

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**Produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em células de
sarcoma murino TG180**

André Peres Barbosa de Castro

Botucatu - SP
Fevereiro 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA

**Produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em células de
sarcoma murino TG180**

André Peres Barbosa de Castro

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção do
título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Helio Langoni

Botucatu - SP
Fevereiro 2007

Autor: André Peres Barbosa de Castro

Data: 15 de fevereiro de 2007

Titulares

Prof. Titular Helio Langoni

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

Prof^a Dr^a Márcia Marinho

Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP - Araçatuba

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP - Botucatu

DEDICATÓRIA

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”
– Cora Coralina

O presente trabalho é fruto mais do que de um esforço único e pontual, é a reunião de esforços diversos sendo portanto dedicado a todos aqueles que, próximos ou distantes, ajudaram na sua concretização.

Dedicado aos meus pais Marly e Salustiano, aos meus irmãos Gustavo e Isabela e aos meus tios Maria do Carmo e Weliton por que sempre valorizaram cada passo que foi dado e serviram de apoio e fortaleza.

Aos Professores Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo e Paula Dias Bevilaqua porque primeiro me ensinaram que a Medicina Veterinária é sobretudo Saúde Pública.

Ao Prof. Dr. José Dantas Ribeiro Filho por me estimular a seguir em frente quando alguns desejavam que eu desistisse.

À cidade de Botucatu que eu adotei como minha, aprendi a gostar e a respeitar. “Nunca esquecerei de ti ó minha terra!”.

AGRADECIMENTOS

As flores têm o perfume que a terra lhes dá sem ser perfumada. Assim, também nós devemos dar a nossos atos aquilo que não trazemos em nós mas de que somos realmente capazes, e que não morrerá com a nossa morte. (Campos de Carvalho – A lua vem da Ásia)

Agradecer é sem dúvida à parte mais difícil quando do término de um trabalho. Não se pode permitir esquecer aqueles que estiveram presentes e ajudaram para que chegássemos ao fim do mesmo. Há que se acautelar para que não haja apenas o momento do trabalho; é preciso que se lembre que trabalho é na verdade “lavoro”. É lavoura, que começa na semente lançada, o solo preparado e a partir daí se desenvolve até que possamos colher os resultados. Mas nesse processo muitos estiveram cuidando para que enfim ele germinasse.

Ao meu Orientador Helio Langoni, que me recebeu como residente e depois como orientado, mais do que agradecer, devo reconhecer que minha formação enquanto médico veterinário mais se consolidou nesses anos de convívio e aprendizado. Poucos são os que merecem o título de professor, por que ensinar o que se sabe é fácil, mas poucos têm a capacidade de permitir que aprendamos sempre. Ao Professor Helio minha gratidão.

Ao Professor Aristeu Vieira da Silva, que desde o início de minha residência tem se mostrado como um amigo e como alguém que me ajudou a desenvolver um senso crítico e uma visão ética sobre a medicina veterinária. Agradeço também por ter lançado a semente desse projeto.

A Cidinha e ao Guilherme que abriram as portas da sua casa, e aceitaram que eu dividisse com vocês momentos familiares, mas que são sempre importantes para quem se afasta dos seus. Foi convivendo com vocês que percebo a fonte de onde o Professor Helio retira tanta vitalidade. Muito obrigado!

Aos meus amigos, novos e antigos que tive a oportunidade de conhecer e de rever em Botucatu, saibam que sem

vocês a vida seria menos interessante, menos solidária e menos suportável. Aristeu, Júlia, Érica, Rodrigo, Vanessa Yuri, Fábio Shimabukuro, Sandia, Tamara, Acácia, Cassiano, Juliana Akaboshi, Mônica, Versuka, Walkiria, Vanessa Riesz, Jonas, Amanda, Liliane, Welington, Taís, Nair, Benedito, Juliano, Patrícia, Juliana Giantomassi. Aos residentes das Zoonoses que vieram antes, e ajudaram a construir tudo o que eu pude usufruir. Aos que virão para que assumam o compromisso de continuar mantendo um bom trabalho.

Aos amigos de República ou agregados, que sempre estiveram ao meu lado: Evandro, Alexandre, Cláudio, Frederico, Lucila, Cristiane, Evelyn. Vocês são, após cinco anos de agradável convivência, parte daquilo que tenho de melhor, e parte desse trabalho também é seus. Obrigado por tanta paciência e pelos anos de amizade sólida.

Aos Professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Prof^a. Jane Megid, Prof. Antônio Carlos Paes, Prof. Paulo Francisco Domingues, Prof. José Rafael Modolo, Prof. Márcio Garcia Ribeiro, Prof. Luis Carlos de Souza, Prof. Germano Francisco Biondi e Prof. José Paes de Almeida N. Pinto, pela experiência e aprendizado nesses anos de convívio. Aos funcionários do DHVSP pela solicitude e boa vontade sempre que precisei. Vanderlei, Sérgio, Humberto, Benedito, Rodrigo, Fernando, Adilson, Dona Zeza, Adriana e Tânia, meus agradecimentos.

Ao Conselho de Pós-Graduação pela convivência que me permitiu saber o quanto um corpo docente empenhado na melhoria constante, pode trazer de resultados concretos para a melhoria de um programa de pós-graduação. Agradeço a todos os membros do Conselho e em especial as “meninas” da Pós-Graduação: Denise, Maria e Regina, pela paciência, tolerância e cobranças para o cumprimento dos prazos.

A toda comunidade da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Docentes e Funcionários, por terem tão bem me recebido.

A todos os novos amigos da Equipe de Vigilância em Saúde Ambiental da Secretaria Municipal de Saúde de Botucatu, por me permitirem aprender com vocês um pouco mais a cada dia!

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo incentivo à pesquisa, permitindo o

desenvolvimento da ciência brasileira. (Bolsa de mestrado – Processo FAPESP - 03/08191-8)

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP – FUNDUNESP, cujo auxílio financeiro permitiu a concretização desse trabalho. (Processo FUNDUNESP/PROEX - 00377/04)

Dessa forma chego ao fim dos meus agradecimentos, sabendo que não pude e não vou conseguir agradecer a todas as pessoas que dele tomaram parte mesmo que minimamente, mas tenho a certeza de que elas foram imprescindíveis.

LISTA DE QUADROS

Página

QUADRO 1 – Comparação dos resultados sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti- <i>T. gondii</i> utilizando-se antígenos produzidos a partir da inoculação intraperitoneal em camundongos (in vivo) e em histocultura. Botucatu, 2007.....	44
---	----

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Número de células de amostras criopreservadas e frescas. Botucatu, 2007.....	42
TABELA 2 – Resultados obtidos com relação ao conteúdo celular de amostras criopreservadas e amostras frescas. Botucatu, 2007.....	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Células da Linhagem de Sarcoma TG 180 coradas com solução de Azul Tripán, em câmara de Neubauer (células não viáveis coradas em azul). Botucatu, 2007..	28
_Toc158368382	
FIGURA 3 – Taquizoítos de <i>T. gondii</i> viáveis (seta vermelha) e inviáveis (seta azul). Colaração pelo Azul Tripán, em câmara de Neubauer (células não viáveis coradas em azul). Botucatu, 2007.	29
_Toc158368384	
FIGURA 5 – Delimitação dos campos. Botucatu, 2007.....	31
_Toc158368386	
FIGURA 7 – Aspecto do aspirado peritoneal de sarcoma murino TG 180. Botucatu, 2007.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

G		Gravidade
°C		Graus Celsius
mL		mililitros
µL		microlitros
V		Volume
V/V		Volume por unidade de volume
g		Grama
mg		Miligrama
pH		Potencial de íons de hidrogênio
CO ₂		Dióxido de carbono
%		Porcentagem
>		Maior que
<		Menor que
SST		Solução Salina Tamponada de Fosfato
ATB		Antibiótico
MEM		Meio mínimo essencial de Eagle
MAD		Método de Aglutinação Direta
RIFI		Reação de Imunofluorescência Indireta
SF		Reação de Sabin-Feldman
TG180		Linhagem de sarcoma murino
HeLa		Linhagem de câncer cervical
LLC		Linhagem de rim de coelho
Vero		Linhagem de células de rim de macaco verde
BTU		Linhagem de <i>T. gondii</i>
RH		Linhagem de <i>T.gondii</i>
G1		Grupos de experimento
CV		Células viáveis por mL
CI		Células inviáveis por mL
VT		Número de células total da suspensão
V%		Viabilidade em porcentagem

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 – INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO DE LITERATURA	17
2 – OBJETIVOS	25
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 – Animais de experimentação	26
3.2 – Manutenção da linhagem de sarcoma murino TG 180	26
3.3 – Manutenção da cepa RH de <i>T. gondii</i>	26
3.4 – Produção dos soros-controle.	27
3.5 – Teste de exclusão do corante – ““ <i>dye test</i> ” <i>Exclusion</i> ”	28
3.6 – Preparo das amostras	30
3.6.1 – Câmara de Neubauer e campos de contagem.....	31
3.6.2 – Avaliação das amostras	32
a. Número de células viáveis por mL (CV)	32
b. Número de células viáveis totais da suspensão original (VT)	33
c. Viabilidade em porcentagem (V%)	33
3.7 – Colheita de materiais.....	33
3.7.1. Colheita de sangue	33
3.8 – Produção de antígeno para o método de aglutinação direta <i>in vivo</i>	34
3.8.1. Amostras da cepa RH de <i>Toxoplasma gondii</i> e de Sarcoma Murino TG 180	34
3.8.2. Produção do antígeno	34

3.8.3. Fixação do antígeno pela formalina	36
3.8.4. Titulação do antígeno	36
3.9. Sorologia pelo método de aglutinação direta	37
3.10 – Produção da linhagem de Sarcoma Murino TG180 em histocultura ..	38
3.10.1 – Adaptação a partir de amostras criopreservadas	38
3.10.2 – Adaptação a partir de amostras mantidas <i>in vivo</i>	39
4 – RESULTADOS	41
5 – DISCUSSÃO	45
6 –CONCLUSÕES	47
7 –BIBLIOGRAFIA	48
ANEXO	52
a) Preparo da solução-mãe de Azul Tripán a 0,4%	52
b) Tampão Borato (pH 8,7)	52
c) Solução salina tamponada de fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS 7,2)	52
d) 2-Mercaptoetanol 0,2M	52
e) Materiais e Equipamentos	53

RESUMO

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, de distribuição mundial e que acomete todos os animais homeotérmicos, incluindo o homem. Apresenta desde quadros assintomáticos a manifestações sistêmicas graves. Nos seres humanos a infecção atinge com maior gravidade principalmente indivíduos imunocomprometidos e gestantes, sendo que a primoinfecção, pode levar a óbitos, abortamentos, natimortos além de lesões severas do sistema nervoso central.

