos no citoplasma (\rightarrow).

3.3 – Detecção de fragmentação de DNA radioinduzida por endonucleases, tipo apoptose.

Para avaliar a possibilidade de morte apoptótica, taquizoítos de *T.gondii* foram processados para a detecção de fragmentação nuclear pela técnica de adição de nucleotídeos marcada por transferase terminal conforme descrito em Métodos. Brevemente, 10^6 taquizoítos irradiados ou não foram incubados na presença de terminal transferase e precursores, com identificação da incorporação com avidina peroxidase.

Antes do ensaio, parasitas não processados foram ensaiados para detecção da peroxidase endógena e para controle de sua eventual inativação pelo sistema H_2O_2 -metanol. Após o ensaio ter demonstrado ausência de marcação, novas lâminas foram processadas integralmente com subsequente documentação fotográfica.

Como pode ser observado na Figura 9A parasitas controle não apresentavam marcação nuclear significativa, apenas com o fundo de contra-coloração.

Encontro semelhante foi observado com taquizoítos irradiados a 50, 100 e 200 Gy (Figura 9B), onde a ausência de marcação mostrou que o processo apoptótico radioinduzido não ocorreu neste parasita.

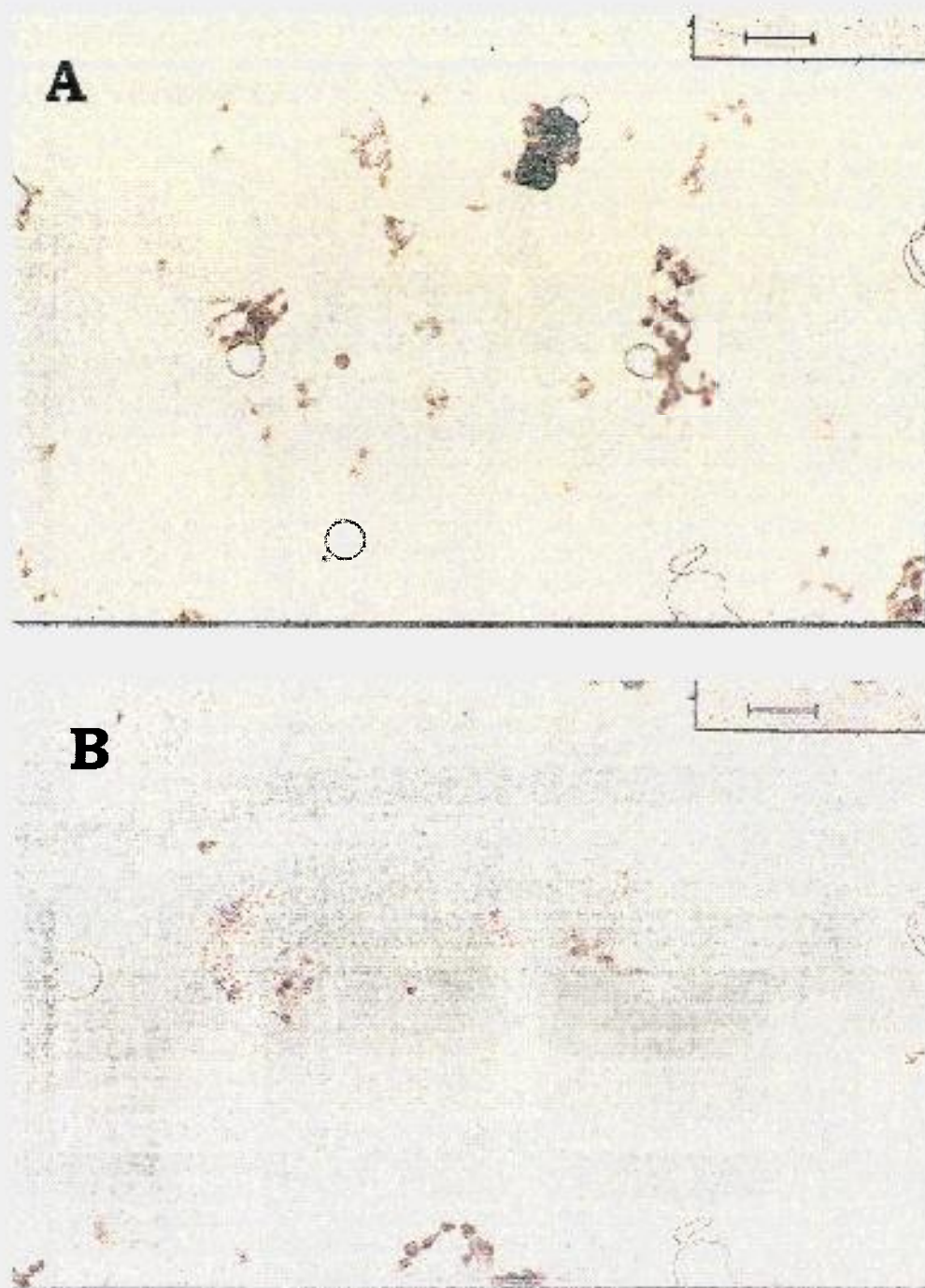


Figura 9 - Reprografia computadorizada de taquizoítos de *T.gondii* utilizados para a detecção de fragmentação de DNA radio-induzida. Em **A**, controle de parasitas não irradiados. Em **B**, os parasitas foram irradiados com 200 Gy. Podemos verificar nesses, a ausência de marcação nuclear, o que indica ausência de processos apoptóticos. As barras representam 16 μm .

4 – Determinação da infectividade e patogenicidade de taquizoítos da cepa RH de *T.gondii* irradiados.

Para avaliar o crescimento dos taquizoítos de *T.gondii* irradiados ou não, utilizamos duas abordagens, uma *in vitro* em culturas com células LLC-MK2 e outra *in vivo* pela infecção de camundongos C57Bl/6j.

4.1 - Ensaio *in vivo*

No ensaio da infecção e crescimento *in vivo*, infectamos camundongos machos C57Bl/6j com quantidades progressivas (10 a 10^7 parasitas por animal), de taquizoítos de *T.gondii* normais e irradiados com doses progressivas, cujos dados consolidados são mostrados na Tabela 1. Após 7 dias, todos os camundongos que receberam parasitas não irradiados a uma concentração maior que 10^2 morreram. No entanto, nos inóculos de 10^2 ou 10^1 parasitas não irradiados, os animais permaneceram vivos, sem evidências clínicas da doença, não sendo detectados taquizoítos em seu exsudato peritoneal.

Quando parasitas irradiados 50, 100 e 200 Gy foram injetados nos camundongos C57Bl/6j, na concentração de 10^7 parasitas por animal, todos os camundongos permanecem vivos, semelhante ao grupo que recebeu baixas concentrações de parasitas não irradiados. Não foram localizados taquizoítos no exsudato peritoneal e nem cistos nos órgãos dos animais, mostrando que os parasitas irradiados não se desenvolveram em formas de resistência tecidual.

Tabela 1 – Sobrevivência após 07 dias de camundongos inoculados com taquizoítos de *T.gondii*, cepa RH, irradiados com diferentes doses.

| Desafio | Taquizoítos normais | Taquizoítos irradiados | | |
|-----------------|---------------------|------------------------|--------|--------|
| | | 50 Gy | 100 Gy | 200 Gy |
| 10 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 100 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 10 ³ | 0 | 100% | 100% | 100% |
| 10 ⁴ | 0 | 100% | 100% | 100% |
| 10 ⁵ | 0 | 100% | 100% | 100% |
| 10 ⁶ | 0 | 100% | 100% | 100% |
| 10 ⁷ | 0 | 100% | 100% | 100% |

4.2 - Ensaio *in vitro*

Para ensaio da infecção e crescimento *in vitro*, desafiamos células LLC-MK2 à confluência com doses progressivas, 10 até 10⁶ parasitas por poço, de taquizoítos de *T.gondii* normais ou irradiados com doses progressivas de radiação. Após 7 dias de cultivo, a camada celular era observada para verificação de áreas de destruição. Os resultados mostraram que os parasitas não irradiados foram capazes de destruir a monocamada celular até a dose de 10 parasitas por poço, evidenciando efeito citopático característico.

Quando amostras irradiadas foram testadas, em placas de cultura, um efeito dose-resposta foi observado, com poucos parasitas irradiados a 50 Gy sobrevivendo, e raros a 100 Gy. A quantificação do processo foi complexa, mas uma abordagem estimativa mostrou que amostras irradiadas com 50 Gy apresentavam uma população reprodutiva ao redor de 0.1% e com 100 Gy, ao redor de 0.001%, mas os intervalos de confiança foram muito altos. A 200 Gy, os parasitas não apresentaram capacidade reprodutiva, permitindo uma estimativa de sobrevivência menor que 0.0001%.

5 – Ensaio metabólicos dos taquizoítos de *T.gondii* submetidos a radiação

Para analisar alterações no metabolismo dos taquizoítos de *T.gondii* causados pela radiação ionizante, realizamos ensaio para detectar alterações na sua capacidade respiratória utilizando MTT, e na síntese de proteínas, ácidos nucléicos totais e DNA, por meio de precursores radioativos.

5.1 – Determinação da capacidade respiratória

Nos ensaios para verificar alterações na capacidade oxidativa, os taquizoítos de *T.gondii*, irradiados ou não foram cultivados em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol com MTT, em placa de 24 poços, a concentração de 10^7 parasitas/ml, durante 18 horas como descrito em Métodos. Na Figura 10, podemos verificar que os parasitas não irradiados apresentam um aumento da incorporação de MTT com o decorrer do tempo.

Quando analisamos os resultados dos ensaios realizados com parasitas irradiados com doses de 20, 100 e 200 Gy, verificamos que ocorre aumento da incorporação de MTT com o decorrer do tempo, de maneira semelhante ao grupo não irradiado.

Estes dados comprovam que a radiação não afetou a capacidade respiratória dos parasitas.

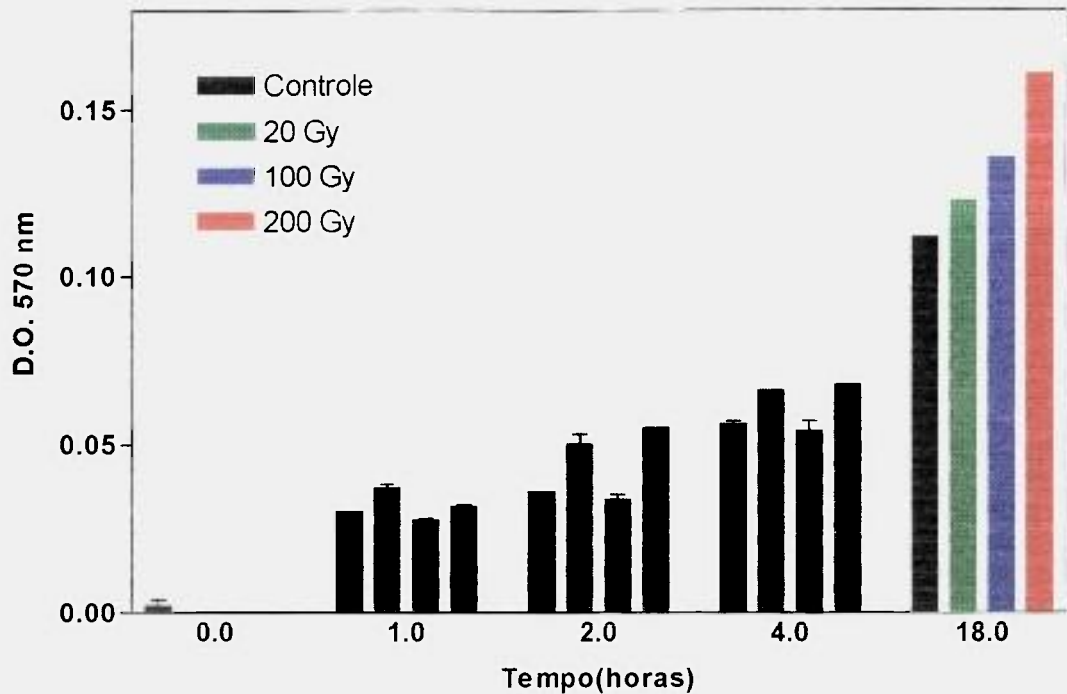


Figura 10 – Oxidação do MTT (“burst” respiratório) por taquizoítos de *T.gondii* controles e irradiados a 20, 100 e 200 Gy.

5.2 – Determinação da síntese protéica

Nos ensaios para verificar alterações na síntese protéica, os taquizoítos de *T.gondii*, irradiados ou não, foram cultivados em meio DME com prolina marcada, em placa de 24 poços a uma concentração de 3×10^6 parasitas/ml, durante 18 horas. Na Figura 11, mostramos que nos parasitas não irradiados ocorre aumento na incorporação de prolina, principalmente após 18 horas de cultivo.

Nos taquizoítos irradiados com 20, 100 e 200 Gy, houve aumento da incorporação de prolina semelhante ao grupo controle. Estes dados demonstram que, mesmo após a irradiação, os parasitas mantêm normalmente a síntese de suas proteínas.