Técnicas sorológicas precisas de fácil aplicação a campo e de menores custos, podem auxiliar na promoção de medidas de prevenção e controle, mas para isso é importante garantir a produção de antígenos em quantidade e de qualidade, a fim de atender as necessidades do método empregado, para garantir a sua padronização.

A produção *in vitro* de taquizoítos de *T.gondii* usando células de sarcoma murino TG180 em histoculturas, mostra-se uma alternativa viável para a produção de antígeno de *T. gondii*, em quantidade e qualidade para uso no diagnóstico dessa infecção utilizando-se o Método de Aglutinação Direta, o que pode permitir sua difusão como um teste rápido a campo, possibilitando a sua utilização por profissionais autônomos ou unidades de saúde, podendo-se assim agilizar com uma maior rapidez as ações de prevenção dessa zoonose.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one protozoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, of world-wide distribution and that acomete to all the animals, including the man. It presents since without symptoms until serious clinical manifestations.

In the human beings the infection reaches with bigger gravity immunocompromised patients individuals mainly and pregnant woman, being that the primary infecction, it can take the deaths, abortions, stillborn beyond severe injuries of the central nervous system.

Serologicals techniques of easy application in the field and of lesser costs, can assist in the promotion of measures of prevention and control, but for this it is important to guarantee the production of antigens in amount and quality, in order to take care of the necessities of the employed method to guarantee its standardization. The production in vitro of taquizoitos of *T.gondii* using cells of sarcom murine TG180 in histoculture, reveals to a viable alternative for the antigen production of *T. gondii*, in amount and quality for use in the diagnosis of this infection by the Direct Agglutination Test, what it can allow its diffusion as a fast test in the field, allowing its use for independent professionals or units of health, and thus allowing to a bigger rapidity in the actions of prevention of this zoonose.

1 – INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, de distribuição mundial e que acomete todos os animais homeotérmicos, incluindo o homem. Apresenta desde quadros assintomáticos a manifestações sistêmicas graves. No homem a infecção atinge com maior gravidade e repercussão indivíduos imunocomprometidos e mulheres grávidas, na primoinfecção, podendo levar a óbitos, abortamentos, natimortos e mesmo lesões severas do sistema nervoso central (SNC). Deve-se levar em conta também os custos relacionados à doença, como os gastos com medicamentos, e a necessidade de acompanhamento médico durante o curso da doença, além das graves seqüelas na infecção transplacentária.

A produção de antígenos em quantidade e de qualidade, que atenda as necessidades do método empregado é importante para a padronização e difusão de uma técnica sorológica como o Método de Aglutinação Direta (MAD). O método de aglutinação direta (MAD) baseia-se na reação antígeno-anticorpo, usando como antígeno o próprio parasita, no estágio de taquizoíto. Uma vantagem da MAD é a possibilidade do tratamento do soro com 2- mercaptoetanol, o que diminui a inespecificidade da prova.

A produção *in vitro* de taquizoítos de *T.gondii* usando células de sarcoma murino da linhagem TG180 já tem sido empregada para a avaliação de medicamentos contra o parasita e para estudos sobre o seu desenvolvimento, assim pretende-se adaptar as células de sarcoma TG180 em histocultura, para posterior produção de antígeno de *T. gondii*, em quantidade e qualidade para uso no MAD.

O Método de Aglutinação Direta (MAD) é rápido, de baixo custo e não necessita de equipamentos sofisticados para sua realização e leitura, ampliando o seu uso por médicos veterinários autônomos e outros profissionais da área, tornando-se instrumento útil na avaliação epidemiológica de rebanhos e aplicação de medidas de prevenção e controle da doença.

Por outro lado, o cultivo celular para produção de antígeno dispensa a necessidade de utilização de animais de laboratório, permitindo a produção contínua de antígeno de qualidade e a baixo custo, sem contar ainda a relevância da não utilização de conjugado espécie-específico como na RIFI, que além de dificultar encarece a prova.

Assim buscou-se a padronização da produção em histocultura de células de sarcoma murino TG180 a fim de assegurar a produção de *Toxoplasma gondii* para uso em diagnóstico laboratorial da toxoplasmose.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por um protozoário, o *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia. Acomete todas as espécies animais, causando desde uma infecção assintomática a quadros sistêmicos extremamente graves (CARRUTHERS; 1999).

O *T. gondii* foi descrito pela primeira vez em 1908 por Nicolle e Manceaux no norte da África sendo isolado de um roedor denominado Gondi (*Ctenodactylus gondii*) e, ao mesmo tempo mas independentemente, por Splendore no Brasil, isolando-o de um coelho. A denominação *Toxoplasma gondii* origina-se dos vocábulos gregos *taxon* que significa “arco”, e *plasma* que significa “forma”, uma referência à aparência de “quarto crescente” ou “meia-lua” característica de um dos seus estágios de desenvolvimento; e *gondii* em referência ao roedor de onde se isolou o parasita (BLACK & BOOTHROYS; 2000). O *Toxoplasma gondii* é o único representante conhecido do gênero.

Durante seu desenvolvimento o *T. gondii* apresenta três estágios principais, os taquizoítos (do grego *taqui* = rápido), presentes na infecção aguda e com rápida proliferação e disseminação pelo hospedeiro devido às sucessivas multiplicações no vacúolo parasitóforo. Apresentam forma de “quarto crescente”, medindo em torno de 2 x 6 µm; os bradizoítos (do grego *bradi* = lento), formas de resistência encontradas principalmente nos tecidos musculares e no sistema nervoso central (SNC), sob a forma de cistos tissulares, são freqüentes na infecção crônica ou latente; e os oocistos, encontrados no intestino de felídeos como resultado da fase sexual do parasita e eliminados junto com as fezes. Cada oocisto mede em torno de 10 x 13 µm e possui em seu interior dois esporocistos, com quatro esporozoítos; e assim como os bradizoítos, podem causar infecção por meio da sua ingestão.

O parasita possui ciclo heteroxeno sendo os felídeos os hospedeiros definitivos e os demais animais homeotérmicos, os hospedeiros intermediários. Os felídeos de modo geral, e o gato particularmente, possuem importante papel na epidemiologia da

toxoplasmose, uma vez que eliminam centenas de milhares de oocistos pelas fezes durante a primoinfecção. A eliminação dos oocistos pelos felídeos, varia de acordo com a forma infectante do parasita, e pode ocorrer de três a dez dias após a ingestão de bradizoítos, e ao redor de 18 dias após a ingestão de oocistos esporulados, e de 13 dias após ingestão de taquizoítos (DUBEY, 1998).

A infecção pelo *T. gondii* pode se dar por três formas principais: a) por meio da ingestão de oocistos presentes no solo e areia (locais onde gatos ou outros felinos defecam), podendo ser disseminados por vetores mecânicos bem como carregados pela água, b) pela ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos (bradizoítos) de toxoplasma, e c) pela infecção transplacentária. Essa última, embora represente em seres humanos apenas 1% das infecções pelo toxoplasma, 40% dos fetos infectados são de mulheres que se infectaram durante a gravidez (VERONESI & FOCACCIA, 1999).

Durante o desenvolvimento do parasita pode-se distinguir dois ciclos principais, o ciclo enteroepitelial, nos hospedeiros definitivos e um extraintestinal nos hospedeiros intermediários. O ciclo enteroepitelial ocorre no intestino de felídeos, passando o parasita por cinco formas diferentes reprodutivas assexuadas e uma de gametogonia que termina com a produção de oocistos. O ciclo extraintestinal ocorre quando o hospedeiro intermediário ingere o oocisto esporulado ou carne e outros tecidos animais com cistos contendo bradizoítos. Na lâmina própria do intestino os bradizoítos transformam-se em taquizoítos que proliferam com rapidez e são levados pelos vasos linfáticos e circulação venosa aos pulmões onde se disseminam pelo organismo pela circulação arterial. Podem se propagar também, de uma célula a outra sendo disseminados por macrófagos, linfócitos e granulócitos, além de circularem como formas livres.

Por ser um parasita intracelular obrigatório as formas livres desaparecem em pouco tempo e os taquizoítos somente se encontram em células nucleadas, onde se desenvolvem com rapidez até destruí-las. Os taquizoítos podem invadir todas as células nucleadas de qualquer tecido, mas parasitam preferencialmente o sistema muscular e nervoso.

As cepas de *T. gondii* diferem em seu poder de invasão e taxa de multiplicação e, por conseguinte em sua virulência; variam também em sua patogenicidade havendo cepas que são virulentas para uma espécie animal e não para outras (DUBEY; 1997).

Como os danos causados ao hospedeiro pelo parasita ocorrem na fase aguda da primoinfecção ou durante a recidiva de uma infecção anterior, é de extrema importância a diferenciação entre a doença aguda e a crônica (VILLAVEDRA *et al*; 2001).

A resposta imune do hospedeiro resulta não somente na morte dos taquizoítos mas também no aparecimento de formas de resistência do parasita, originando o estágio de encistamento (bradizoíto) nos tecidos do hospedeiro, principalmente no tecido muscular e no SNC (ALEXANDER *et al*; 1997). Os cistos podem ser observados uma ou duas semanas após a infecção.

Os cistos teciduais são resistentes aos fatores ambientais e persistem no organismo durante anos ou por toda a vida do hospedeiro. O ciclo se reinicia quando outro hospedeiro intermediário ou definitivo ingere carne ou tecidos animais contendo cistos, sendo essa uma das formas de infecção mais comuns. Na espécie humana o significado dessa via como forma de infecção pode ser maior ou menor em decorrência dos hábitos culturais e alimentares de uma determinada população. Surtos de toxoplasmose aguda em humanos em várias regiões do mundo demonstram que as fontes de infecção variam enormemente em diferentes populações humanas, com diferenças culturais e alimentares.

Dentre as espécies animais, o rebanho suíno constitui talvez a mais importante fonte de infecção para o homem, sendo talvez a mais comum. A prevalência de *T. gondii* em suínos varia mundialmente, mas estimativas dos Estados Unidos sugerem uma variação de 3-20% dependendo da fase de criação do animal (GAMBLE *et al*; 1999).

Em ovelhas constitui a infecção mais prevalente sendo grande parte dos animais assintomáticos. Em animais não imunes a infecção pode chegar ao feto ocasionando abortos, natimortos, nascimento de animais fracos e cordeiros infectados (MARCA *et al*; 1996). O *T.*

gondii é uma das principais causas infecciosas de falhas reprodutivas em ovelhas da Austrália, Nova Zelândia, Grã-Bretanha, Estados Unidos e em outros países (FREYRE *et al*;1997).

DUBEY *et al* (1999) em estudos conduzidos em soros de eqüinos abatidos na América do Norte, para uso na alimentação encontraram 6,93% de positividade em, 1788 animais, revelando a importância desta espécie na cadeia de transmissão da toxoplasmose ao homem, a partir da ingestão de produtos cárneos.

Os primeiros relatos da doença em seres humanos foram feitos nas décadas de 1920 e 1930. Em 1923, JANKŮ observou o agente no olho de uma criança na Tchecoslováquia. TORRES em 1927, descreveu-o como causa de meningoencefalite congênita, miocardite e miosite. Em ambos os trabalhos foram descritos como *Encephalitozoon*, um protozoário de difícil distinção do *T. gondii* sem colorações especiais. Em 1937, WOLF & COWAN, relataram a doença em várias crianças e demonstraram a transmissão transplacentária, além de isolarem o parasita por inoculação em animal.

O *T. gondii* é talvez o protozoário parasita humano mais difundido que se conhece. Estima-se que 10 a 90% da população pode estar infectada dependendo da região que se analisa (CARRUTHERS, 1999). A frequência anual de soroconversão é estimada em cerca de 10% em crianças de 0 a 5 anos, 1% entre 6 e 20 anos e 0,3% acima dos 20 anos de idade. MEAD *et al* (1999), verificaram que a toxoplasmose é a terceira causa de óbitos de origem alimentar nos Estados Unidos.

ROBERTS *et al* (1994) estimaram que a transmissão congênita ocorre em 1 de cada 1000 nascidos vivos nos Estados Unidos. A incidência de infecção por *T. gondii* pré-natal, em diferentes países, esta estimada entre 1 a 100 para cada 10000 nascimentos.

A infecção causada pelo *T. gondii* embora assintomática em adultos saudáveis, pode ser importante agravo para mulheres grávidas na primoinfecção, por induzir embriopatias. Embora a maioria das infecções congênitas seja subclínica, fetos que desenvolvem a infecção podem sofrer abortamento, e nos neonatos cegueira ou mesmo prejuízos cognitivos graves. As duas últimas são irreversíveis e bastante

severas o que requer cuidados de saúde por muito tempo incluindo a hospitalização em alguns casos. Os custos estimados com cuidados de saúde em decorrência da toxoplasmose são estimados em 5,2 bilhões de dólares/ano somente nos Estados Unidos (ROBERTS *et al*, 1994).

No Brasil a taxa de prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em adultos varia de 54% no Centro-Oeste a 75% na região Norte (VERONESI & FOCACCIA, 1999). Em algumas áreas do mundo 50 a 90% da população apresentam anticorpos contra o parasita. Alguns países como a Tailândia, Japão e Estados Unidos apresentam baixa prevalência (< 20%), já a Austrália, Polônia, Reino Unido e Bélgica mostram prevalência média (entre 23 e 53 %), o Taiti e França apresentam alta prevalência (> 60%) (AVELINO *et al*; 2003).

Segundo VILLAVEDRA *et al* (2001), em pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com aids, a toxoplasmose causa encefalite e morte. Pacientes submetidos à transplantes de medula óssea podem reativar a toxoplasmose e apresentar taxas de mortalidade maiores que 90% (SLAVIN *et al*; 1994, DE MEDEIROS *et al*; 2001).

BRINDLE *et al* (1991), demonstraram que a toxoplasmose é a maior causa de mortalidade de pacientes com aids em países subdesenvolvidos, com recursos financeiros e de infra-estrutura limitados, para comprar e distribuir drogas anti-HIV. Estima-se que 30% dos pacientes com aids, soropositivos para o *T. gondii* irão desenvolver encefalite toxoplásmica (NAVIA *et al*; 1986).

Mesmo sendo no homem uma doença rara, estima-se que apenas nos Estados Unidos ocorram 1.437.500 novos casos de toxoplasmose por ano, com um custo aproximado de 445 milhões de dólares/ano, quando contabilizados os gastos com hospitalização, tratamento, escolas e cuidados especiais com crianças com retardo mental (TODD, 1989).

Para a espécie humana, o teste de aglutinação direta demonstrou sensibilidade de 95,0% e especificidade de 92,0% no estudo de OZKUYUMCU *et al* (1988). VALTAUD *et al* (1991), demonstraram que o teste de aglutinação direta proporcionou melhores

resultados que o ELISA quando comparados com a imunofluorescência indireta, com concordância de 97,4% e 96,1% respectivamente.

Freqüentemente é necessária uma grande produção de antígeno para ser usado em testes sorológicos, o que demanda uma quantidade significativa de animais, elevando não somente os custos financeiros mas levantando questionamentos éticos sobre o uso da técnica como diagnóstico de rotina. O uso de animais para fins científicos e mesmo didáticos tem suscitado amplos debates entre ativistas, população e cientistas, pelos direitos dos animais.

Em 1959, William Russel e Rex Burch, citados por VEISSIER (1999), escreveram um livro intitulado “Principles of Humane Experimental Technique”, onde os autores sugerem o delineamento do que deve ser um experimento correto envolvendo animais, e que ficou conhecido como o conceito dos três “R”. Sendo, *Refinement* (refinamento), procurando sempre os métodos de manejo, contenção e acomodação, que possam eliminar ou minimizar o sofrimento do animal ou mesmo melhorar seu bem-estar, *Reduction* (redução), considerando-se sempre métodos de trabalho que garantam a obtenção dos dados necessários avaliando sempre as necessidades estatísticas e reduzindo a quantidade de animais utilizados e *Replacement* (substituição), que é a busca por metodologias que diminuam ou eliminem a necessidade de utilização de animais vivos, como ocorre com os métodos *in vitro*.

A produção de antígeno, em cultivo celular, pode então ser utilizada para atender a demanda rapidamente, com extrema facilidade de obtenção de uma grande quantidade de taquizoítos intactos, de localização extracelular e com menor número de células, sem a utilização de modelos animais.

A produção de taquizoítos é essencial para todos os modelos experimentais, genéticos, da estrutura celular, dos ciclos bioquímicos e para a realização de testes com drogas contra o parasita, além de servirem para o desenvolvimento de estudos sorológicos e mesmo no isolamento do parasita (CHATTERTON *et al*; 2002; EVANS *et al*, 1999).

O *T. gondii* é de crescimento fácil, tanto em passagem em animais quanto em meios de cultura. Entretanto, um método que permita o fornecimento de taquizoítos de forma confiável e constante, e de boa qualidade, é fundamental para as pesquisas sobre o parasita.

HARMER *et al* (1996), relataram várias vantagens da sua produção por meio de cultivo *in vitro*, tais como: custo de investimentos e de manutenção baixo, e menor demanda de pessoal e de estrutura física. Embora o custo para a produção de taquizoítos *in vitro* seja estimado como sendo de um terço a metade do custo da sua produção em animais, o uso rotineiro desse método não é empregado com frequência (EVANS *et al*; 1999). COUATARMANACH *et al* (1991), citado por BARBOSA *et al* (2000), demonstraram que a cultura celular de TG180 pode produzir uma grande quantidade de taquizoítos de *T. Gondii* chegando a mais de 259 parasitas /células.

EVANS *et al* (1999) testaram a produção de taquizoítos em células das linhagens HeLa, LLC e células Vero, para a produção de antígeno de *T.gondii* encontrando bons resultados com as linhagens HeLa e LLC, principalmente da primeira, recomendando a utilização da mesma para a produção constante de antígenos para a prova do corante de Sabin-Feldman. Ressaltaram no entanto, que a manutenção dessas linhagens celulares e do parasita requer protocolos bem definidos a fim de se evitar a contaminação, além de cuidados com a manutenção das linhagens não infectadas, alertando, por outro lado que esses mesmos problemas são encontrados quando se utiliza a passagem e manutenção do agente em animais, como por exemplo em camundongos.

Dentre as provas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* têm-se o MAD que consiste em um teste simples, não espécie-específico e pode ser usado tanto em amostras de soros humanos quanto de animais. O MAD detecta apenas IgG, porque o 2-mercaptoetanol, utilizado no teste, inativa as IgM específicas e não específicas. No entanto, o teste pode ser realizado com a utilização de acetona ou formalina como fixadores dos taquizoítos, permitindo assim diferenciar as IgGs de fase aguda e crônica da infecção (WILSON *et al.*, 1990).