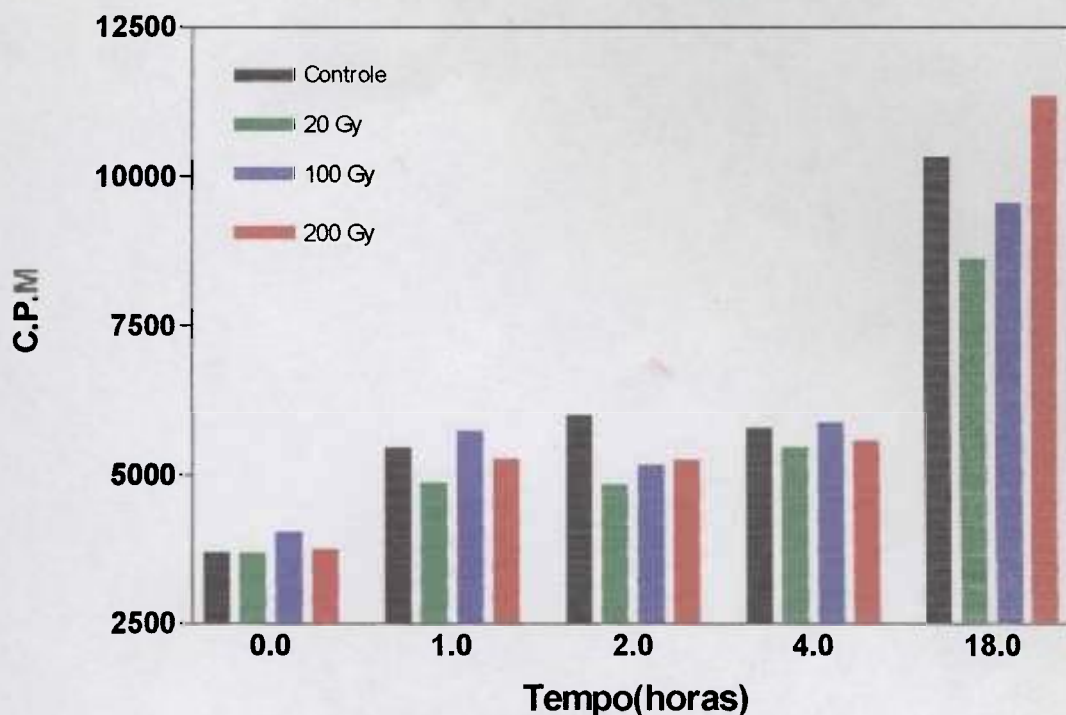


Figura 11 - Incorporação de prolina tritiada por taquizoítos de *T.gondii* controles e irradiados a 20, 100 e 200 Gy.

5.3 – Determinação da síntese de ácidos nucleicos

Para verificar possíveis alterações na síntese de ácidos nucleicos totais, tanto RNA como DNA, os taquizoítos de *T.gondii*, irradiados ou não, foram cultivados em meio DME com hipoxantina tritiada, em placa de 24 poços a uma concentração de 3×10^6 parasitas/ml, durante 18 horas.

Como pode ser observado na Figura 12, os parasitas não irradiados, após 1 hora, apresentam aumento na incorporação de hipoxantina, que permanece razoavelmente estável até 4 horas, aumentando no período de 18 horas. Nos parasitas irradiados com 20, 100 e 200 Gy, a incorporação apresentou um aumento, durante o período de ensaio, semelhante ao grupo não irradiado, atingindo o maior valor após 18 horas de exposição, sugerindo a manutenção da síntese, essencialmente de ácidos nucleicos após a irradiação.

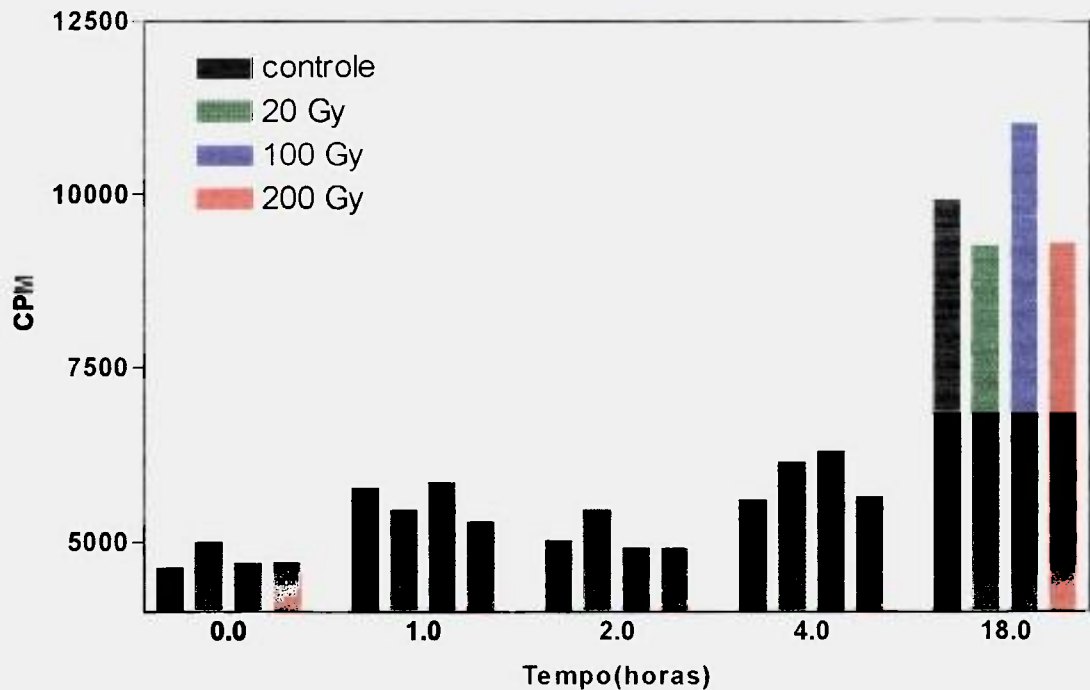


Figura 12 - Incorporação de hipoxantina tritiada por taquizoítos de *T. gondii* controles e irradiados a 20, 100 e 200 Gy.

5.4 – Determinação da síntese de DNA

Para elucidar a síntese de ácidos nucleicos observada com o uso do precursor hipoxantina, procedemos a ensaio semelhante ao anteriormente realizado, utilizando um precursor mais específico, a timidina tritiada, incorporada somente em DNA. Os dados da incorporação realizada conforme descrito em Métodos podem ser vistos na Figura 13, onde observa-se que ambas as formas do agente utilizadas, irradiada ou não, apresentaram níveis baixos de incorporação do precursor.

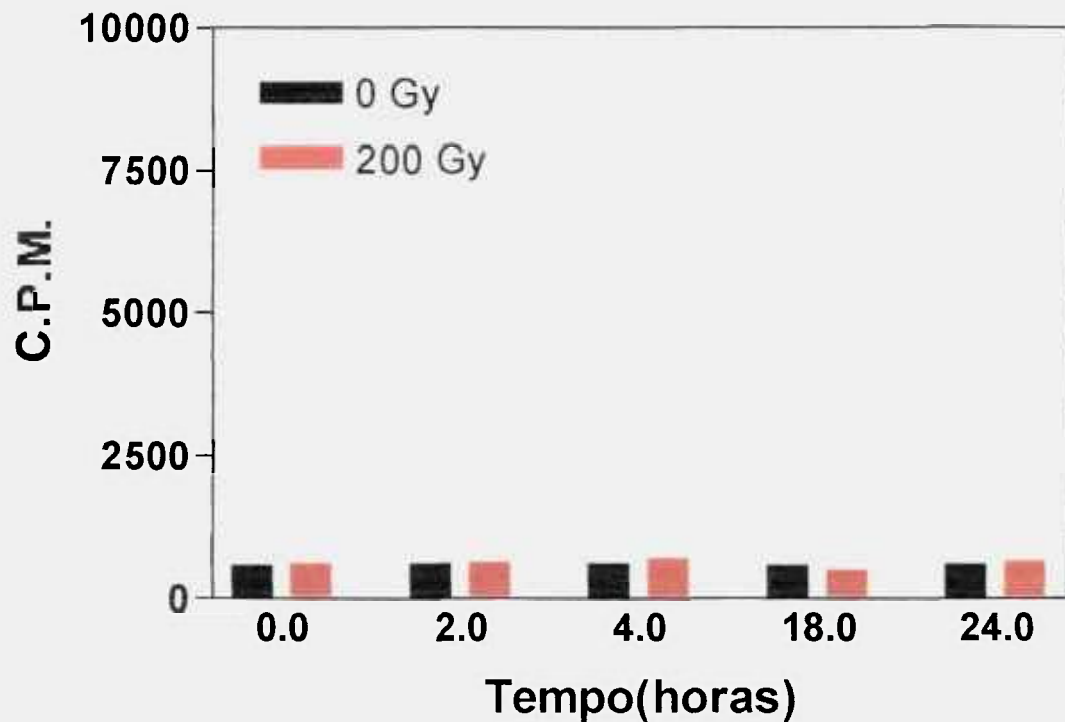


Figura 13 – Incorporação de timidina tritiada por taquizoítos de *T.gondii* irradiados ou não, por até 24 hs, sem invasão celular.

6 – Determinação da imunogenicidade de taquizoítos de *T.gondii* irradiados em diferentes linhagens de camundongos (Balb C, Swiss e C57Bl/6j)

Para analisar a resposta imune humoral causada por taquizoítos de *T.gondii* irradiados, desafiamos grupos de camundongos C57Bl/6j (N=10), Balb C (N=5) e Swiss (N=5) com uma única dose i.p. de 10^7 parasitas irradiados a 200 Gy, coletando amostras de sangue semanalmente, sendo a presença de anticorpos determinada por ELISA como descrito em Métodos. Na Figura 14, podemos verificar que todos as linhagens de camundongos respondem ao inóculo com taquizoítos irradiados, mostrando aumento significativo nos níveis de IgG específica.

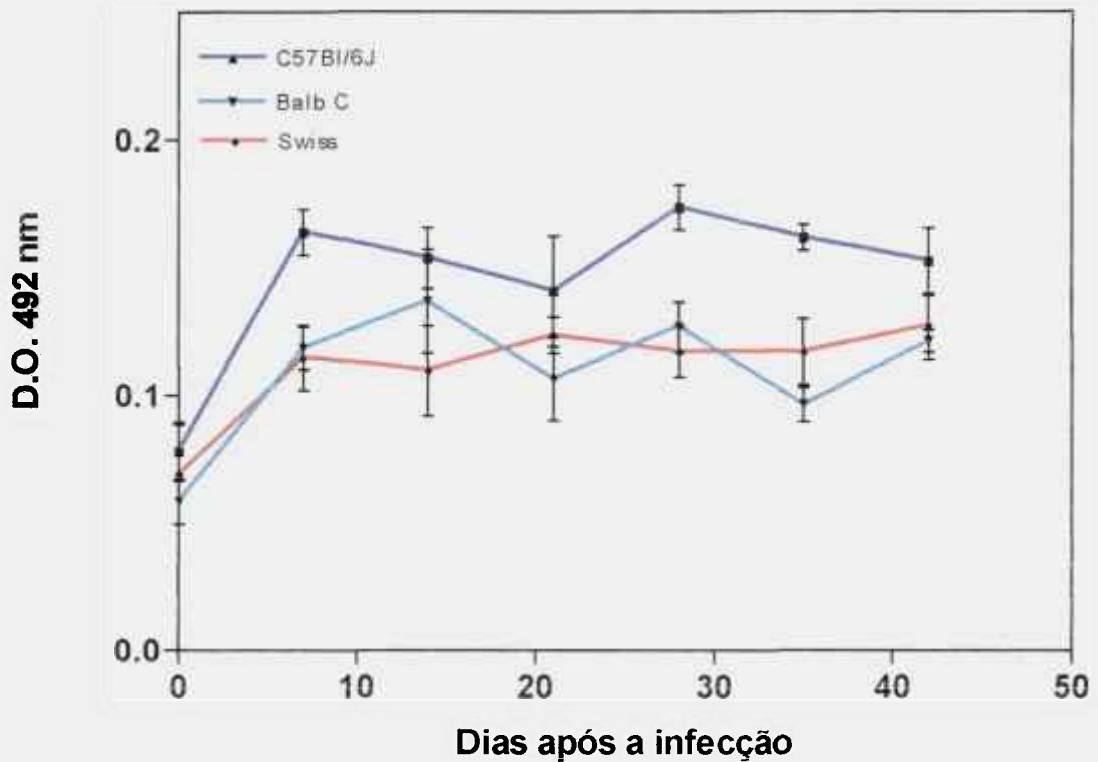


Figura 14 - Comparação da resposta imune (IgG) em camundongos C57Bl/6J, Balb C e Swiss inoculados com taquizoítos de *T.gondii* irradiados a 200 Gy.

7 – Imunogenicidade entre taquizoítos irradiados e outros tratamentos

Para analisar a resposta imune humoral obtida por imunização de camundongos C57Bl/6j ($n=8$) com uma única dose de 10^7 taquizoítos irradiados i.p., comparamos esta com a resposta apresentada por camundongos Swiss ($N=5$) que receberam 10^7 parasitas não irradiados i.p. Estes últimos por sua vez foram posteriormente tratados com sulfadiazina e pirimetamina ou foram inoculados com 10^7 parasitas mortos com formol i.p., sendo a presença de anticorpos detecto por ELISA.

Como podemos observar na Figura 15, nos camundongos inoculados com parasitas irradiados e nos animais tratados, houve resposta imune, mostrada pelos aumentos significativos nos níveis de IgG, o que contrasta com os dados encontrados nos camundongos inoculados com parasitas mortos, que não apresentaram qualquer resposta imune, do tipo IgG. Estes dados sugerem que os taquizoítos de *T.gondii* irradiados a 200 Gy podem ser bons imunógenos.

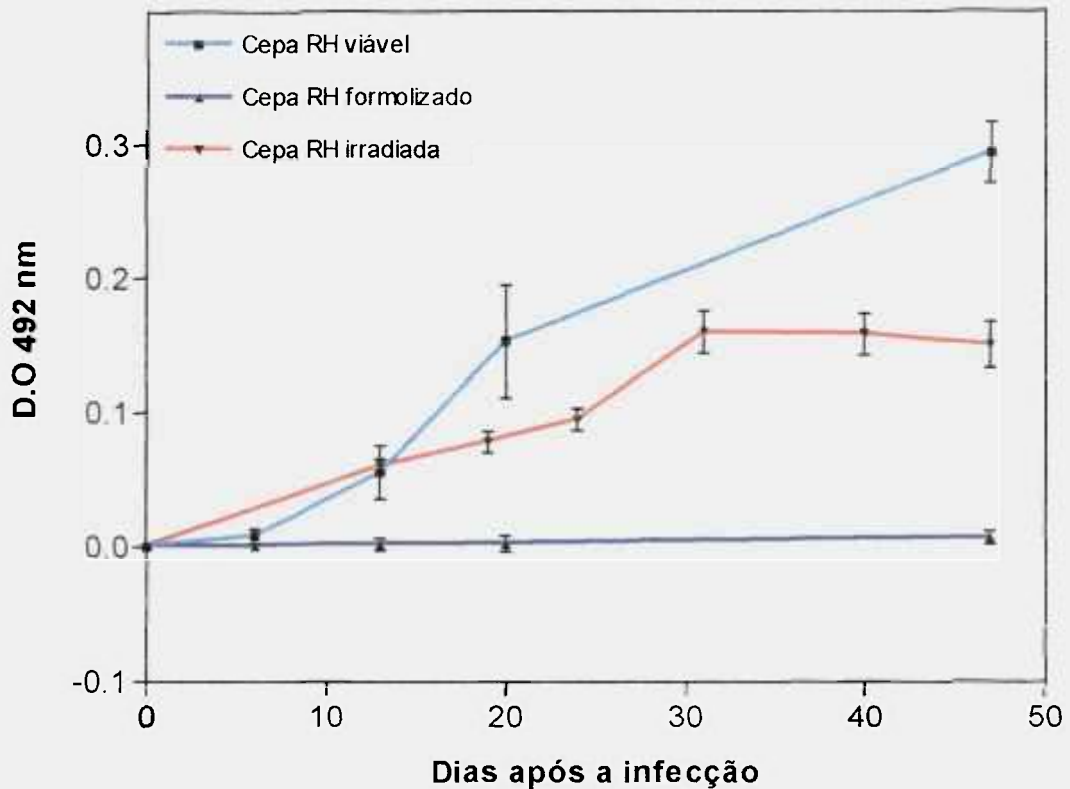


Figura 15 – Comparação da resposta imune (IgG) em camundongos inoculados 10^7 taquizoítos de *T. gondii* irradiado (200 Gy), formolizado e não irradiado (viável) com posterior tratamento com Sulfadiazina (100 mg/Kg) e Pirimetamina (5 mg/Kg), por ELISA.

8 – Reconhecimento das proteínas de *T. gondii* por anticorpos em soros de camundongos inoculados com parasitas irradiados, formolizados e não irradiados (tratados).

Para avaliar o reconhecimento das proteínas de taquizoítos de *T. gondii* por soros de camundongos, inoculados com parasitas irradiados (1, 2 ou 3 doses), formolizados (3 doses) e não irradiados (tratados), procedemos a técnica de Western Blot como descrito em Métodos, utilizando extratos salinos de taquizoítos como antígenos. Na Figura 16, mostramos que os anticorpos presentes no soro de camundongos inoculados com parasitas irradiados reconhecem os antígenos de taquizoítos de *T. gondii*, de maneira dependente à quantidade de doses recebidas pelo animal.

Os soros de camundongos tratados reconheceram as mesmas frações antigênicas que o soro dos animais inoculados com parasitas irradiados. No entanto, o soro dos camundongos inoculados com parasitas formolizados reconheceu uma fração antigênica que diferiu dos outros grupos.

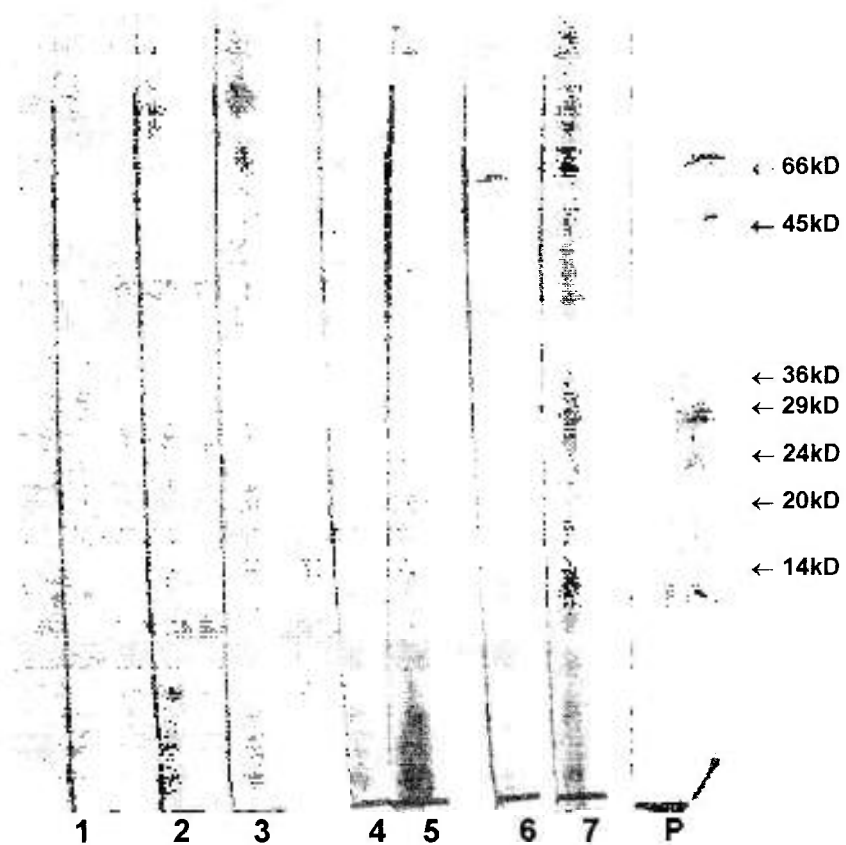


Figura 16 – Western Blot de antígenos de *T.gondii* ensaiados frente a soro de camundongo imunizado com taquizoítos de *T.gondii* como descrito a seguir: **1** – PBS-Tween(controle); **2** – Soro normal de camundongo; **3** – Soro de camundongo inoculado com *T.gondii* irradiado, 1 dose; **4** – Soro de camundongo inoculado com *T.gondii* irradiado, 2 doses; **5** – Soro de camundongo inoculado com *T.gondii* irradiado, 3 doses; **6** – Soro de camundongo inoculado com *T.gondii* formolizado, 3 doses; **7** – Soro de camundongo inoculado com *T.gondii* e tratado com pirimetamina e sulfadiazina; **P** – Padrão de proteínas para comparação de peso molecular.

9 – Ensaio da proteção induzida por taquizoítos irradiados

Para avaliar a proteção induzida por taquizoítos de *T.gondii* irradiados, camundongos C57Bl/6j foram divididos em 5 grupos e submetidos a inoculação com diferentes concentrações de taquizoítos irradiados, como segue: grupo 01 (N=03), grupo controle, que não recebeu nenhum inóculo prévio; grupo 02 (N=05), que recebeu inóculo de 10^7 parasitas irradiados a 200 Gy, 60 dias antes do desafio; grupo 03 (N=05), previamente inoculado com 10^7 parasitas irradiados, 60 e 30 dias antes do desafio; grupo 04 (N=05) que recebeu 10^6 parasitas imediatamente após a irradiação a 200 Gy, 30 dias antes do desafio; e o grupo 05 (N=04) recebeu o mesmo inóculo, mas somente após a permanência deste em refrigeração (4°C) por um dia. Todos os grupos foram desafiados com 10^3 taquizoítos de *T.gondii*.

Na Figura 17 observamos que a mortalidade nos grupos de camundongos imunizados com parasitas irradiados foi retardada, embora com mortalidade de todos os animais experimentais após 14 dias do desafio. No grupo controle, a morte ocorreu precocemente, com média de 6-7 dias de sobrevivência após o inóculo. Nos animais imunizados com parasitas irradiados, a morte ocorreu mais tarde, em torno de 9-10 dias do inóculo, o que foi significativo quando feita análise global destes animais ($p=0.0265$, teste de Kruskal-Wallis) (Figura 18). Não houve diferença significativa quanto ao tipo de inóculo utilizado ou protocolos de imunização, dentro do pequeno número de animais testados.

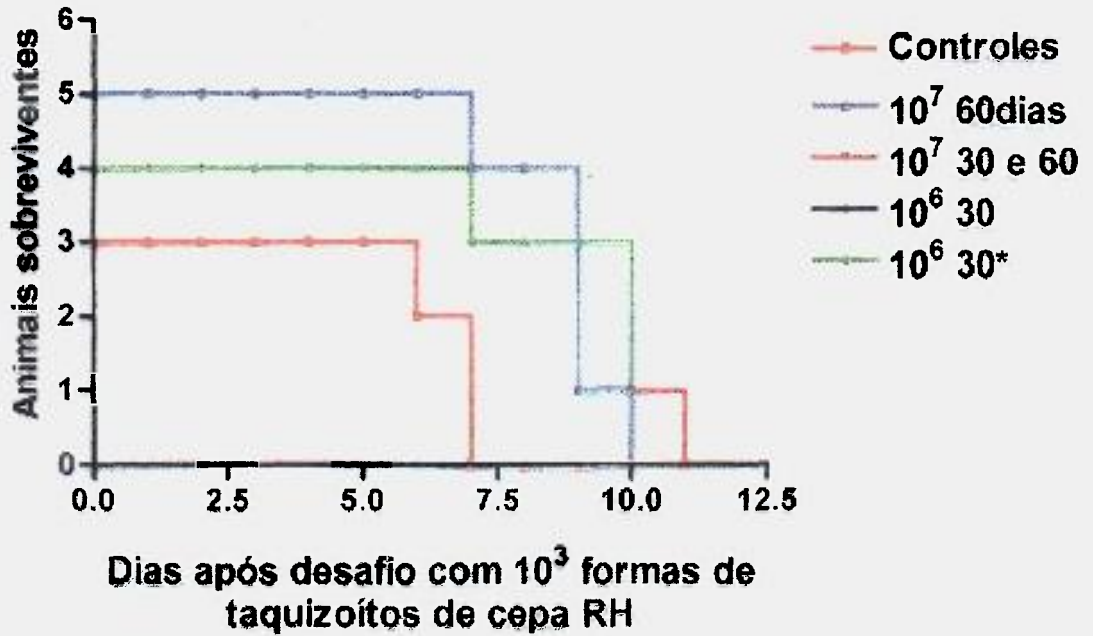


Figura 17 – Comparação de esquemas de imunização na indução de imunidade protetora.

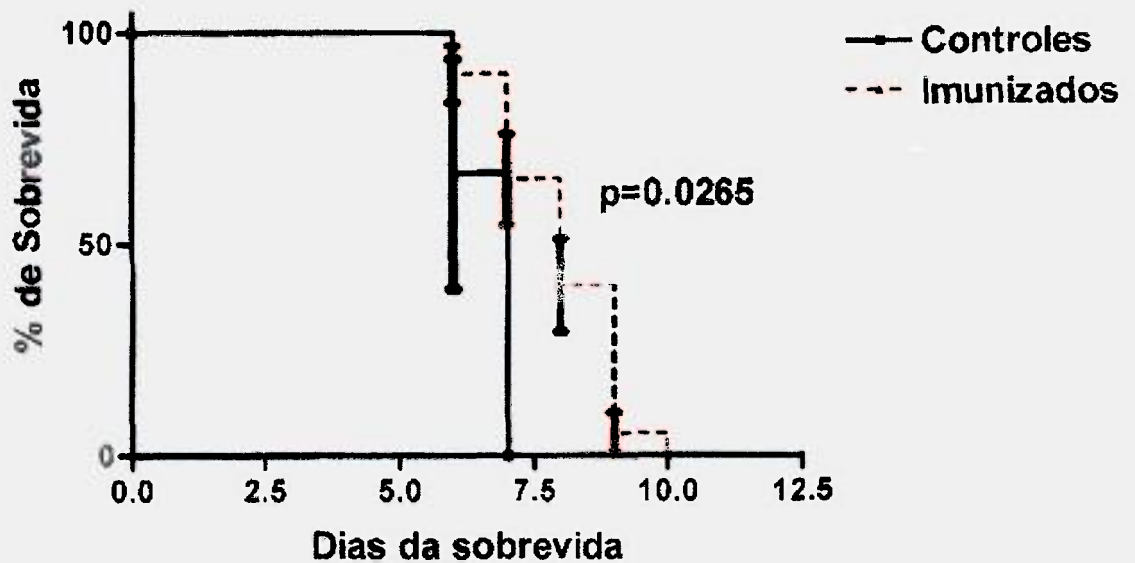


Figura 18 – Comparação de sobrevivência consolidada de animais imunizados com taquizoítos irradiados.

V – DISCUSSÃO

Em nossos ensaios, demonstramos claramente que a morfologia dos taquizoítos de *T.gondii* não era afetada pela radiação ionizante, levando em consideração a sensibilidade dos métodos utilizados. Apesar de extensa pesquisa, não encontramos relatos dos efeitos da radiação ionizante sobre a morfologia destes agentes.

Em modelos de parasitas do mesmo filo, foi demonstrado que ocorriam alterações de forma e motilidade em esporozoítos de *Eimeria nieschulzi*, durante sua excitação após irradiação com 150, 300 ou 600 Gy (Conder & Duszynski, 1977) entretanto, a irradiação neste modelo pode ter incluído oocistos ainda não completamente diferenciados, com necessidade de uma esporogonia terminal, que envolve síntese de proteínas e divisões nucleares (Frenkel *et al*, 1970), que poderiam ser afetadas pelo processo de radiação. Em organismos superiores, não ocorre alterações estruturais significativas nas primeiras fases de seu desenvolvimento após irradiação, como no caso dos esquistossômulos de *S.mansoni* (Mastin *et al*, 1985), desde que não haja necessidade de divisão celular.