DUBEY (1997) analisou a especificidade do MAD para toxoplasmose, em amostras de soro de suínos, negativos para *T. gondii*, porém inoculados com outros agentes relacionados e não-relacionados a este protozoário, como o *Sarcocystis miescheriana*, vários vírus e helmintos como o *Trichuris suis*, o *Ascaris suum* e a *Trichinella spiralis*, além de verificar a presença em alguns porcos gnotobióticos e fetos suínos abortados. Nenhuma amostra sorológica foi positiva ao MAD, não havendo evidências de reação cruzada com outros antígenos utilizados e o *T. gondii*, o que reforça a importância do MAD como ferramenta diagnóstica na toxoplasmose, especialmente para a diferenciação da infecção aguda e crônica.

DESMONTS & REMINGTON (1980) utilizaram o 2-mercaptoetanol 0,2M para aumentar a sensibilidade do MAD, tornando-se uma técnica tão útil como a Reação de Sabin-Feldman (SF). Em 2000 amostras de soro de pacientes testadas, houve uma concordância excelente (98%) entre os dois métodos. Verificaram, ainda, que os títulos no MAD foram menores que os títulos para SF durante a infecção de fase aguda, enquanto que para a infecção de fase crônica foram maiores que na SF.

Desta forma o MAD pode ser utilizado como prova de triagem simples e barata, em várias situações, principalmente em mulheres soronegativas durante a gravidez, e para a detecção de soroconversões, em amostras de soros das diferentes espécies animais.

2 – OBJETIVOS

1. Adaptação por cultivo celular, de células da linhagem de sarcoma murino TG 180.
2. Produção em larga escala de antígeno de *T. gondii* em cultivo celular da linhagem TG 180, para utilização no diagnóstico sorológico pelo Método de Aglutinação Direta (MAD)
3. Avaliação do antígeno de *T. gondii* obtido em cultivo celular e a partir da inoculação de camundongos Swiss, quanto ao custo, mão-de-obra, quantidade e qualidade, especialmente quanto a especificidade e sensibilidade do MAD ao se comparar os dois antígenos, em amostras de soro de ratos Fisher sabidamente positivos e negativos para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais foram realizados nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Zoonoses - NUPEZO, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, SP.

3.1 – Animais de experimentação

Para a manutenção da linhagem de sarcoma murino TG 180 e das cepas de *T. gondii*, foram utilizados camundongos Swiss, albinos de 30 dias de idade, pesando 30 a 40 g. Para a produção de soros-controle foram utilizados ratos Fischer de 30 dias de idade, com peso variável, de 50 a 80 g. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu.

3.2 – Manutenção da linhagem de sarcoma murino TG 180

A manutenção das células da linhagem do sarcoma TG180 (SARTORELLI & BOOTH; 1961), foi realizada por meio de passagens em camundongos albinos Swiss a cada 12 dias, inoculando-se por via intraperitoneal cinco camundongos com idade entre 40 e 50 dias, com 0,2 mL de exsudato intraperitoneal contendo células do sarcoma TG180, recuperados de camundongos também previamente inoculados.

3.3 – Manutenção da cepa RH de *T. gondii*

A manutenção dos taquizoítos da cepa RH genótipo tipo I (isolada por Sabin em 1939), foi realizada por meio de inoculação intraperitoneal em cinco camundongos Swiss, a cada sete dias. Três a quatro dias após a inoculação foi realizado o lavado intraperitoneal, utilizando-se seringa de 10 mL contendo 5 mL de solução fisiológica 0,9% estéril para a recuperação dos taquizoítos. A seguir foi procedida a avaliação dos lavados, em microscópio de campo claro em aumento de 400x, escolhendo-se para

reinoculação aqueles que apresentavam maior número de taquizoítos e/ou rosetas viáveis, ou presença de grande número de células, descartando-se os hemorrágicos e/ou com presença de contaminantes.

Os lavados escolhidos para reinoculação foram armazenados à temperatura de refrigeração (4-8 °C) por até 15 dias. Para a manutenção das cepas reinoculou-se 1 mL do lavado anterior contendo os taquizoítos de *T. gondii*, em outros cinco camundongos Swiss de 30 dias.

3.4 – Produção dos soros-controle.

Os ratos Fischer foram agrupados da seguinte forma: Grupo 1 (G1) sendo quatro animais que receberam por via oral, 10^4 bradizoítos de *T. gondii*, com auxílio de gavage, e o Grupo 2 (G2) em que quatro animais receberam por via oral, solução salina 0,9% estéril, com auxílio de gavage (grupo controle).

Para a inoculação dos ratos dos grupos experimentais foi utilizada a cepa BTU 4 isolada de cérebro de cão com sintomatologia nervosa, atendido no ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais, do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, SP. A cepa foi previamente caracterizada como pertencente ao genótipo tipo I e mantida por inoculação intraperitonal semanal em camundongos Swiss, albinos. Esta cepa é patogênica para camundongos albinos e propicia a formação de cistos teciduais cerebrais em ratos.

Os animais foram mantidos sob observação por um período de três meses a partir da infecção, realizando-se colheitas semanais de sangue para obtenção de soro. Ao final do período de observação os animais foram sacrificados em câmara saturada com vapor de isofluorano.

3.5 – Teste de exclusão do corante – “*Dye Test Exclusion*”

O teste de exclusão do corante baseia-se na capacidade das células vivas de excluírem, do seu citoplasma, o corante adicionado à amostra a ser examinada. Dentre os corantes utilizados para a realização do teste, o Azul Tripán, pela facilidade de preparação, é o mais comumente utilizado para diferenciar células viáveis das não-viáveis. As células inviáveis absorvem o corante, aparecendo ao microscópio óptico coradas em azul e algumas vezes de forma assimétrica (Fig. 1 e Fig. 3); por sua vez, as células viáveis aparecem redondas e refringentes, sem absorver o corante. (Fig. 2).



FIGURA 1 – Células da Linhagem de Sarcoma TG 180 coradas com solução de Azul Tripán, em câmara de Neubauer (células não viáveis coradas em azul). Botucatu, 2007.

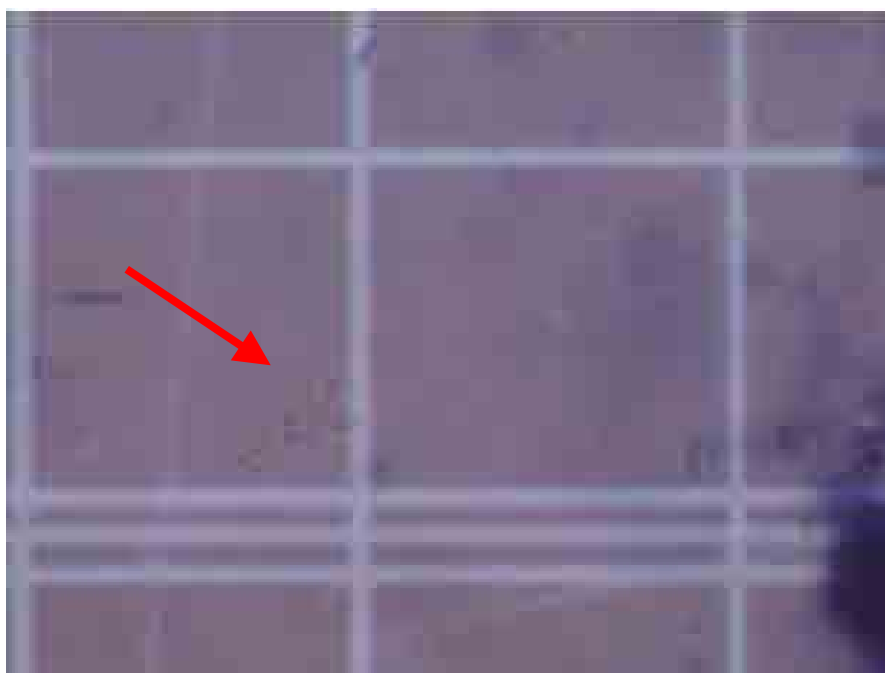


FIGURA 2 – Taquizoítos viáveis de *T. gondii* (aspecto refringente) em coloração pelo Azul Tripán. Botucatu, 2007.

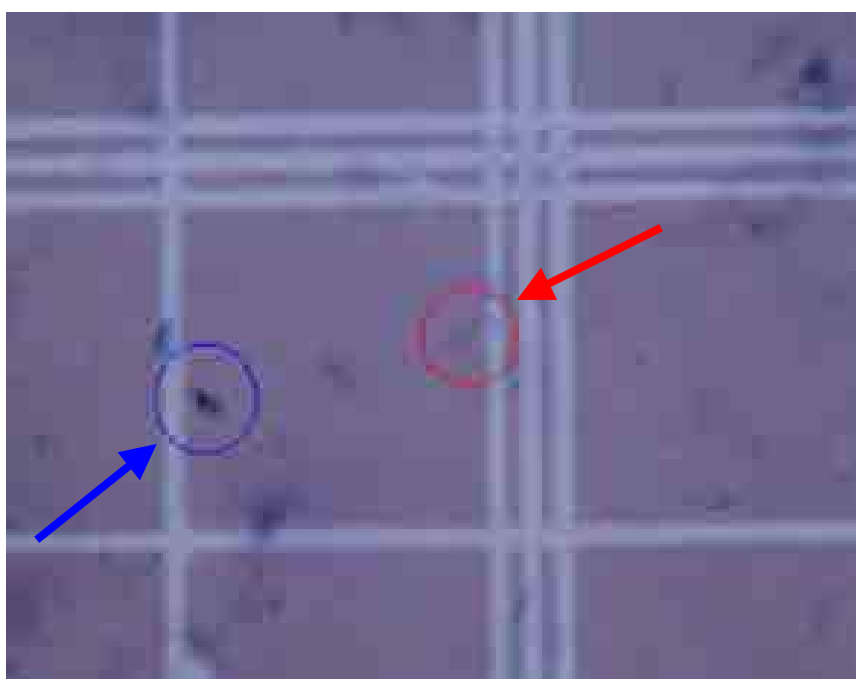


FIGURA 3 – Taquizoítos de *T. gondii* viáveis (seta vermelha) e inviáveis (seta azul). Colaração pelo Azul Tripán, em câmara de Neubauer (células não viáveis coradas em azul). Botucatu, 2007.