O mesmo fato foi demonstrado com protozoários tanto em modelos de irradiação de esporozoítos de *P.berghei*, onde somente ocorrem alterações morfológicas na esquizogonia hepática (Scheller *et al*, 1995), como com formas de esquizogonia eritrocítica de *P. falciparum*. Nestes últimos, a maior radiosensibilidade ocorre nas fases de síntese de DNA do agente, concordantes com nossos dados de viabilidade dos agentes nas primeiras fases de desenvolvimento, prévias à primeira divisão celular (Suhrbier *et al*, 1990).

À ultraestrutura, mostramos integridade total do agente, com preservação completa das estruturas internas, mas comprovação da eficiência fisiológica dependia de uma análise acurada da capacidade de invasividade destes agentes irradiados. Ainda assim, foi possível encontrar as estruturas de penetração do complexo apical intactas, assim como a maior parte das estruturas constitutivas do taquízoito, como mitocôndrias, citóstoma e complexo de Golgi, que se mostravam intactas e em aparente funcionamento, semelhante aos achados ultraestruturais esperados para esta forma do agente (Dubey, 1993; Aikawa *et al*,

1977; Fichera & Roos, 1997). Isto sugere que a radiação ionizante não induz alterações estruturais nestes parasitas, nas doses utilizadas, antes da síntese de DNA para divisões celulares.

Morfologicamente a viabilidade dos taquizoítos também foi avaliada por afinidade tintorial, através da incorporação do corante Azul de Tripiano. Este método foi preconizado como o ideal para um diagnóstico rápido destes agentes (Shaio *et al*, 1987), o que corroborou nossos achados morfológicos de avaliação da integridade do agente após irradiação e permitiu sua inclusão como um controle de qualidade da preparação antes da irradiação, pela sua rapidez de execução.

Nossos estudos metabólicos mostraram que a maioria das vias de metabolismo dos taquizoítos de *T.gondii* estava intacta após a irradiação. Com o método de oxidação do MTT, com formação de um corante (formazam) durante o processo oxidativo na mitocôndria (Sieuwerts *et al*, 1995), demonstramos que os processos oxidativos do *T.gondii* estavam mantidos após a irradiação. A técnica foi utilizada com sucesso, no estudo da *Leishmania major* (Berg *et al*, 1994), tripanossomas (Ellis *et al*, 1993) e outros (Strote *et al*, 1993; Thomas *et al*, 1997; Mukherjee *et al*, 1997), para verificar a viabilidade e o funcionamento das mitocôndrias em células em cultura. Não localizamos, no entanto, nenhum trabalho utilizando este método com qualquer forma de *T.gondii*, mas, através de nosso ensaio, verificamos, que o método é factível e reprodutível para o parasita utilizado em nosso estudo. Mostramos que, independente da dose incidente sobre os parasitas, estes foram capazes de manter seu perfil oxidativo normal com o passar do tempo, fato esse que corrobora os dados sobre a viabilidade anteriormente descritos.

Nossos dados demonstraram uma clara incorporação de prolina marcada em produto precipitável pelo TCA, provavelmente proteínas, por taquizoítos. Este aminoácido é incorporado em proteínas ou utilizado como fonte energética na maioria das células, onde gera produtos não precipitáveis pelo TCA (Voet & Voet, 1995). Existem poucos estudos sobre o metabolismo intermediário do taquizoíto de *T.gondii*, mas pelos menos duas proteínas são ricas em motivos repetidos de prolina, certificando sua incorporação como aminoácido em proteínas (Mevelec *et al*, 1992; Ossorio *et al*, 1992). Esta incorporação de prolina em proteínas não foi afetada pela radiação ionizante, o que sugere que a via de síntese protéica está

intacta após a irradiação, com conseqüente manutenção de vias metabólicas correlatas. A manutenção destas vias pode ser explicada pela ausência de quebras duplas não reparáveis do DNA do taquizoíto nas áreas de controle ou de transcrição de mRNAs de proteínas constitutivas, o que não afetaria a síntese de proteínas. O sistema de reparo de DNA para quebras em fitas simples é sugerido como altamente eficiente em *T.gondii*, especialmente para o radical livre OH^* (Hughes *et al*, 1989), o que facilitaria a correção rápida destes danos e a conseqüente utilização das seqüências na síntese de mRNAs de proteínas constitutivas ou enzimas para vias metabólicas do agente.

Nossos ensaios também demonstraram que hipoxantina marcada, utilizada na síntese de ácidos nucléicos e na produção de polissacarídeos (Voet & Voet, 1995), foi incorporada progressivamente pelos taquizoítos de *T.gondii* em produto TCA precipitável. Os polissacarídeos não são habitualmente precipitáveis por este método, o que sugere que nossa detecção foi basicamente de ácidos nucléicos. Novamente, os taquizoítos irradiados apresentaram a mesma incorporação que seus equivalentes não irradiados. Este precursor pode ser incorporado preferentemente em RNA, por processamento para ribonucleotídeos G e A, com enzimas amplamente estudadas pelo seu potencial de alvo terapêutico (Pfefferkorn & Borotz, 1994) ou de seleção de mutantes (Donald *et al*, 1996). Existem vias de captação preferencial deste nucleotídeo na membrana do agente (Schwab *et al*, 1995), o que demonstra sua importância metabólica. Assim, este resultado é uma demonstração indireta da manutenção dos sistemas de síntese de mRNA e outros relacionados à síntese de proteínas pela célula irradiada.

Não houve captação demonstrável de timidina em nossos ensaios. Isto pode ter sido ocasionado pelo fato de que os parasitas estavam em fase Go ou G_1 de seu desenvolvimento, sem disparo de síntese de DNA. Habitualmente, a reprodução por endodiogenia destes agentes ocorre somente no citoplasma da célula hospedeira (Dubey, 1993) e não em taquizoítos isolados no meio, onde este não se reproduz. Outra possibilidade seria a não captação do precursor pelos taquizoítos isolados, que dependeria da célula hospedeira ou de seu metabolismo interno para produção deste nucleotídeo a partir de outro precursor (Krug *et al*, 1989).

O estudo da mobilidade eletroforética e da antigenicidade de proteínas do agente não mostram diferenças induzidas pela radiação ionizante. A ação da

radiação ionizante sobre proteínas, induzida tanto diretamente como indiretamente pela radiólise da água (Halliwell and Gutteridge, 1989), pode gerar a formação de agregados ou induzir a quebra da cadeia peptídica (Nascimento *et al*, 1996). Estes efeitos não foram evidenciados em nossas preparações, mas não podemos excluir sua existência devido a multiplicidade de proteínas existentes na preparação, o que poderia induzir a uma radioproteção, como já citado para outros sistemas (Skalka & Antoni, 1970). Além disso, a radiação ionizante pode promover uma maior imunogenicidade de proteínas irradiadas (Pinho *et al*, 1995), mas este fenômeno não foi encontrado em nossos sistemas, talvez pelo uso de antígenos complexos de difícil análise.

Um outro fenômeno pesquisado, e que não foi demonstrado, foi a apoptose espontânea ou radioinduzida. Existem descrições de alterações degenerativas de bradizoítos em cistos de *T.gondii* (Dubey, 1993) o que poderia sugerir que fenômenos apoptóticos poderiam estar ocorrendo neste agente, semelhante ao que ocorre em células do intestino, células linfóides e no controle da organogênese em organismos superiores (Haimovitz-Friedman *et al*, 1994). A radiação ionizante é um forte indutor de apoptose em linfócitos humanos, sugerindo-se até seu uso como abordagem dosimétrica (Lemes *et al*, 1997).

Na apoptose, ocorre fragmentação nuclear com formação de grumos, a partir de quebras internucleossomais do DNA, o que não foi evidenciado em nossos resultados, sugerindo que este mecanismo não ocorre neste agente após o tratamento com raios γ . Este fato não impede que a radiação ionizante induza quebras duplas do DNA, dificultando a migração das cromátides pela perda de sítios de ligação ao cinetócoro, o que ocasionaria uma morte das células filhas por desbalanço na transmissão de cromátides, ou morte mitótica.

Uma outra função fisiológica do agente analisada em nosso estudo foi a capacidade de invadir células hospedeiras. Utilizamos dois sistemas com resultados semelhantes. Em ambos, a invasividade dos taquizoítos não foi afetada pelas doses de radiação utilizada, mostrando que a fisiologia do agente estava igualmente mantida até este ponto. Havia a formação do vacúolo parasitóforo claramente evidenciável à morfologia, em células fibroblásticas, que não são fagócitos profissionais, o que reforça a formação do vacúolo na dependência do agente (Bonhomme *et al*, 1992). Outros autores também

documentaram a morte tardia do taquizoíta após irradiação, com fenômenos semelhantes aos aqui encontrados (Kook *et al*, 1995).

Para verificar a capacidade reprodutiva dos taquizoítos, optamos por duas abordagens, uma *in vitro* em células de cultura e outra *in vivo* em camundongos, observando a doença e letalidade do agente.

Os taquizoítos de *T.gondii* são capazes de infectar diferentes tipos de células em cultura, sendo a multiplicação do parasita dependente da dose de taquizoítos administrada e da duração da cultura (Park *et al*, 1993). As técnicas de cultivo são importante no diagnóstico para a detecção do parasita (Van Loon, 1989), manutenção dos taquizoítos em laboratório (Noriega and Hauser, 1988) e estudos ultraestruturais e imunológicos do *T.gondii*. Nos ensaios *in vitro* com células LLC-MK2, que não possuem os eventuais mecanismos inespecíficos de defesa que o animal apresenta, os parasitas nativos foram capazes de destruir a monocamada celular, mesmo estando em baixas concentrações, semelhante aos achados em utilizando células de rim de macaco (Cook & Jacobs, 1958). Detectamos alguns parasitas viáveis, nas doses 50 e 100 Gy, o que mostra que estas doses de radiação não foram suficientes para impedir a reprodução de todos os parasitas, ao contrário da dose de 200 Gy, que bloqueou a capacidade reprodutiva dos taquizoítos de *T.gondii*. Na maioria dos artigos que procuram analisar os efeitos da radiação em *T.gondii*, esta abordagem não foi utilizada, restringindo-se apenas aos ensaios *in vivo*, o que poderia gerar uma falsa idéia de incapacidade reprodutiva, por não usar um modelo tão sensível de detecção (Bakal & Veld, 1979; Chhabra, 1979). Algumas linhagens de *T.gondii* não são letais, gerando doença crônica ou localizada, que poderia também ocorrer em experimentos com linhagens irradiadas (Ferguson *et al*, 1994). A presença de anticorpos não auxilia no diagnóstico da infecção, pois obtivemos títulos equivalentes em nossos ensaios, sem evidência clínica ou parasitológica de doença.

Nos ensaios *in vivo*, como demonstrado nos resultados, quando os camundongos são inoculados com taquizoítos irradiados com 50, 100 e 200 Gy à concentração de até 10^5 parasitas/camundongo, não houve doença ou morte de nenhum animal. Estes dados são parcialmente concordantes aos obtidos com os taquizoítos de *T.gondii* irradiados a 50 e 100 Gy inoculados em camundongos Swiss nas concentrações de 10^4 e 10^6 por animal, com morte de todos os

camundongos entre 7 e 10 dias após o inóculo inicial (Bakal & Veld, 1979). Em nossos experimentos, no grupo controle, ocorreu morte maciça dos animais, que foi dependente da concentração de parasitas, pois em inóculos menores que 10^2 taquizoítos normais, não houve morte dos camundongos. Na maioria dos relatos com irradiação de taquizoítos, a maior parte dos autores mostra sobrevivência completa dos animais inoculados com taquizoítos irradiados acima de 150 Gy (Chhabra *et al*, 1979). A radiação foi utilizada também para esterilizar cistos teciduais do agente em carnes, mas esta forma apresenta menor atividade proliferativa o que levou a padronização de uma maior dose de radiação para esterilização, 550 Gy (Song, *et al*, 1991, Song *et al*, 1993), mas com teste também de alimentos sólidos irradiados, que pode causar também um processo de perda de eficiência da radiação na dependência da espessura do tecido e da proximidade do osso.

Os animais inoculados com taquizoítos irradiados foram testados quanto a presença de anticorpos pela técnica de IFI, mas esta foi negativa nos soros de camundongos injetados com parasitas irradiados nas doses utilizadas, sugerindo ser esta técnica pouco sensível para detectar os anticorpos presentes no soro ou ainda que a quantidade de antígeno empregada foi insuficiente para induzir anticorpos detectáveis.

Em nossos experimentos utilizando inóculo de 10^7 parasitas irradiados com 200 Gy não encontramos mortalidade e foi possível detectar a produção de anticorpo por ELISA. Além disso, camundongos inoculados, independente da linhagem (C57Bl/6J, Balb C ou Swiss), têm aumento na produção de IgG, apresentando uma resposta melhor nos camundongos C57Bl/6J. Baseado em descrições de literatura (Bakal & Veld, 1979) e em nossos achados, podemos inferir que havia menos que 100 parasitas com capacidade reprodutiva no inóculo, concorde com os resultados obtidos em células *in vitro*. A detecção de anticorpos pela técnica de ELISA, mostrou ser eficiente e com alta sensibilidade, mas incapaz de distinguir infecção ativa de imunização pura e simples.