O teste, no entanto, é sensível ao tempo de permanência das células no meio contendo o corante; assim as células viáveis passam a absorvê-lo, e em caso de demora para realizar a contagem, os resultados do cálculo da sua viabilidade se alteram. Para se evitar que isso ocorra, é preciso estabelecer a diluição mais adequada antes da contagem, e o tempo de leitura. Desta forma impede-se que as células vivas absorvam o corante, e se mostrem como não-viáveis. Outro ponto importante ao se trabalhar com o Azul Tripán, é que ele apresenta maior afinidade por proteínas do soro do que por proteínas celulares; assim, para células cultivadas em concentrações de soro elevadas (maior que 2%), o fundo da câmara de Neubauer pode aparecer fortemente corado. Neste caso, as células foram centrifugadas a 600 G, e o pelet, ressuspensionado em solução salina tamponada de fosfato – SST – pH 7,2, ou em meio de cultura livre de soro antes da contagem.

O teste foi utilizado da mesma forma, para a contagem dos taquizoítos utilizados para a inoculação tanto das culturas, quanto dos animais, para a produção de antígeno.

3.6 – Preparo das amostras

Em microplacas de 96 poços, acrescentou-se 10 µl da amostra a ser avaliada (linhagem de sarcoma ou taquizoítos de *T. gondii*) e acrescentou-se 40 µl de solução Azul Tripán 0,4%, obtendo-se assim uma diluição 1:5, adicionando-se o corante apenas no momento da contagem evitando-se a sua absorção pelas células viáveis, em decorrência do fator tempo. Com auxílio de uma pipeta Pasteur ou de uma micropipeta, transferiu-se 10 µl da suspensão de células coradas, para a câmara de Neubauer, procedendo-se a leitura em microscópio óptico em aumento de 100X.

3.6.1 – Câmara de Neubauer e campos de contagem

Após o preparo das amostras a serem avaliadas, e prévia montagem em câmara de Neubauer, focou-se o centro da mesma em aumento de 100 X (Fig 4). Para avaliação foram utilizados apenas cinco campos aleatoriamente, preferencialmente na diagonal (Fig 5); Todas as células presentes nos 16 quadrados menores de cada um dos cinco campos escolhidos foram contadas excluindo-se aquelas que estivessem em contato com as linhas triplas à esquerda e inferior (marcadas em vermelho na Fig 6). Todas as células em contato com as linhas triplas da direita, e a superior foram contadas.

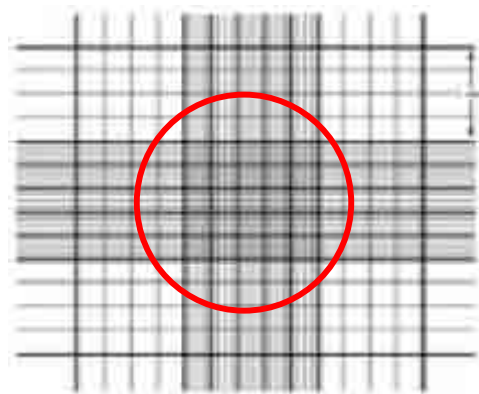


FIGURA 4 – Visão geral da câmara de Neubauer. Botucatu, 2007.

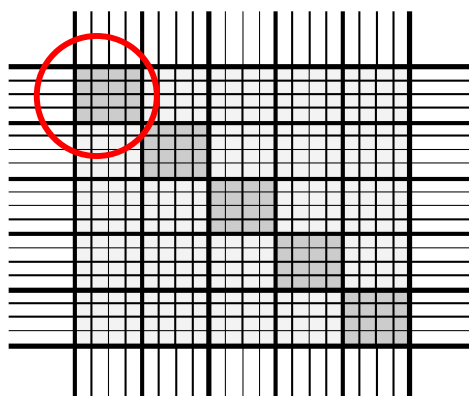


FIGURA 5 – Delimitação dos campos. Botucatu, 2007.

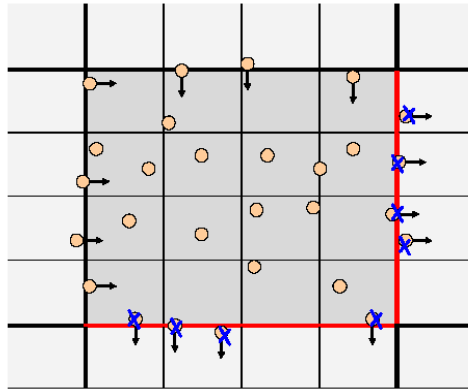


FIGURA 6 – Contagem das células. Botucatu, 2007.

3.6.2 – Avaliação das amostras

A avaliação das amostras foi feita segundo os critérios relacionados a seguir (MEDIATECH, 2004):

a. Número de células viáveis por mL (CV)

$$\text{CV: } \frac{\text{nº. de células viáveis}}{\text{nº. de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{Fator de Diluição}$$

Esse número foi utilizado para avaliação do cultivo da linhagem de sarcoma murino TG 180, na escolha das amostras utilizadas para os repiques das histoculturas e contagem dos taquizoítos viáveis. O fator de diluição foi variável em decorrência da necessidade de diluições maiores devido ao excessivo número de células presentes na amostra.

b. Número de células viáveis totais da suspensão original (VT)

VT: N°. de células viáveis totais X Volume da suspensão original

Esse número foi utilizado para se comparar a produção da linhagem TG180 em histocultura, e passagem intraperitonal em camundongos.

c. Viabilidade em porcentagem (V%)

$$\text{V\%: } \frac{\text{n}^\circ. \text{ de células viáveis}}{\text{n}^\circ. \text{ de células totais}} \times 100$$

Esse dado foi utilizado para a avaliação da qualidade das amostras analisadas. Esta variável fornece uma referência para análise de perdas na produção de células de sarcoma e dos taquizoítos.

3.7 – Colheita de materiais

3.7.1. Colheita de sangue

As amostras de sangue foram colhidas por punção do seio orbital previamente à inoculação dos ratos, e semanalmente durante o período de observação, por até três meses, incluindo-se o dia do sacrifício dos animais. O soro sangüíneo obtido por meio da centrifugação das amostras de sangue a 1600G por 10 minutos foi transferido para microtubos identificados e congelados a temperatura de -20°C para posterior realização dos exames sorológicos.

3.8 – Produção de antígeno para o método de aglutinação direta *in vivo*

3.8.1. Amostras da cepa RH de *Toxoplasma gondii* e de Sarcoma Murino TG 180

A manutenção das amostras de *Toxoplasma gondii* e de sarcoma Murino TG180 foi procedida de acordo com os itens 3.2 e 3.3.

3.8.2. Produção do antígeno

A produção do antígeno para a utilização no método de aglutinação direta (MAD), seguiu o protocolo abaixo, já padronizado para uso no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu.

Dia 0: foram inoculados cinco animais com a linhagem de sarcoma murino TG180, mantidas por repique a cada 12 dias no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, como descrito no item 3.2.

Dia 4: foram inoculados pela via peritoneal 10 camundongos Swiss (Grupo 3 – G3) com 30 dias de idade, com 1 mL de lavado peritoneal rico em taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii* (item 3.3).

Dia 7: foi realizado o lavado peritoneal dos camundongos do G3 com 10 mL de solução fisiológica 0,9%. Os lavados foram avaliados descartando-se aqueles que se apresentavam hemorrágicos ou com contaminação, sendo aproveitados somente os lavados ricos em taquizoítos. No caso de lavados peritoneais pobres em taquizoítos, eles foram concentrados mesmos, por centrifugação a 1000G por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante, ressuspensando-se a seguir o sedimento, em volume menor que o inicial, com solução fisiológica 0,9%. Após a avaliação e seleção dos lavados peritoneais do G3, inoculou-se 1 mL do lavado final obtido em 20 camundongos Swiss (Grupo 4 – G4), com 30 dias de idade, pela via peritoneal.

Dia 10: realizou-se o lavado do grupo 4, com 10 mL de solução fisiológica 0,9%. Novamente foram avaliados os lavados peritoneais, e aproveitados somente aqueles ricos em taquizoítos. No mesmo dia realizou-se a recuperação de células de sarcoma murino TG180 inoculadas no Dia 0, descartando-se os que se apresentavam hemorrágicos ou contaminados.

Após a seleção, os lavados contendo taquizoítos foram homogeneizados resultando um volume de 90 mL, que por meio do “*dye test*”, demonstrou uma concentração de $8,4 \times 10^3$ taquizoítos/mL. O recuperado de células de sarcoma murino TG180, foi de 20 mL, e pelo “*dye test*” revelou $1,05 \times 10^6$ células/mL.

Um volume de 7,5mL da suspensão de células de sarcoma foi diluída em 52,5mL de solução fisiológica 0,9% (diluição 1:8), obtendo-se um volume final de 60 mL, com uma concentração de $1,32 \times 10^5$ células/mL. A suspensão celular foi homogeneizada, volume/volume, com a suspensão antigênica de taquizoítos, totalizando 120 mL. A seguir, foram inoculados, pela via peritoneal, 60 camundongos Swiss (Grupo 5 – G5), com 30 dias de idade, com 2 mL da suspensão final para cada animal.