Em outra abordagem, comparamos a resposta imune (IgG) dos camundongos injetados com parasitas irradiados a 200 Gy (concentração de 10^7 parasitas/animal), com animais inoculados com parasitas formolizados e inoculados com parasitas não irradiados, sendo os animais subseqüentemente tratados para controlar a infecção. Nossos dados mostram que os animais que

receberam parasitas mortos apresentam resposta imune de baixa qualidade, abaixo do nível de detecção em nossos sistemas mais eficientes, como IFI e ELISA. Ao contrário, nos camundongos infectados e tratados ou que receberam parasitas irradiados, a produção de IgG foi significativa, sendo que nos últimos, após trinta dias, esta produção de anticorpos começou a decair. Os resultados mostraram que apesar dos animais inoculados com parasitas irradiados apresentarem uma boa resposta imune, esta deve ser de curta duração. Estes dados são concordes com relatos da literatura, onde a imunidade induzida pelos parasitas irradiados induziu quantidades detectáveis de anticorpos mas de menor monta (Song *et al*, 1991).

Quanto a especificidade antigênica destes anticorpos, verificamos que os anticorpos produzidos por camundongos inoculados com parasitas irradiados reconhecem antígenos de *T.gondii*, de maneira semelhante ao soro de animais que recebem a infecção e são tratados, quando os antígenos eram analisados por Western Blot. A reatividade com soros de camundongos inoculados com *T.gondii* irradiado foi semelhante ao encontrado com soro de camundongo tratado, sendo a marcação mais forte quando a quantidade de desafios que o animais receberam foi maior (3 doses), mostrando que os anticorpos dos camundongos são capazes de reconhecer o parasita, de maneira semelhante aos animais que combatem a infecção com o tratamento. No entanto, nos ensaios realizados com sangue de camundongo inoculado com parasitas formolizados, houve reatividade detectável dos soros, mas o padrão de antígenos encontrado diferiu dos demais grupos (irradiado e tratado), mostrando que, apesar da presença de anticorpos, estes reconhecem frações do antígeno que podem não ser importantes no combate a infecção, quando estes são desafiados com parasitas normais. Apesar disso, existem relatos na literatura de indução de proteção com extratos de parasitas formolizados, mas o tipo de preparação do antígeno foi complexa, envolvendo o uso de adjuvantes e a dose utilizada foi cerca de 10 vezes maior que a aqui empregada (Krahenbuhl *et al*, 1972). Não existem relatos deste tipo de abordagem na literatura para taquizoítos de *T.gondii*, mas em modelo semelhante, o mesmo fenômeno foi detectado, com esporozoítos irradiados induzindo imunidade diferente do agente tratado pelo calor ou agentes químicos, com imunidade protetora somente no primeiro caso (Scheller *et al*, 1995).

Chhabra e colaboradores (1979), utilizando taquizoítos da cepa RH, demonstraram que quando camundongos previamente injetados com parasitas irradiados à concentração de 10^6 parasitas/animal, e, posteriormente desafiados com parasitas normais, estes permaneciam vivos somente se o desafio fosse realizado até seis semanas após o inoculo com parasitas irradiados, sendo que após este tempo, todos os animais morreriam. Estes dados diferem dos que encontramos em nosso trabalho, pois utilizamos inóculo 30 dias antes do desafio ou 2 doses prévias um 60 dias e outro 30 dias antes do desafio e em todas as situações os camundongos morreram, embora os animais que receberam parasitas irradiados o tempo de sobrevivência tenha sido maior, quando comparado ao grupo controle. Isso pode ser explicado pela extrema virulência da cepa RH utilizada no desafio, que com as sucessivas passagens por animais, pode ter se tornado mais agressiva (Amato Neto *et al*, 1995). A maioria dos autores utiliza no desafio cepas menos virulentas do parasita, geralmente produtoras de cistos (Song *et al*, 1991). Na indução de resposta imune, a concentração do antígeno e sua apresentação às células imunes são determinantes de uma boa resposta efetora, podendo em excesso induzir tolerância (Abbas *et al*, 1995). Usando antígenos em maiores concentrações, existe a descrição de proteção por imunização por extratos do agente, mas esta proteção foi conseguida com o uso de adjuvantes, não admissíveis para uso humano (Krahenbuhl *et al*, 1972). Durante a penetração na célula hospedeira, o agente libera sua membrana externa, repleta de antígenos majoritários contra os quais são usualmente presentes anticorpos na maioria dos pacientes, especialmente as proteínas p30 ou SAG1 (Grimwood and Smith, 1996). Estas proteínas são majoritárias na superfície da membrana do agente mas não têm a mesma representação nas proteínas totais do agente. Na infecção natural, os antígenos preferentemente liberados são os de membrana celular, justamente por sua excreção inicial no processo de invasão e parece ser contra eles que a resposta imune protetora é desencadeada (Khan *et al*, 1991). Embora proteínas purificadas não tenham produzido imunidade efetiva ou mesmo levado a doença mais grave (Kasper *et al*, 1985), alguns protocolos de imunização utilizando proteínas recombinantes tem mostrado resultados mais promissores (Debard *et al*, 1996; Bulow & Boothroyd, 1991), mas não está estabelecido se a vacinação com antígenos purificados ou recombinantes poderá induzir uma resposta protetora semelhante à doença

assintomática ou proteger da permanência de cistos teciduais reativáveis à imunossupressão (Gellin & Soave, 1992).

Uma vacina ideal para a toxoplasmose deve ser inócua e apresentar os mesmo antígenos majoritários para uma resposta imune no mínimo semelhante à doença assintomática. Como exposto acima, as soluções atuais de proteínas recombinantes (Debard *et al*, 1996; Bulow & Boothroyd, 1991) esbarram em questionamentos sobre a indução de uma resposta menos efetiva, resultando em manutenção dos cistos teciduais (Kasper *et al*, 1985). A opção da radiação ionizante tem sido controversa na imunização para doenças tropicais, sendo pesquisada em vários modelos, como a esquistossomose (Wales e Kusel, 1992) e em malária (Nussenzweig *et al*, 1969; Scheller *et al*, 1995). Nestes casos, ocorreram muitas dificuldades na produção do parasita para irradiação, tanto pelo seu pequeno número como pelas dificuldades na padronização das técnicas de irradiação, resultando na procura de técnicas alternativas de maior rendimento. Isto não se aplica ao *T.gondii*, devido a possibilidade de uma rápida obtenção de grandes quantidades do patógeno em sistemas relativamente seguros e eficientes.

Com todos os dados apresentados, mostramos que os parasitas irradiados permanecem viáveis, suas estruturas íntegras e funcionantes, inclusive o complexo apical responsável pela invasão celular. Além disso, utilizamos técnicas de alta sensibilidade para detecção de sua reprodução, identificamos parcialmente os anticorpos produzidos, que foram semelhantes aos induzidos pela doença natural, sem contrapartida de extratos ou parasitas formolizados. Isto demonstra que a irradiação pode ser uma ferramenta para a produção de vacinas para toxoplasmose, desde que adequadamente ensaiada e controlada.

VI - CONCLUSÕES

1 – Gerais

A radiação ionizante é a ferramenta ideal para a obtenção de taquizoítos de *T.gondii* viáveis, invasivos mas com capacidade reprodutiva abolida, e com imunogenicidade semelhante ao nativo, para uso como possível imunógeno seguro.

2 – Específicas

2.1 – Morfologicamente, a radiação ionizante não induz alterações de viabilidade detectáveis pelos métodos de coloração, contagem ou afinidade tintoriais, nem foram encontradas alterações estruturais significativas seja por análise ultraestrutural.

2.2 – Metabolicamente, a radiação ionizante não afetou a atividade oxidativa dos parasitas, sua síntese protéica ou ácidos nucléicos, especialmente RNAs. Não foi detectada síntese de DNA tanto em taquizoítos normais ou irradiados.

2.3 – Bioquimicamente, a radiação ionizante não induziu alterações na mobilidade eletroforética e na antigenicidade de proteínas do agente,

2.4 – Fisiologicamente, a radiação ionizante não afetou sua viabilidade ou sua capacidade de invadir células dos hospedeiros e não induziu apoptose.

2.5 – Do ponto de vista de reprodução, os taquizoítos de *T.gondii* perderam, de forma dose dependente, sua capacidade reprodutiva, que desapareceu na dose de 200 Gy, tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*.

2.6 – Do ponto de vista imunológico, os taquizoítos irradiados apresentaram antigenicidade e imunogenicidade semelhante aos agentes que não foram submetidos ao tratamento, quanto a produção de anticorpos IgG específicos.

2.7 – A imunidade induzida por agentes irradiados foi parcialmente efetiva, promovendo uma maior sobrevivência dos camundongos imunizados.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K.A., LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S.(1994). Cellular and Molecular Immunology. 2 ed., Philadelphia, W.B. Saunders Company, pp. 320-334.
- AIKAWA, M., KOMATA, Y., ASAI, T. & MIDORIKAWA, O.(1977). Transmission and scanning electron microscopy of host cell entry by *Toxoplasma gondii*. **Am. J. Pathol.**, **87**:285-296.
- AMATO NETO, V., MEDEIROS, E.A.S., LEVI, G.C. & DUARTE, M.I.S.(1995). Toxoplasmose. 4ed. Savier Editora de Livros Médicos - São Paulo, pp. 15 - 18.
- ANTUNES, C.M.F., KATZ, N., ANDRADE, R.M., MANSUR-NETO, E. & LIMA, J.M.(1971). Study of the effects of gamma-radiation on eggs and miracidia of *Shistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **13(6)**: 383-386.
- BAKAL, P.M. & VELD, N.(1979). Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strain RH. **Z. Parasitenkd.**, **59(3)**: 211-217.
- BEAMAN, M.H., WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S.(1992). Cytokines, *Toxoplasma* and intracellular parasitism. **Immunol. Rev.**, **17**: 96-117.
- BERG, K., ZHAI, L., CHEM, M., KHARAZMI, A. & OWEN, T.C.(1994). 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.
- BONHOMME, A., PINGRET, L. & PINON, J.M.(1992). *Toxoplasma gondii* cellular invasion. **Parassitologia**, **34**: 31-43.
- 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.
- BULOW, R. & BOOTHROYD, J.C.(1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. **J. Immunol.**, **147(10)**: 3496-3500.
- BUXTON, D.(1993). Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. **Parasitol. Today**, **9(9)**: 335-337.

- BUXTON, D., THOMSON, K., MALEY, S. WRIGHT, S. & BOS, H.J.(1991). 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.
- CAMARGO, M.E. & LESER, P.G.(1976). Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis II – Evolutive study of antibodies and serological pattern in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM immunofluorescence tests. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **18**: 227-238.
- 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.(Aceito para publicação na revista **Int. J. Radiat. Biol.**).
- CHANG, G.N., TSAI, S.S., KUO, M. & DUBEY, J.P.(1991). Epidemiology of swine toxoplasmosis in Taiwan. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health**, **22 (Suppl)**: 111-114.
- 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(5)**: 433-440.
- CONDER, G. A. & DUSZYNSKI, D. W.(1977). The effects of heat and cobalt-60 gamma-radiation on excystation of the rat coccidium, *Eimeria nieschulzi* Dieben, 1924. **J. Protozool.**, **24(1)**: 177-181.
- COOK, M.K. & JACOBS, L.(1958). Cultivation of *Toxoplasma gondii* in tissue cultures of various derivations. **J. Parasitol.**, **44**: P172-P182.
- 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(11)**: 3636-3641.
- 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(6)**: 2158-2166.

- DENIZOT, F. & LANG R.(1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, **89(2)**: 271-277.
- DONALD, R.G.K., CARTER, D., ULLMAN, B. & ROOS, D.S.(1996). Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. **J. Biol. Chem.**, **271(24)**: 14010-14019.
- DUARTE, M.I.S. & ANDRADE JR., H.F.(1994). - *Toxoplasmosis* In: Brasileiro Fo, G., Pitella, J.E.H., Pereira, F.E.L., Bambirra, E.A. & Barbosa, A.I.A.(eds). Bogliolo Patologia, 5^a. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, pp. 1161-1168.
- DUBEY, J.P.(1991). Toxoplasmosis - An overview. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Helth**, **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.(1996). Strategies to reduce transmission of *Toxoplasma gondii* to animals and humans. **Vet. Parasitol.**, **64(1-2)**: 65-70.
- DUBEY, J.P. & THAYER, D.W.(1994). Killing of different strains of *Toxoplasma gondii* tissue cysts by irradiation under defined conditions. **J. Parasitol.**, **80(5)**: 764-767.
- ELLIS, J.A., FISH, W.R., SILEGHEM, M. & McODIMBA, F.(1993). A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. **Vet. Parasitol.**, **50(1-2)**: 143-149.
- FERGUSON, D.J., HUSKINSON-MARK, J., ARAUJO, F.G. & REMINGTON, J.S.(1994). A morphological study of chronic cerebral toxoplasmosis in mice: comparison of four different strains of *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res.**, **80(6)**: 493-501.
- FICHERA, M.E. & ROOS, D.S.(1997). A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. **Nature**, **390**: 407-409.
- 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.