Dia 13: foram realizados os lavados dos camundongos do G5, com 5 mL de solução fisiológica 0,9%, homogeneizados e avaliados em microscópio óptico, separando somente aqueles ricos em taquizoítos e com poucas células. Os que continham muitas células e poucos taquizoítos foram descartados, resultando um volume final de 80 mL. A suspensão obtida foi submetida ao seguinte protocolo: 1) os lavados foram homogeneizados e centrifugados a 65g por 5 minutos; 2) o sobrenadante, rico em taquizoítos foi pipetado para outro tubo de centrífuga (o sedimento foi reservado); 3) centrifugou-se o sobrenadante a 440g por 20 minutos; 4) o sedimento resultante da segunda etapa, foi ressuspensionado em solução fisiológica 0,9%; 5) e centrifugado a 260G por 10 minutos; 6) o sobrenadante foi então adicionado à suspensão obtida no passo 2, totalizando 64,5 mL, que foi submetida à técnica de fixação do antígeno pela formalina, também padronizada para uso no laboratório. Durante a preparação do antígeno, a suspensão foi mantida em gelo seco, para preservação de sua viabilidade.



FIGURA 7 – Aspecto do aspirado peritoneal de sarcoma murino TG 180. Botucatu, 2007.

3.8.3. Fixação do antígeno pela formalina

Homogeneizou-se volume/volume, a suspensão final contendo os taquzoítos, com solução de formalina-12%, diluída em PBS 7,2, mantendo-se *overnight* a 4°C. A seguir, centrifugou-se a 600G por 10 minutos, ressuspensando-se o sedimento em 50mL de PBS 7,2. O processo foi repetido mais duas vezes, para remover o formaldeído, e finalmente ressuspendeu-se em solução tampão borato pH 8,7, garantindo uma concentração de 2×10^4 parasitas por μL . A solução final de 11 mL, foi conservada a 4°C (DESMONTS & REMINGTON, 1980).

3.8.4. Titulação do antígeno

Para a titulação do antígeno foram usadas três amostras de soros sabidamente positivas (com títulos maiores que 256) e três sabidamente negativas. Os soros testados foram diluídos em microplaca de fundo chato. Em cada poço a ser utilizado foi acrescentado

150µl de PBS 7,2. Nos primeiros poços adicionou-se 10µl da amostra (diluição 1:16); após homogeneização com auxílio de micropipeta transferiu-se 50µl para o poço seguinte (diluição 1:64), homogeneizou-se novamente e transferiu-se 50µl para o poço seguinte (diluição 1:256). A seguir, 25µl de cada diluição de todas as amostras testadas foram transferidos, para os respectivos poços em uma microplaca de fundo “V”; adicionando-se 25µl de solução de 2-mercaptoetanol 0,2 M e 50 µl do antígeno já diluído em solução tampão borato pH 8,7, nas razões 1:5, 1:10, 1:15 e 1:20. A placa foi selada com filme plástico e homogeneizada por um minuto, sendo incubada à temperatura ambiente por seis horas, procedendo-se a leitura. Para os resultados positivos considerou-se a formação de uma “rede” ou película em pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativos aqueles com formação de um botão no fundo dos poços. A diluição do antígeno que mostrou melhor resultado foi 1:5.

3.9. Sorologia pelo método de aglutinação direta

Foram testados 19 soros-controle positivos e 11 negativos, pelo método de aglutinação direta de acordo com o proposto por DESMONTS & REMINGTON (1980).

Os soros testados bem como os controles positivo e negativo, foram diluídos em microplaca de fundo chato, nas diluições 1:16, 1:64 e 1:256, como descrito anteriormente, procedendo-se dessa forma para todos os soros testados. A seguir, 25µl de cada diluição testada foi transferida para os respectivos poços em microplaca de fundo “V”; acrescentando-se em cada uma delas 25µl de solução de 2-mercaptoetanol 0,2 M e 50 µl do antígeno já diluído em solução tampão borato pH 8,7, na diluição 1:5. A placa foi selada com filme plástico, homogeneizada por um minuto e incubada a temperatura ambiente por seis horas, procedendo-se após esse período, a leitura dos resultados, conforme descrito anteriormente.

3.10 – Produção da linhagem de Sarcoma Murino TG180 em histocultura

Seguindo o protocolo desenhado no pré-projeto, cada garrafa de 25 cm² de histocultura recebeu 5 mL de Meio de Eagle Modificado (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células de sarcoma murino TG180 foram contadas para determinação de sua viabilidade, sendo cada garrafa inoculada com $6,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. Após esse processo as garrafas eram mantidas em estufa de cultivo em atmosfera de 5% de CO₂ a temperatura de 37 °C.

A partir do 2º dia, a passagem de células da linhagem TG180 para novos meios, era realizada em função do crescimento celular e conseqüente demanda de nutrientes determinada pelo início de mudança na cor do meio; assim a troca podia ser diária ou a cada dois dias. As garrafas inoculadas foram avaliadas diariamente para observação do desenvolvimento celular em microscópio de luz invertida e também pela contagem de células viáveis, a fim de se determinar o melhor momento de uso.

3.10.1 – Adaptação a partir de amostras criopreservadas

As células de sarcoma murino TG180 mantidas em nitrogênio líquido foram descongeladas e contadas para determinação de sua viabilidade. A seguir foram inoculadas segundo o protocolo de trabalho. Após 12 horas a suspensão de cada garrafa, contendo células e meio, foram centrifugadas em tubos de Falcon, a 1000G por 10 minutos sendo o sobrenadante desprezado e o pelete formado ressuspensionado em 5 mL de meio MEM. Essa troca se faz necessária em decorrência da toxicidade do DMSO (utilizado no protocolo de criopreservação) em temperaturas acima de 4º C. A partir dessa primeira troca de meio, seguia-se o protocolo assinalado anteriormente.

As garrafas inoculadas com amostras de sarcoma criopreservadas não conseguiam manter a viabilidade adequada a partir da 3ª passagem, sendo inviável a princípio o uso dessas amostras para a produção em larga escala.

3.10.2 – Adaptação a partir de amostras frescas

A amostra de sarcoma murino TG180 mantida *in vivo* no Laboratório de Diagnóstico de Zoonoses, foi colhida de camundongos albino swiss, com idade entre 40 e 50 dias, inoculados previamente e mantidos no infectório do mesmo laboratório.

Para a utilização no experimento o animal escolhido foi sacrificado e realizou-se o aspirado do conteúdo peritoneal com seringa de 10 mL, até o máximo volume conseguido. A amostra foi mantida em câmara de gelo para a preservação da integridade celular. Posteriormente a amostra foi diluída (V/V) e homogeneizada com solução salina tamponda com antibióticos (SST + ATB) contendo estreptomicina 5.000 UI/mL e penicilina mg/mL, também resfriada para a preservação da amostra.

Para a realização da contagem de células viáveis, levou-se em consideração a afinidade do Azul Tripán por proteínas plasmáticas e o excesso de exsudato presente na amostra, em decorrência da reação inflamatória local. Desta maneira, realizou-se a lavagem desse material, segundo dois protocolos distintos:

A) No primeiro protocolo metade da amostra inicial foi centrifugada a 1000G por 10 minutos, descartando o sobrenadante e ressuspensando o pelete formado em volume igual ao da suspensão inicial; repetindo-se o processo mais duas vezes e por fim ressuspensando-se o pelete em 5 mL de SST + ATB, a partir do qual a contagem foi realizada;

B) A segunda parte da amostra foi centrifugada a 800G por 10 minutos descartando o sobrenadante e ressuspensando o pelete formado em volume igual ao da suspensão inicial; repetindo-se o processo mais duas vezes e por fim ressuspensando-se o pelete em 5 mL de SST + ATB, a partir do qual a contagem foi realizada.

Após a realização da contagem para cálculo da viabilidade das amostras verificou-se que o segundo protocolo permitiu a preservação de um maior número de células viáveis, sem

comprometer a leitura em decorrência de excessiva coloração de fundo pelo Azul Tripán.

4 – RESULTADOS

Levando-se em consideração o tipo de pesquisa realizada, cujos objetivos eram a adaptação por cultivo celular, de células da linhagem de sarcoma murino TG 180, a produção em larga escala de antígeno de *T. gondii* para utilização no diagnóstico sorológico pelo Método de Aglutinação Direta (MAD), e a avaliação do antígeno de *T. gondii*, quanto ao custo, mão-de-obra, quantidade e qualidade, e especialmente a especificidade e sensibilidade do MAD, ao comparar os dois antígenos, frente a amostras de soro de ratos Fisher sabidamente positivos e negativos para anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*; parte dos resultados já foram descritos, juntamente com a metodologia, pois algumas adaptações foram sendo realizadas ao longo da fase experimental, em função dos resultados que estavam sendo obtidos.

Procurar-se-á mostrar os resultados mais significativos quanto a produção do antígeno. Na produção *in vivo* de antígeno para MAD, além das perdas de amostras de sarcoma devido a hemorragia (contaminando o lavado com hemácias, ocasionando uma baixa qualidade do antígeno) e da morte de alguns animais, notou-se que:

1. O volume total de aspirado de sarcoma murino TG180, não foi aproveitado em sua totalidade, tinha que ser diluído em PBS pH 7,2;
2. O volume de lavados contendo taquizoítos era muito próximo do que seria utilizado, entretanto eventualmente poderia ser descartado um volume maior;
3. A contagem das células de sarcoma murino e de taquizoítos viáveis revelaram concentrações inferiores às estabelecidas no protocolo de trabalho (respectivamente $1,32 \times 10^5$ células/mL de aspirado e $8,4 \times 10^3$ taquizoítos/mL de lavado peritonal);
4. Ao serem homogeneizadas para posterior inoculação nos 60 animais, as concentrações resultantes foram respectivamente de $8,25 \times 10^3$ células de sarcoma/mL e de $4,2 \times 10^3$ taquizoítos/mL (numa razão de 1,96:1), muito abaixo do que se estabeleceu para a histocultura (6×10^5 células de sarcoma/mL de meio de cultura e 1×10^6 taquizoítos/mL de meio, em uma razão de 3:1);

5. Optou-se, para não prejudicar o volume final do inóculo (células sarcomatosas + taquizoítos), não se ajustando as concentrações para os valores propostos para a histocultura.