- FRENKEL, J.K.(1988). Pathophysiology of toxoplasmosis. **Parasitol. Today**, **4(10)**: 273-278.
- FRENKEL, J.K.(1990). Diagnosis, incidence, and prevention of congenital toxoplasmosis. **Amer. J. Dis. Child.**, **144**: 959-957.
- 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., FALCON, J., CASTELLS, D., MENDEZ, J., CASARETTO, A., GEDDA, C., SCREMINE, P., D'ANGELO, J., PEREIRA, D., AMIR, A. & CARESANI, A.(1996). Evaluacion de las perdidas economicas debidas a toxoplasmosis en ovinos en el Uruguay. **Parasitol. al Dia**, **20**: 100-108.
- GELLIN, B.G. & SOAVE, R.(1992). Coccidian infections in AIDS: Toxoplasmosis, Cryptosporidiosis, and Isosporiasis. **Med. Clin. N. America**, **76(1)**: 205-234.
- GLEASON, T.H. & HAMILIN, W.B.(1974). Disseminated toxoplasmosis in the compromised host. **Arch. Intern. Med.**, **134**: 1059-1061.
- GOTTSTEIN, B.(1995). *Toxoplasma gondii*: perspectives for a vaccine. **Schweiz. Med. Wochenschr.**, **65 (Suppl)**: 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(2)**: 169-173.
- 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(6)**: 479-483.
- HAIMOVITZ-FRIEDMAN, A., KAN, C.C., EHLEITER, D., PERSAUD, R.S., MCLOUGHLIN, M. & FUKS, Z.(1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. **J. Exp. Med.**, **180**: 525-535.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C.(1989). Free Radicals in Biology and Medicine. 2.ed., Oxford, Claredon Press, pp. 1-20.
- HUDSON, L. & HAY, F.(1989). Lymphokines and Cytokines. Practical Immunology. Third edition, Blackwell Scientific Publications, pp. 423-441.
- HUGHES, H.P., BOIK, R.J., GERHARDT, S. A. & SPEER, C.A.(1989). Susceptibility of *Eimeria bovis* and *Toxoplasma dondii* to oxygen

- intermediates and a new mathematical model for parasite killing. **J. Parasitol.**, **75(4)**: 489-497.
- KASPER, L.H., CURRIE, K.M. & BRADLEY, M.S.(1985). An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (p30) of *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.** **134(5)**: 3426-3431.
- KASPER, L.H. & MINEO, J.R.(1994) Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today**, **10(05)**: 184-188.
- KHAN, I.A., ELY, K.H. & KASPER, L.H.(1991). A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J. Immunol.**, **147(10)**: 3L501-3506.
- 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(10)**: 3600-3605.
- KOOK, J., OH, S.H., YUN, C.K. & CHAI, J.Y.(1995). Effect of gamma-irradiation on intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii* RH tachyzoites. **Korean J. Parasitol.**, **33(3)**: 173-178.
- KOSKINIEMI, M., LAPPALAINEN, M. & HEDMAN, K.(1989). Toxoplasmosis needs evaluation. **AJDC**, **143**: 724-728.
- KRAHENBUHL, J.L., RUSKIN, J. & REMINGTON, J.S.(1972). The use killed in immunization against an intracellular parasite: *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, **108(2)**: 425-431.
- KRUG, E.C., MARR, J.J.& BERENS, R.L.(1989). Purine metabolism in *Toxoplasma gondii*. **J. Biol. Chem.**, **264(18)**: 10601-10607.
- LAEMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685.
- LEMES, M.(1997). O uso da apoptose de linfócitos periféricos humanos como método alternativo em dosimetria biológica dos efeitos da radiação do Cobalto-60, São Paulo, pp.36-57l. (Dissertação de Mestrado em Ciências, Área de Tecnologia Nuclear Básica – IPEN/CNEN-SP/USP).
- 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.
- 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(1)**: 6-9.
- MARTÍNEZ-SILVA, R., LÓPEZ, V.A. & CHIRIBOGA, J.(1969). *Trypanosoma cruzi*: Effects of gamma radiation on growth and infectivity. **Exp. Parasitol.**, **25**: 162-170.
- MASTIN, A., BICKLE, Q.D. & WILSON, R.A.(1985). An ultrastructural examination of irradiated, immunizing schistosomula of *Schistosoma mansoni* during their extended stay in the lungs. **Parasitology**, **91**: 101-110.
- McCABE, R. & REMINGTON, J.S.(1988). Toxoplasmosis: The time has come. **N. Eng. J. Med.**, **318(5)**: 313-315.
- McHUGH, T.D., HOLLIMAN, R.E. & BUTCHER, P.D.(1994). The *in vitro* model of tissue cyst formation in *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Today**, **10(7)**: 281-285.
- MEVELEC, M.NI., CHARDES, T., MERCEREAU-PUIJALON, O, BOURGUIN, I., ACHBAROU, A., DUBREMETZ, J.F. & BOUT, D.(1992). Molecular cloning of GRA4, a *Toxoplasma gondii* dense granule protein, recognized by mucosal IgA antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **56(2)**: 227-238.
- MINEO, J.R. (1982). Detecção de antígenos e de anticorpos, com técnicas imunoenzimáticas, para o diagnóstico sorológico da toxoplasmose "aguda". São Paulo. (Dissertação de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
- MUKHERJEE, M., MIRSA, S. & CHATTERJEE, R.K.(1997). Optimization of test conditions for development of MTT as *in vitro* screen. **Indian. J. Exp. Biol.**, **35(1)**: 73-76.
- NASCIMENTO, N., SEEBART, C.S., FRANCIS, B., ROGERO, J.R. & KAISER, I.I. (1996). Influence of ionizing radiation on crotoxin: biochemical and immunological aspects. **Toxicon**, **34(1)**: 123.
- NORIEGA, F.R. & HAUSER, W.E.JR.(1988). *Toxoplasma gondii* maintenance in culture: a new efficient method for culturing RH tachyzoites. **J. Parasitol.**, **74(3)**: 495-499.
- 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.

- OSSORIO, P.N., SCHWARTZMAN, J.D. & BOOTHROYD, J.C.(1992). A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **50(1)**: 1-15.
- PARK, B.K., MOON, H.R., YU, J.R., KOOK, J., CHAI, J.Y. & LEE, S.H.(1993). Comparative susceptibility of different cell lines for culture of *Toxoplasma gondii* in vitro. **Korean J. Parasitol.**, **31(3)**: 215-222.
- PFEFFERKORN, E.R. & BOROTZ, S.E.(1994). *Toxoplasma gondii*: characterization of a mutant resistant to 6-thioxanthine. **Exp. Parasitol.**, **79(3)**: 374-382.
- 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* recombination 18-Kda antigen purified from *Saccharomyces cerevisiae*; Enhancement of delayed-type hypersensitivity after gamma-irradiation. **Int. J. Leprosy**, **63(3)**: 381-390.
- 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, W.B. Saunders Company, pp. 140-268.
- SABIN, A.B.(1941). Toxoplasmic encephalitis in children. **J. Amer. Med. Ass.**, **116**, 801-807.
- SALATA, E., WIENDL, F.M. & CORRÊA, M.A.(1973). Efeitos de raios gama sobre *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **15(2)**: 66-71.
- SHELLER, 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(1)**: 58-62.
- SCHWAB, J.C., AFIFI AFIFI, M., PIZZORNO, G., HANDSCHUMACHER, R.E. & JOINER, K.A.(1995). *Toxoplasma gondii* tachyzoites possess an unusual plasma membrane adenosine transporter. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **70(1-2)**: 59-69.
- 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(4)**: 538-546.
- SIEUWERTS, A.M., KLIJN, J.G., PETERS, H.A. & FOEKENS, J.A.(1995). The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vivo for the assessment of growth

- characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem**, **33(11)**: 813-823.
- SKALKA, M. & ANTONI, F.(1970). Effect of radiation on the biological properties of proteins IN: Radiation sensitivity of toxins and animal poisons. pp. 1-13, Ed. Int. Atomic Energy Agency.
- 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(01)**: 89-93.
- SONG, C.C., ZHEING, 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.
- STROTE, G., BOKHOLF, A. & COMLEY, J.C.(1993). Viability of *Onchocerca volvulus* in vitro. **Parasitology**, **107**: 175-182.
- SUHRBIER, A., WINGER, L.A., CASTELLANO, E. & SINDEN, R.E.(1990). Survival and antigenic profile of irradiated malarial sporozoites in infected liver cells. **Infect. Immun.**, **58(9)**: 2834-2839.
- SZUMIEL, I.(1994). Ionizing radiation-induced cell death. **Int. J. Radiat. Biol.**, **66(4)**: 329-341.
- THOMAS, G.R., McCROSSAN, M. & SELKIRK, M.E.(1997). Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. **Infect. Immun.**, **65(7)**: 2732-2739.
- THOMAS, P.A. & PELLOUX, H.(1993). Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel. **Parasitol. Today**, **9(2)**: 61-63.
- TOWBIN, H. & GORDON, J.(1984). Immunoblotting and dot immunobinding: current status and outlook. **J. Immunol. Meth.**, **72**: 313-340.
- VAN LOON, A.M.(1989). Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. **Int. Ophthalmol.**, **13(6)**: 377-381.
- VELGE-ROUSSE, 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(1)**: 31-38.

- VOET, D. & VOET, J.(1995). Biochemistry. 2 ed, New York., John Wiley & Sons, pp. 56-70.
- WALDELAND, H. & FRENKEL, J.K.(1983). Live and killed vaccines against toxoplasmosis of mice. **J. Parasitol.**, **69(1)**: 60-65.
- WALES, A. & KUSEL, J.R.(1992). Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action. **Parasitol. Today**, **8(11)**: 358-363.
- WEBSTER, J.P.(1994). The effect of *Toxoplasma gondii* and other parasites on activity levels in wild and hybrid *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, **109**: 583-589.
- WEBSTER, J.P., BRUNTON, C.F.A. & MACDONALD, D.W.(1994). Effect of *Toxoplasma gondii* on neophobic behaviour in wild brown rats, *Rattus norvegicus*. **Parasitology**, **109**: 37-43.
- WINSTANLEY, P.(1995). Drug treatment of toxoplasmic encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. **Prostgrad. Med. J.**, **71**: 404-408.
- WONG, S.Y. & REMINGTON, J.S.(1993). Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, **7**: 299-316.

ANEXOS

Vol. 92 - Suppl. I 1997

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research



MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Proceeding

XIII Meeting of Brazilian Society of Protozoology
XXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease
Caxambu, MG, Brasil, 11-14 November 1997

Organizers and Guest Editors:

Angela Kaysel Cruz
José Franco da Silveira

Lucile M. Floeter-Winter
Gentilda K. F. Takeda

Erney P. Camargo
Issac Roitman

Special Issue
Suppl. I Vol. 92
November 1997

IMMUNE RESPONSE TO TOXOPLASMA GONDII TACHYZOITES SUBMITTED TO ⁶⁰COBALT IRRADIATION, FORMALDEHYDE AND CHEMOTHERAPY

Hiramoto, RM*, Almeida, BSV, Alves, IC, ANDRADE Jr., HF

Lab. Protozoologia - Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP and *Superv. Radiobiologia, IPEN/CNEN-SP Av. Dr. E. C. Aguiar, 470 - 05403-000 - São Paulo, SP, Brazil

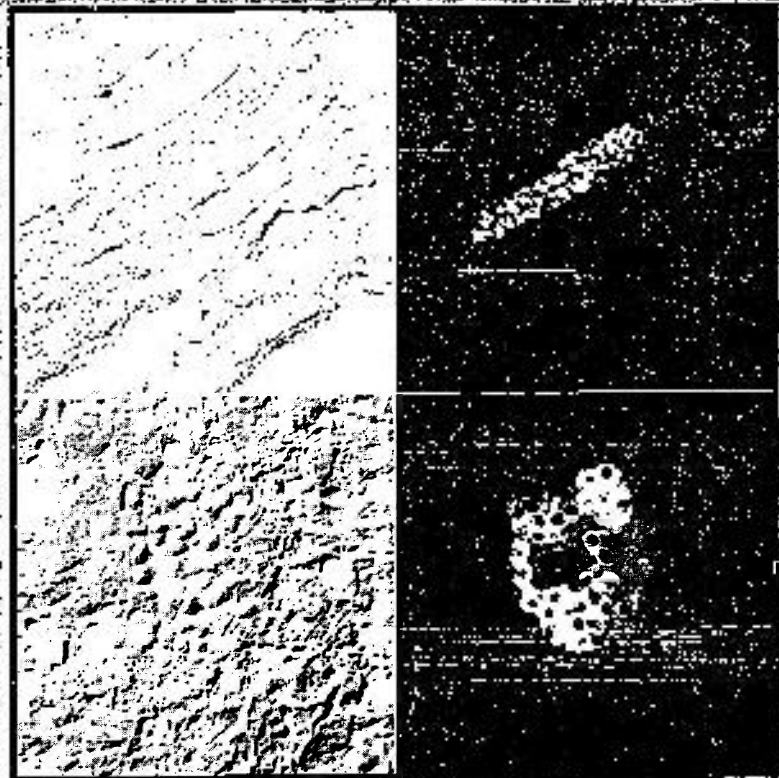
Toxoplasma gondii, an Apicomplexa parasitic protozoa, affects warm blood animals and man, usually with few symptoms, except in antenatal infections or in immunosuppressed/deficient patients. Despite those few symptoms in most infected persons, some groups at risk could be benefit of a sterile vaccine, especially seronegative transplant patients at risk of organ infection. Most vaccine attempts deal with attenuated strains, that could be not used in immunosuppressed patients. Gamma radiation was frequently used as a tool in the production of immunogens, especially when viability without reproduction is expected, with good results, mainly in schistosomiasis. Several reports dealing with cysts and tachyzoites irradiation had shown that the parasite could be killed at low doses, but no study was conducted to the biochemical alterations and immune response against irradiated *T. gondii* tachyzoites. Here, we present preliminary results of gamma radiation on the parasites, and the antibody and delayed hypersensitivity response of isogenic mice challenged with irradiated parasites, comparing these results with formalized parasite challenge or early treatment of acute infection. Peritoneal washing tachyzoites from mice infected with RH strain were treated with 200 Gy ⁶⁰Co radiation and used as irradiated parasites. Protozoa maintains its viability higher than 90% after irradiation, in a usual TP~Blue assay, without any physiological death as radio induced apoptosis, as detected by TUNEL assay, with an electron microscopic usual appearance. When 10⁷ irradiated parasites were injected in mice, there are no deaths or other disease symptoms nor tachyzoites could be found in peritoneal washing after three days. The induced immune response of this challenge was compared with mice injected with formalized tachyzoites or with mice infected with naive parasites and immediately effectively treated with sulfadoxine and pyrimetamine. We compare the antibody response, as specific anti *T. gondii* IgG detection in an ELISA assay using *T. gondii* extract as coat, in those three groups of mice, with the greater response seen in the infected-treated group, with similar, but not so high levels in irradiated challenged mice. Formalized parasites failed in induction of detectable antibody. We also test the quality of the antibody response by Western Blot with similar few bands labeled by abs from infected-treated and irradiated challenged mice. We also tested the delayed hypersensitivity by the paw edema assay in those three groups, using few animals, showing that significant response could be detected in the three groups, with clear paw edema formation, presenting high levels in the infected-treated and, curiously, also in the formalized challenged group. Those preliminary results shows that gamma radiation induces some modifications in the reproduction of tachyzoites of *T. gondii* and also affects the immune response to the agent, as show by the diverse antibody and delayed hypersensitivity results. Vaccine development against *T. gondii* must consider all of those immune aspects in order to provide a sterile and effective immunogen.

This work was supported by FAPESP n 96/5875-8 and 96101763-0 (BSVA), and LIMHCFMUSP-49. RMIH is a fellow of CNPQ.

Vol. 91 - Suppl. 1996

MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

An International Journal of
Biological and Biomedical Research



MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Proceeding

XII Meeting of Brazilian Society of Protozoology

XXIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease

Caxambu, MG, Brasil, 5 - 8 November 1996

Organizers and Guest Editors:

Angela Kaysel Cruz

José Franco da Silveira

Lucile M. Floeter-Winter

Gentilda K. F. Takeda

Erney P. Camargo

Isaac Roitman

Special Issue
Suppl. Vol. 91
November 1996

***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**

Hiramoto, R.M.*, Almeida, B.S.V., Cardoso, R.P.A. & Andrade Jr, H.F.

Lab. Protozoologia - Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo - FMUSP - Av. Dr. E.C. Aguiar, 470 - 05403-000 - S. Paulo - SP. Brazil and *Supervisão de Radiobiologia/IPEN/CNEN.

Toxoplasmosis, a worldwide protozoan disease, caused by *Toxoplasma gondii* was usually benign in most people, but severely affects fetus or immunosuppressed patients, with devastating disease. Transmission occurs by ingestion of cysts from undercooked meat or oocysts from cat feces in contaminated fresh food or water. The established immunity by disease, both humoral and cellular, had lifelong duration and some attenuated vaccines were tested in lambs with promising results. Ionizing radiation were used with success in vaccine production, providing viable but sterile agents, by destroying its reproductive ability. Here, we tested several schedules of ⁶⁰Co ionizing radiation of tachyzoites from RH strain of *T. gondii*, to obtain more viable and sterile parasites. *T. gondii* RH strain was used, from peritoneal exudate infected mice. The contaminating host cells were retired by nylon wool absorption and differential centrifugation. The purified tachyzoites, suspended in Dulbecco's MEM containing FCS 10%, were irradiated with 50, 100 and 200 Gy in a Gammacell (Atomic Energy of Canada) at a doses rate of 366 Gy/h, with temperature monitor. After irradiation, samples were incubated with Trypan Blue for viability and also stained by Giemsa, for morphology. C57Bl/6J mice were inoculated ip with 10⁵, 10⁴, 10³, 10² 10 and 10¹ irradiated or control parasites, and infection was followed with weekly peritoneal washings or specific IgG production after 4 weeks. Another 100 µl of solutions containing 10⁵, 10⁴, 10³ and 10² irradiated or control parasites/ml were seeded and maintained in LLC-MK2 monolayers, in 96 wells plastic microplates. Infected wells were determined by cytopathic effect and identification of tachyzoites in the supernatant. Efficient Dose₅₀ were determined using models for drug action, with 95% confidence interval.

All irradiation schedules maintained an higher viability, over 90%, of the parasites. When animals were challenged with irradiated parasites, no disease, parasites or IgG production were detected at any time. When LLC-MK2 cells were challenged, however, 50 Gy irradiated parasites presented some cell infection in higher inocula, showing no sterility at this level. In a larger model (10⁷ tachyzoites/25 cm² monolayers), 200Gy parasites produce no harm, control parasite kills all cells in five days and 50 Gy parasites presented a delayed same effect. 100 Gy parasites presented a positive culture only after 30 day's incubation. These data show that 200 Gy ⁶⁰Co gamma irradiation induces a loss of reproductive capacity without affecting short term viability of tachyzoites from *T. gondii*, allowing its use as a tool in the vaccine development.

R.M.Hiramoto is a fellow from CNPq. B.S.V.Almeida is a fellow from FAPESP. This work was partially supported by LIMHCFMUSP.



XI ENFIR / IV ENAN JOINT NUCLEAR CONFERENCES

**IV ENCONTRO DE APLICAÇÕES NUCLEARES
4 'th MEETING ON NUCLEAR APPLICATIONS**

Certificate

This is to certify that

Roberto Mitsuyoshi Hiramoto

has participated in the 4'th ENAN

Paper Title: **Toxoplasma Gondii: Effects of 60-Co Ionizing Radiation in Its Viability and Infectivity, Detected in Vitro in LLC-MK2 Cells and in Vivo on C57B1/6J. Mice.**

Authors: **Hiramoto, R.M.; Almeida, B.S.V.; Cardoso, R.P.A.; Andrade Jr, H.F.**

August 18 - 22, 1997


Poços de Caldas - Minas Gerais - Brazil

Promotion

IPEN - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

ABEN - Associação Brasileira de Energia Nuclear

IAEA - International Atomic Energy Agency


José Roberto Rogero
President of ABEN


Maria Helena O. Sampa
4'th ENAN General Chair

Acknowledgments

Banco do Brasil S/A
Banco Real S/A
Brasil Nuclear
Camberra Nuclear Products Group
Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear - CDTN/CNEN-MG
Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP
Centro de Medicina Nuclear - USP
Centro Tecnológico da Marinha - CTMSP
Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
ECC-RIO
Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP
Furnas Centrais Elétricas S.A. - FURNAS
Instituto de Energia Nuclear - IEN/CNEN-RJ
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP
Instituto de Radioproteção e Dosimetria - IRD/CNEN-RJ
Journal of Radiation Physics and Chemistry
Journal Progress in Nuclear Energy
Nuclear Engineering Program - COPPE - UERJ
Nuclear News
Nuclebrás Equipamentos Pesados S.A. - NUCLEP
Promon Engenharia Ltda
SINC do Brasil - Instrumentação Científica Ltda
Sociedade Brasileira de Biologia e Medicina Nuclear
Sociedade Brasileira de Proteção Radiológica
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ
Universidade Estadual de Londrina - UEL
Universidade Estadual de Pernambuco - UFPE
Varian Indústria e Comércio Ltda

Brazilian Association for Nuclear Energy - ABEN
President: José Roberto Rogero

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ
Reitor: Antonio Celso Alves Pereira
Vice-Reitor: Nilcéa Freire

Instituto Politécnico - IPRJ
Director: Joaquim Teixeira de Assis
Vice-Director: Luiz Nélio Henderson

Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN
President: José Mauro Esteves dos Santos

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN
Director: Cláudio Rodrigues
Division of Nuclear Techniques
Director: Roberto Fulfaro

Organization



IV ENAN
IPEN/CNEN
Maria Helena Sampa
General Chair
P.O. Box 11049
ZIP 05422 - 970
São Paulo, SP
BRAZIL
Fax: +55-11-816-9186

4'th Meeting on Nuclear Applications

August 18-22, 1997

Palace Hotel

Poços de Caldas, MG
Brazil



Promotion



4'th Meeting on Nuclear Applications

August 18-22, 1997

Palace Hotel

Poços de Caldas, MG

Brazil



Promotion



Brazilian Association for Nuclear Energy
ABEN



International Atomic Energy Agency
IAEA

Table of Contents

| | |
|---|-------------------|
| <i>IV ENAN - Organization</i> _____ | <i>iii</i> |
| <i>E01 - Radiation Protection & Dosimetry</i> _____ | <i>1</i> |
| <i>E02 - Radiochemistry</i> _____ | <i>42</i> |
| <i>E03 - Environmental Sciences</i> _____ | <i>63</i> |
| <i>E04 - Nuclear Instrumentation</i> _____ | <i>95</i> |
| <i>E05 - Waste Management</i> _____ | <i>135</i> |
| <i>E06 - Industry & Mining</i> _____ | <i>150</i> |
| <i>E07 - Medicine & Health</i> _____ | <i>159</i> |
| <i>E08 - Agriculture</i> _____ | <i>176</i> |
| <i>E09 - Biology</i> _____ | <i>203</i> |
| <i>E10 - Radioisotope Production</i> _____ | <i>221</i> |
| <i>E11 - Hydrology & Sedimentology</i> _____ | <i>228</i> |
| <i>E12 - Irradiators, Materials & Training</i> _____ | <i>237</i> |
| <i>Author Index</i> _____ | <i>277</i> |

IV ENAN - Organization

EXECUTIVE COMMITTEE

Maria Helena de Oliveira Sampa, General Chair.
IPEN/CNEN-SP
Pedro Eiti Aoki, IPEN/CNEN-SP
Leonardo G. de Andrade e Silva, IPEN/CNEN-SP
Maria Elisa C. M. Rostelato, IPEN/CNEN-SP
Fausto Maretti Junior, CDTN/CNEN-MG
Marycel Figols de Barboza, IPEN/CNEN-SP
Mitiko Saiki, IPEN/CNEN-SP
Mery Piedad Zamudio Igami, IPEN/CNEN-SP
Luis Carlos Ruiz Pessenda, CENA/USP
Casuê Nakanishi, IPEN/CNEN-SP

EDITORIAL COMMITTEE

Leonardo Gondim de Andrade e Silva,
Coordinator, IPEN/CNEN-SP
Bárbara Maria Rzyski, IPEN/CNEN-SP
Casimiro J. A.S. Munita, IPEN/CNEN-SP
Maria Helena de O. Sampa, IPEN/CNEN-SP
Margarida Mizue Hamada, IPEN/CNEN-SP
Marycel Figols de Barboza, IPEN/CNEN-SP
Nélida Lucia Del Mastro, IPEN/CNEN-SP
Pedro Eiti Aoki, IPEN/CNEN-SP
Selma M. Loureiro Guedes, IPEN/CNEN-SP
Valdir Sciani, IPEN/CNEN-SP

INSTITUTION REPRESENTATIVES

Cristiana de Almeida, SBBMN
Dante Luiz Voi, IEN-CNEN/RJ
Elizabeth Bras Pereira Gomes, CNEN/RJ
Gian Maria A. A. Sordi, SBPR
Luis Carlos Ruiz Pessenda, CENA/USP
Marcos de Castro Falleiros, UEL
Maria Inês Calil Cury Guimarães, CMN
Paulo Cunha, IRD-CNEN/RJ
Ricardo Tadeu Lopes, COPPE/UFRJ
Rita Moreira, CTMSP
Sergio Gonçalves Mathias, FURNAS

TECHNICAL PROGRAM COMMITTEE

Maria Helena de O. Sampa, IPEN/CNEN-SP
Hernán Vera Ruiz, IAEA
Leonardo G. de Andrade e Silva, IPEN/CNEN-SP
Marycel Figols de Barboza, IPEN/CNEN-SP
Margarida Mizue Hamada, IPEN/CNEN-SP
Paulo Roberto Rela, IPEN/CNEN-SP
Ricardo Tadeu Lopes, COPPE/UFRJ
Nélida Lucia Del Mastro, IPEN/CNEN-SP
Selma M. Loureiro Guedes, IPEN/CNEN-SP

ADVISORY COMMITTEE

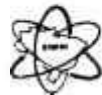
Roberto Fulfaro, IPEN/CNEN-SP
Maria Celeste Vasconcelos, CDTN/CNEN-MG
José Roberto Rogero, ABEN
Antonio Teixeira e Silva, IPEN/CNEN-SP

OFFICE STAFF

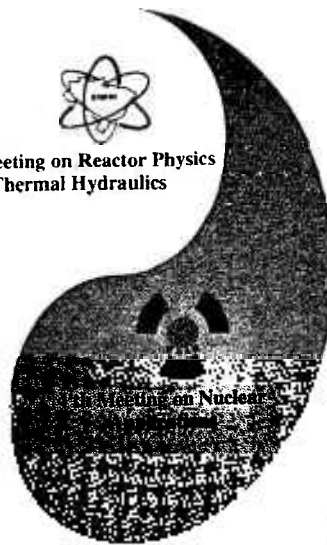
Cláudia Regina Nolla Fernando, IPEN/CNEN-SP
Pedro Eiti Aoki, IPEN/CNEN-SP
Suchi Zambo Fernandes Perillo, IPEN/CNEN-SP
Eddy Segura Pino, IPEN/CNEN-SP
Edvaldo R. Paiva da Fonseca, IPEN/CNEN-SP
Janet Shiguemi Yoneda, IPEN/CNEN-SP
Hector Carlos Camilo Rocca, IPEN/CNEN-SP
Eduardo Pavão de Araújo, IPEN/CNEN-SP
Gilberto da Cunha Albano, IPEN/CNEN-SP
Manuel Nunes Mori, IPEN/CNEN-SP
Wilson Aparecido Bruzinga, IPEN/CNEN-SP

XI ENFIR / IV ENAN Joint Nuclear Conferences

*August 18-22, 1997, Palace Hotel
Poços de Caldas, MG, Brazil*



**11th Meeting on Reactor Physics
and Thermal Hydraulics**



Brazilian Association for Nuclear Energy
ABEN



International Atomic Energy Agency
IAEA

***Toxoplasma gondii*: EFFECTS OF ⁶⁰CO IONIZING RADIATION IN THE VIABILITY AND INFECTIVITY, DETECTED *IN VITRO* IN LLC-MK2 CELLS AND *IN VIVO* IN C57BL/6J MICE**

Roberto M.Hiramoto^{*,#}, Beatriz S.V.Almeida^{*}, Roselaine P.A. Cardoso^{*} & Heitor F.Andrade Jr.^{*}

^{*}Lab.Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo - FMUSP -
Av.Dr.E.C.Aguiar, 470, 05403-000, S. Paulo, SP, BRAZIL

[#]Supervisão de Radiobiologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares(IPEN/CNEN-SP)
Cx.Postal 11040, 05422-970, São Paulo, SP, BRAZIL

ABSTRACT

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii*, promotes devastating disease in fetus and AIDS patients. The longlife immunity of natural infection is inefficient in eliminate tissue infective cysts. Few immunization programs were tested, mostly with attenuated strains. Ionizing radiation were used with successful in vaccine production, without reproductive ability with a relatively normal physiology until reproduction. Here, we tested several schedules of ⁶⁰Co irradiation of tachyzoites from RH strain of *T.gondii*, from peritoneal exudate or suspensions of LLC-MK2 infected cells, to optimize the viability and sterility of the irradiated agents. The tachyzoites were exposed to 50, 100 and 200 Gy in a GammaCell 220 at 366 Gy/h. The viability was tested by motility, integrity and Trypan Blue dye exclusion. All irradiation schedules maintained a high(>90%) viability of the parasites. Dilutions were injected in C57Bl/6j mice with induction of specific antibodies, no clinical disease but uncertain sterility. Infection of LLC-MK2 cells showed that viable and reproductive parasites were often found in 50 Gy irradiated cells, rarely found in 100Gy irradiated cells, with no growth occurring with 200 Gy irradiated tachyzoites. Our data show that 200 Gy ⁶⁰Co irradiation blocks the reproductive capacity without affecting the short term viability of tachyzoites of *T.gondii*.

I. INTRODUCTION

Toxoplasmosis, a worldwide protozoan disease caused by *Toxoplasma gondii*, was usually benign or asymptomatic in most of the infected people[1], despite some minor behavioural alterations[2], affecting more than 60% of adult population in our region[3]. Transmission occurs by ingestion of latent cysts in undercooked meat or oocysts of cat feces in contaminated fresh food or water[4]. This infection presented a devastating course with bad prognosis when affects immunosupressed, like AIDS or transplant patients, or with immune immaturity, as the fetus of acutely infected pregnant women[5]. After the infection, an established immunity had a long life duration, despite its inefficiency in the

eradication of tissue cysts, but enough to promotes the prompt elimination of released agents. Due to its apparently benign course, few efforts have been made in immunization schedules, but the HIV pandemic, the organ transplant receptors complications and possible behavioural interactions suggest that some sort of immunization to avoid this infection will benefit society. Those early attempts deals with attenuated strains, that result in infection with cysts persistence, without knowledge above behaviour effects or cysts reactivation induced be immunologic deficiency[6]. Ionizing radiation affects both nucleic acids and proteins of exposed cells, directly or due to action of free radicals from water radiolysis. Standardized protocols of ionizing radiation affect cells by abolishing its reproductive

ability without interfering in its short term physiology. This approach was used for the production of immunogens for parasitic diseases and other agents, resulting in better results as compared to chemically treated antigens[7].

Several studies were conducted in order to sterilize meat and other products that could be contaminated with *T.gondii* cysts by ionizing radiation, in order to improve meat quality for trading[8]. The immunity induced by irradiated forms of *T.gondii* was studied in experimental animals, usually without a careful analysis of viability and reproductivity capacity of treated agents. Most studies measure the effect by initial and after immunization challenge with infective forms, without any consideration to persistence of tissue cysts.

Here, we tested several schedules of ^{60}Co ionizing radiation of tachyzoites of RH strain of *T.gondii*, in order to detect viability, reproduction capacity *in vivo* in C57Bl/6j mice and *in vitro* in LLC-MK2 susceptible cells.

II. MATERIAL AND METHODS

Materials and reagents: All reagents were pro-analysis, with solutions made with MilliQ purified water. Reagents for electron microscopy were obtained from commercial sources, cited along the specific techniques when necessary. RH strain was maintained as cryo stabilates in liquid nitrogen, and expanded in Swiss mice before experiments. Mice were maintained according Animal Care definitions of Lab. Animal Science Assoc., in sterilized cages and absorbent media, with commercial food and water *ad libitum*.

Parasite purification: Mice were injected ip with 10^4 tachyzoites of RH strain obtained of the peritoneal exudate of a previous infected mouse. After 5 days, when death beginning to occurs, mice were killed by ether anesthesia and its peritoneal cavity washed with 2 batches of 5 ml of phosphate buffered saline(PBS). Recovered peritoneal washing were pooled, passed in a 28 gauge sterile needle, and immediately overlaid in a nylon wool glass column previously stabilized with room temperature PBS, with washing. The eluate was collected and centrifuged at 4°C , a 200g 5 min. The supernatant was recentrifuged a 1500g 10 min. The pellet tachyzoites were resuspended in Dulbecco's modified MEM containing 10% FCS, with determination of cell viability by Trypan Blue and the number of remaining contaminant host cells. Only batches with less than 1% of mice cell contamination were used.

Irradiation: The purified tachyzoites were irradiated with 50, 100 and 200 Gy in Gammacell 220(Atomic Energy

of Canada) at a doses rate of 366 Gy/h, with temperature monitored and in presence of atmospheric oxygen. After irradiation, parasites were maintained in 4°C until use. Samples were observed in phase contrast for motility, incubated with Trypan Blue for viability, stained by Giemsa, for morphology and, after glutaraldehyde fixation, processed by electron microscopy. Aliquots were stored in 4°C for a few days.

***In vivo* assay of virulence and infectivity:** C57Bl/6j mice were inoculated ip with a Poisson distribution of irradiated or controls parasites, and its survival and parasites in peritoneal exudate monitored weekly. After four weeks, tail blood was collected for specific antibody detection.

***In vitro* assay of reproductive capacity:** LLC-MK2 cells, a susceptible epithelial-like established cell culture, was grown in Dulbecco MEM at a monolayer in plasticware. For *in vitro* assays, the cells were grown in 96 wells plates, or in 75 cm² plastic bottles for long term culture. Poisson adjusted parasite concentrations were then seed over the monolayers. The characteristic cytopathic effect of the agent, a destruction of the monolayer, was monitored each day. For long term culture, the cells were seed at 1/10 initial concentration and observed for 21 days. Supernatant media was applied to glass slides, stained with Giemsa, and carefully observed three times a week.

III. RESULTS

The parasites maintained its usual morphology and movement after the three irradiation schedules. No significant changes occurred as related to irradiation strength. The integrity of the agents was also shown in electron microscopy, as shown in fig. 1, where intact parasites could be seen, presenting the usual conoid structure and without any evidence of nuclear or cellular damage. The nucleus of the cell presented also no clumped chromatin or other evidence of apoptosis.

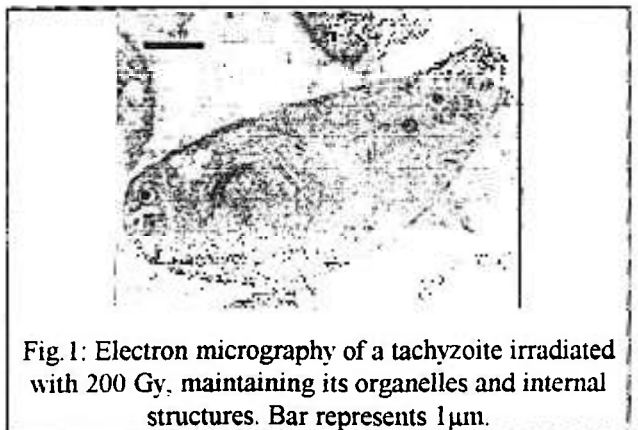


Fig. 1: Electron micrography of a tachyzoite irradiated with 200 Gy, maintaining its organelles and internal structures. Bar represents 1 μm .

The *in vivo* assays were performed using groups of five mice injected with 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 and 10^1 irradiated or control parasites. All mice injected with irradiated parasites or with 10^2 and 10^1 intact parasites survived without clinical evidence of disease, contrasting with all deaths that occurred in higher inoculate ($>10^2$). Based in these data, we defined 10^3 as a lethal dose of the agent. We performed an indirect immunofluorescence assay in blood sampled 28 days after the inocula, showing that most irradiated injected animals presented few if any specific antibodies in its sera.

The *in vitro* assay was performed in monolayers of LLC-MK2 cells, showing that control parasites killed all the cells in one week, with characteristic cytopathic effect, despite of lower concentrations including 10 parasites/well.

When irradiated samples were tested, in the multiwell assay, a progressive direct effect could be seen, with few parasites surviving in the 50 Gy irradiated parasites, rare parasites surviving at 100 Gy. Quantification was difficult to perform, but a rough estimate showed that 50 Gy furnishes a surviving reproductive population around 0.1% and 100 Gy around 0.001%, but the confidence intervals were quite higher, avoiding further analysis. Those data were also confirmed in a whole bottle assay.

The 200 Gy irradiated parasite did not present reproductive capacity tested in both assays, allowing an estimation of less than 0.00001% surviving population, practically achieving sterility.

IV. DISCUSSION

Our data shown that tachyzoites of *T.gondii* presented a relatively high resistance to gamma irradiation, with 200 Gy requirement for complete sterility. This fact was similar in magnitude with those found by others authors, but without adequate testing, using only experimental animals as a probe [9,10,11]. The short-term structure and physiology of the parasite appears intact, as shown by viability testing and ultrastructural findings. Interesting, others authors found a lower resistance of those forms, ascribing this to this intense reproductive activity [6], but our data are quite similar to those found for cysts, a quiescent form of the agent. The morphology of the parasite after irradiation suggests that an indirect phenomenon, like radio induced apoptosis, are not the main damage inducing the late cell death.

Our data suggest that *in vivo* assays using mice in order to evaluate adequate changes on viability of *T.gondii* is a bad approach, as elsewhere suggested [6] due to possible low virulence of the strain or better host immune response [6]. The LLC-MK2 cell monolayers are better form to detect this fact, both for viability or

reproduction. Moreover, we can analyze the reproductive status of the parasite both in terms on destruction of monolayer or its detection in supernatant media.

Gamma radiation (^{60}Co) induces changes on *T.gondii*, leading to decreased or abolished reproduction, but maintaining viability, and probably physiology, of these parasites. Other attempts, using inactivated or chemically treated antigens, resulted in lower or no response (our data not shown). These data suggest that efficient immune response to *T.gondii* depends of its viability, maintaining its physiology until complete recognition by the host immune system.

Thus, ^{60}Co gamma rays seems a better tool to produce a toxoplasmosis vaccine with special focus to maintenance the viability, lack of infectivity and immunogenicity.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Marcelo Alves Ferreira for electron microscopy and Bruno A. Cardi, M.S.C, for critical revision of the text. This work was supported by FAPESP n° 1996/5875-8 and LIMHCFMUSP49. R.M. Hiramoto was a fellow from CNPq.

REFERENCES

- [1] Frenkel, J.K. **Pathophysiology of toxoplasmosis.** Parasitology Today, vol. 4, n°10, p273-278, 1988
- [2] Flegr, J., S. Zitková, P. Kodym & D.Frynta. **Induction of changes in human behaviour by the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*.** Parasitology, vol. 113, p49-54, 1996
- [3] Guimarães, A.C.S., M. Kawarabayashi, M.M. Borges, J.E. Tolezano & H.F. Andrade Jr. **Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region.** Rev.Inst.Med.Trop. São Paulo, vol. 35, n° 6, p479-483, 1993.
- [4] Dubey, J.P. **Toxoplasmosis - An overview.** Southeast Asian J.Trop.Med.Public.Helth, vol. 22(Suppl), p88-119, 1991.
- [5] Thomas, P.A. & H. Pelloux. **Toxoplasmosis - congenital and in immunocompromised patients: a parallel.** Parasitology Today, vol. 9, n° 2, p61-63, 1993
- [6] Waldeland, H. & J.K. Frenkel. **Live and killed vaccines against toxoplasmosis of mice.** J. Parasitology, vol. 69, n° 1, p60-65, 1983.

[7] Wales, A. & Kusel, J.R. **Biochemistry of irradiated parasite vaccines: suggested models for their mode of action.** *Parasitology Today*, vol. 8, n° 11, p358-363, 1992.

[8] Song, C.C., X.Z. Yuan, L.Y. Shen, X.X. Gan & J.Z. Ding. **The effect of Cobalt-60 irradiation on the infectivity of *Toxoplasma gondii*.** *International Journal of Parasitology*, vol. 23, n° 1, p89-93, 1993.

[9] Bakal, P.M. & N. Veld. **Response of white mice to inoculation of irradiated organisms of the *Toxoplasma* strains RH.** *Z. Parasitenkd.*, vol. 59, p211-217, 1979.

[10] Seah, K.K. & Hucal, G. **The use of irradiated vaccine in immunization against experimental murine toxoplasmosis.** *Can.J.Microbiol.*, vol. 21, p1379-1385, 1975.

[11] Chhabra, M.B., R.C. Mahajan, & N.K. Ganguly. **Effects of ⁶⁰Co irradiation on virulent *Toxoplasma gondii* and its in experimental immunization.** *Int.J.Radiat.Biol.*, vol. 35, n° 5, p433-440, 1979.