Os resultados referentes às células viáveis, inviáveis e células totais trabalhando-se com amostras de sarcoma murino TG180 criopreservadas e frescas podem ser observados na Tabela 1.

TABELA 1 – Número de células de amostras criopreservadas e frescas. Botucatu, 2007.

Condição	Amostra Criopreservada	Amostra fresca	
		Protocolo 1	Protocolo 2
Células Viáveis	270	212	388
Células Inviáveis	385	134	59
Células Totais	655	346	447

Utilizando as fórmulas para o cálculo do Número de células viáveis por mL (CV), Número de células viáveis totais da suspensão original (VT) e Viabilidade em porcentagem (V%) descritas no item 3.6.2, chegou-se aos resultados apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – Resultados obtidos com relação ao conteúdo celular de amostras criopreservadas e amostras frescas. Botucatu, 2007.

Condição	Amostra Criopreservada	Amostra fresca	
		Protocolo 1	Protocolo 2
Volume inicial	2 mL	5 mL	5 mL
CV (células/mL)	$1,35 \times 10^4$	$10,6 \times 10^5$	$19,4 \times 10^5$
VT (células Totais)	$2,7 \times 10^5$	$21,2 \times 10^5$	$38,8 \times 10^5$
V%	41,22%	61,27%	86,80%

Em relação à adaptação das células e a produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura pode-se observar que:

1. A adaptação das células de sarcoma murino TG180 em histocultura a partir de amostras criopreservadas, não se mostrou adequada devido a baixa viabilidade celular, optando-se pelas amostras oriundas de passagem em camundongo, submetidas ao protocolo 2 como de melhor resultado.

2. As células da linhagem de sarcoma apresentam grande degeneração a partir da quarta passagem, dificultando a sua manutenção por um maior período, o que seria desejável para facilitar a produção do antígeno.

3. A produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura embora viável, apresentou um baixo rendimento, uma vez que as amostras de sarcoma murino apresentavam uma perda significativa de viabilidade e dessa forma a multiplicação intracelular do parasita.

4. Avaliando-se os antígenos produzidos, não houve discordância dos resultados sorológicos frente às amostras de soros escolhidos como padrão para o método de aglutinação direta, na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

5. Foram testadas 30 amostras de soro de ratos (19 sabidamente positivas e 11 negativas) como descrito anteriormente, com o antígeno produzido, avaliando-se os resultados. Foram testadas apenas para as diluições de 1:16, 1:64 e 1:256, cujos resultados estão expressos no Quadro 1;

QUADRO 1 – Comparação dos resultados sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* utilizando-se antígenos produzidos a partir da inoculação intraperitoneal em camundongos (in vivo) e em histocultura. Botucatu, 2007.

Amostra	Antígeno		Amostra	Antígeno	
	<i>in vivo</i>	histocultura		<i>in vivo</i>	histocultura
1	256	256	16	64	64
2	64	64	17	64	64
3	256	256	18	64	64
4	256	256	19	256	256
5	64	64	20	Negativo	Negativo
6	256	256	21	Negativo	Negativo
7	256	256	22	Negativo	Negativo
8	64	64	23	Negativo	Negativo
9	256	256	24	Negativo	Negativo
10	256	256	25	Negativo	Negativo
11	64	64	26	Negativo	Negativo
12	256	256	27	Negativo	Negativo
13	64	64	28	Negativo	Negativo
14	64	64	29	Negativo	Negativo
15	64	64	30	Negativo	Negativo

5 – DISCUSSÃO

A discussão deve ser entendida como esclarecimento dos resultados obtidos na presente pesquisa, pois não há dados na literatura que permitam a sua discussão, uma vez que foram ensaiadas possibilidades de obtenção de um antígeno que permitisse a realização da MAD com resultados seguros, conferindo à prova sensibilidade e especificidade para a sua padronização.

Na produção do antígeno *in vivo* pela inoculação intraperitoneal de camundongos há um significativo descarte de material que a princípio poderia ser aproveitado com um volume maior de inóculo, entretanto, a utilização de um número maior de camundongos inoculados, estaria se criando também um impasse no que diz respeito aos princípios de bioética que nortearam a execução desse trabalho, quanto a redução, ou utilização do menor número possível de animais no experimento.

É preciso considerar ainda, os custos para a manutenção de um número maior de animais e a necessidade de espaço físico para acomodação adequada. Outro dado importante é a ausência de padronização das concentrações de células de sarcoma e de taquizoítos, o que ocasiona uma menor eficiência na produção *in vivo*, além de possibilitar variações significativas entre partidas de antígenos diferentes, o que inviabilizaria a produção em larga escala. Comparando-se o que fora estabelecido no protocolo para produção *in vitro*, uma única garrafa de histocultura já inoculada para produção de antígeno, teria três vezes mais células de sarcoma e duas vezes mais taquizoítos inoculados do que nos 120 mL de inóculo produzido *in vivo*.

Em relação à produção em histocultura a literatura tem relatado a produção de linhagens celular de sarcoma murino TG 180 na produção de taquizoítos de *T.gondii*, objetivando estudos de novos fármacos e para estudos de fisiologia do parasita. Entretanto as mesmas têm utilizado amostras já adaptadas em meio de cultura. (EVANS *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2000; CHATTERTON *et al.*, 2002)

A perda de viabilidade das amostras de sarcoma murino aumenta o custo de produção uma vez que é necessário

refazer o repique a partir de amostras frescas. Para a resolução desse problema pode-se adquirir linhagens de sarcoma em laboratórios em que a produção esteja padronizada, fato que deve ser avaliado, pois nem sempre é fácil a sua obtenção, transporte, entre outros aspectos.

Embora comparadas a adaptação do sarcoma murino a partir de amostras criopreservadas e frescas, deve-se ressaltar que a utilização de outros protocolos de criopreservação devem ser avaliados a fim de minimizar os problemas no que se refere à baixa viabilidade celular.

A produção de taquizoítos pode ser melhorada com a utilização de amostras de sarcoma murino, já adaptadas, pois a viabilidade baixa acarreta na não multiplicação do *T. gondii*, refletindo diretamente na menor produção de taquizoítos.

Em decorrência das dificuldades de adaptação em histocultura da linhagem de sarcoma, a produção de antígeno de *T. gondii* não foi obtida, como imaginou-se inicialmente. O antígeno produzido nas condições do presente estudo foi utilizado para a comparação frente ao produzido em camundongos, frente a MAD, não revelando diferenças quanto aos resultados na detecção de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*. (Quadro 1).

Apesar dos resultados apresentados não corresponderem na íntegra aos objetivos pretendidos, a produção de antígeno em histocultura, pode ser variável, devendo-se, entretanto, avaliar outros aspectos referentes à linhagem celular, para se assegurar a multiplicação taquizoítica, para a estabilização e padronização de uma técnica segura para a pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

6 –CONCLUSÕES

1. A produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura de sarcoma murino TG180 mostra-se viável e de fácil manutenção no laboratório.

2. Em relação à qualidade do antígeno produzido em histocultura não houve discordância de resultado com o obtido segundo a técnica de passagem em camundongos, na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*.

3. Face aos resultados obtidos sugerem-se novos estudos para a obtenção da linhagem de sarcoma murino TG180 para a produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em larga escala.

7 –BIBLIOGRAFIA¹

- ALEXANDER, J.; SCHARTON-KERSTEN, T.M.; YAP, G.; ROBERTS, C.W.; LIEW, F.Y.; SHER, A. Mechanisms of innate resistance to *Toxoplasma gondii* infection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, n. 352, p.1355-1359, 1997.
- AVELINO, M.M.; CAMPOS JÚNIOR, D.; PARADA, J.C.B.; CASTRO, A.M. Preganacy as a risk factor for acute Toxoplasmosis seroconversion. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.108, p.19-24, 2003.
- BARBOSA, H.M.R; SILVA, M.; FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R. Ultrastructural study of TG180 murine sarcoma cell invasion by *Toxoplasma gondii* comparison between *in vivo* and *in vitro* cell culture. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.2, p.265-270, 2000
- BLACK, M.W. & BOOTHROYD, J.C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.64, n.3, p.607-623, 2000.
- BRINDLE, R.; HOLLIMAN, R.; GILKS, C.; NAIYAKI, P. *Toxoplasma* antibodies in HIV-positive patients from Nairobi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, n. 85, p-750-751, 1991.
- CARRUTHERS, V.B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses and arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International*, v.48, p.1-10, 1999.
- CARRUTHERS, V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Tropica*, v.81, p.111-122, 2001.
- CHATTERTON, J.W.M.; EVANS, R.; ASHBURN, D.; JOSS, A.W.L.; HO-YEN, D.O. *Toxoplasma gondii* in vitro culture for experimentation. *Journal of Microbiological Methods*, n.52, p.331-335, 2002.
- CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Toxoplasmose: In: _____ *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 1.ed. Medsi, 1992, p.757-766.
- CURI, P.R. *Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas*. Botucatu. Tipomic, 1997, 263p.

¹ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências bibliográficas.

DE MEDEIROS, B.C.; DE MEDEIROS, C.R.; WERNER, B.; LODDO, G.; PASQUINI, R.; BLEGGI-TORRES, L.F. Disseminated toxoplasmosis after bone marrow transplantation: report of 9 cases. *Transplant Infectious Disease*, n.3, p.24-28, 2001

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, v.11, p.562-568, 1980.

DUBEY, J.P.; ANDREWS, C.D.; THULLIEZ, P.; LIND, P.; KWOK, O.C.H. Long-term humoral antibody responses by various aerologic tests in pigs orally inoculated with oocysts of four strains of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, v.68, p.41-50, 1997.

DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; SPEER, C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cyst. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, n.2, p.267-299, 1998.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P.; ROMAND, S.; KWOCK, O.C.A.; SHEN, S.K.; GAMBLE, H.R. Serologic prevalence of *Toxoplasma gondii* in horses slaughtered for food in North America. *Veterinary Parasitology*, v.86, p.235-238, 1999.

EVANS, R.; CHATTERTON, J.W.M.; ASHBURN, D.; JOSS, A.W.L.; HO-YEN, D.O. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, n.18, p.879-884, 1999.

FREYRE, A.; BONINO, J.; FALCÓN, J.; CASTELLS, D.; CORREA, O.; CASARETTO, A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, v. 73, p.13-15, 1997.

GAMBLE, H.R.; BRADY, R.C.; DUBEY, J.P. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in domestic pigs in the New England states. *Veterinary Parasitology*, v. 82, p.129-136, 1999.

HARMER, C.; HASSL, A.; KREINECKER, S.; ASPÖCK, H. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. *Journal of Microbiological Methods*, v.27, n°2-3, p.225-228, 1996.

JOHNSON, J.; DUFFY, K.; NEW, L.; HOLLIMAN, R.E.; CHESSUM, B.S. Direct agglutination test and other assays for measuring antibodies to *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Pathology*, v.42, p.536-541, 1989.

MARCA, M.C.; RAMOS, J.J.; PORTE, A.; SÁEZ, T; SANZ, M.C. Comparison of indirect immunofluorescent antibody test and modified direct agglutination test methods for detection of *Toxoplasma gondii* antibodies in adult sheep in Spain. *Veterinary Parasitology*, v.67, p.99-103, 1996.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, v.5, p.607-625, 1999.

MEDIATECH, INC. Counting Cells – Technical Information Sheet. Disponível em <<http://cellgro.bizatomic.net/shop/customer/pages.php?pageid=29>> Acesso em 06 de junho de 2004.

NAVIA, B.A.; PETITO, C.K.; GOLD, J.W.; CHO, E.; JORDAN, B.D.; PRICE, R.W. cerebral toxoplasmosis complicating the acquired immune deficiency syndrome: clinical e neuropathological findings in 27 patients. *Annals of Neurology*, n.19, p.224-238, 1986.

OZKUYUMCU, C.; DURUPINAR, B.; GIRISKEN, E. Comparison of the IFA, ELISA IgG, ELISA IgM, IHA and the direct agglutination tests in *Toxoplasma gondii*. *Mikrobiology Bulletin*, v.22, p. 2171-275, 1988.

ROBERTS, T.; FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.249-256, 1994.

SARTORELLI, A. C. & BOOTH, B. A.. Studies on mechanisms of therapeutic synergy by combinations of asazerine and purine analogs. *Fed Proceed*, v.20, p.156, 1961.

SLAVIN, M.A.; MEYERS, J.P.; REMINGTON, J.S.; HACKAMAN, R.C. *Toxoplasma gondii* infection in marrow transplant recipients: a 20 year experience. *Bone Marrow Transplant*, n.13, p.549-557, 1994.

TODD, E.C.D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *Journal of Food Protection*, v.52, p.595-601, 1989.

VAULTAUD, E.; LACROIX, C.; RODIER, M.H.; TOULLAT, G.; JACQUEMIN, J.L. Critical study of ELISA technique and high sensitivity direct agglutination test for the screening of antitoxoplasma IgG. *Annales de Biologie Clinique*, v.49, p.397-400, 1991.

- VEISSIER, I. Expérimentation animale: biologie, éthique, réglementation. *INRA Productions Animales*, n.12, p.365-375, 1999.
- VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*, 2^a ed. São Paulo, Atheneu, 1999. 1764p
- VILLAVEDRA, M.; RANSPOLDI, C.; CAROL, H.; BAZ, A.; BATTISTONI, J.J.; NIETO, A. Identification of circulating antigens, including an immunoglobulin binding protein, from *Toxoplasma gondii* tissue cyst and tachyzoites in murine toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.21-28, 2001.
- WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.277-281, 1990.

ANEXO

a) Preparo da solução-mãe de Azul Tripan a 0,4%

Em um Becker de 100 mL contendo 49,8 mL de solução diluente (PBS 7,2), adicionou-se 0,2 mg de Azul Tripan. A solução foi homogeneizada e conservada, devidamente identificada (nome da solução, data e concentração), em geladeira. No momento da utilização a mesma foi agitada levemente.

Para a utilização na contagem de taquizoítos foram testadas duas concentrações de solução de Azul Tripan a 0,2% e 0,4%, sendo esta última a que apresentou melhor resultado.

b) Tampão Borato (pH 8,7)

Para o preparo do tampão borato pH 8,7, adicionou-se em 976 mL de água deionizada, 7,2g de cloreto de sódio (NaCl), 3,09g de ácido bórico (H_3BO_3), 4g de albumina plasmática bovina fração V e 24 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1Normal.

c) Solução salina tamponada de fosfato 0,01 M, pH 7,2 (PBS 7,2)

Para o preparo de PBS 7,2, adicionou-se em um litro de água deionizada 8,183g de cloreto de sódio (NaCl), 1,051g de fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) e 0,358g de fosfato de sódio monobásico anidro ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$). Aferiu-se o pH, ajustando se necessário para pH 7,2.

d) 2-Mercaptoetanol 0,2M

Para o preparo da solução de 2-mercaptoetanol (2-ME), adicionou-se 14 μ L de 2-mercaptoetanol em 1 litro de PBS 7,2. Estocou-se por um mês em frasco âmbar, armazenado em caixa com tampa, à temperatura ambiente.

e) Materiais e Equipamentos

Estufa de CO ₂	SANYO
Placa p/ microtitulação fundo V s/tampa	KIMA
Frascos p/ cultura celular 25cm ² , cap. 50 ml	GREINER
Azul Trypan em pó	NUCLEAR
MEM (Minimal Essential Medium Eagle) RT	SIGMA
Soro Fetal Bovino Esteril, DI	NUTRICELL
Câmara de Neubauer, dupla, espelhada	SATELIT
Tubos tipo Eppendorf® 2,0ml	SSI
Ponteiras para micropipetas de 5 a 250 µl	SSI
Micropipetas	EPPENDORF

***Produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em células de sarcoma murino TG180²**

Antigen production of *Toxoplasma gondii* in cells of sarcoma murino TG180

Producción del antígeno del *Toxoplasma gondii* en células del sarcoma murino TG180

André Peres Barbosa de Castro³

Helio Langoni⁴

RESUMO

A toxoplasmose é uma protozoonose causada pelo *Toxoplasma gondii*, de distribuição mundial e que acomete todos os animais homeotérmicos, incluindo o homem. Apresenta desde quadros assintomáticos a manifestações sistêmicas graves. Nos seres humanos a infecção atinge com maior gravidade principalmente indivíduos imunocomprometidos e gestantes, sendo que a primoinfecção, pode levar a óbitos, abortamentos, natimortos além de lesões severas do sistema nervoso central.

Técnicas sorológicas precisas de fácil aplicação a campo e de menores custos, podem auxiliar na promoção de medidas de prevenção e controle, mas para isso é importante garantir a produção de antígenos em quantidade e de qualidade, a fim de atender as necessidades do método empregado, para garantir a sua padronização.

A produção *in vitro* de taquizoítos de *T.gondii* usando células de sarcoma murino TG180 em histoculturas, mostra-se uma alternativa viável para a produção de antígeno de *T. gondii*, em quantidade e qualidade para uso no diagnóstico dessa infecção utilizando-se o Método de Aglutinação Direta (MAD), o que pode permitir sua difusão como um teste rápido a campo, possibilitando a sua utilização por profissionais autônomos ou unidades de saúde, e podendo-se assim agilizar com uma maior rapidez as ações de prevenção dessa zoonose.

Palavras-chave: Toxoplasmose, Diagnóstico, Sarcoma Murino TG180, *Toxoplasma gondii*

* Redigido como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Unesp.

² Pesquisa financiada pela FAPESP

² Pesquisa financiada pela FUNDUNESP

³ Discente do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – campus de Botucatu

⁴ Docente do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP – campus de Botucatu.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is one protozoonosis caused by *Toxoplasma gondii*, of world-wide distribution and that acomete to all the animals, including the man. It presents since without symptoms until serious clinical manifestations.

In the human beings the infection reaches with bigger gravity immunocompromised patients individuals mainly and pregnant woman, being that the primary infection, it can take the deaths, abortions, stillborn beyond severe injuries of the central nervous system.

Serologicals techniques of easy application in the field and of lesser costs, can assist in the promotion of measures of prevention and control, but for this it is important to guarantee the production of antigens in amount and quality, in order to take care of the necessities of the employed method to guarantee its standardization. The production in vitro of tachyzoites of *T.gondii* using cells of sarcoma murine TG180 in histoculture, reveals to a viable alternative for the antigen production of *T. gondii*, in amount and quality for use in the diagnosis of this infection by the Direct Agglutination Test, what it can allow its diffusion as a fast test in the field, allowing its use for independent professionals or units of health, and thus allowing to a bigger rapidity in the actions of prevention of this zoonose.

Key words: Toxoplasmosis, Murine Sarcoma TG180, Diagnosis, *Toxoplasma gondii*.

RESUMEN

El toxoplasmosis es un protozoonosis causado por el *gondii* de *Toxoplasma*, de la distribución mundial y de ese acomete a todos los animales, incluyendo el hombre. Presenta desde entonces sin síntomas hasta manifestaciones clínicas serias. En los seres humanos que la infección alcanza con una gravedad más grande inmunocompromised a individuos de los pacientes principalmente y mujer embarazada, siendo que el infección primario, él puede tomar las muertes, abortos, stillborn más allá de lesiones severas del sistema nervioso central.

Las técnicas de Serologicals del uso fácil en el campo y de pocos costes, pueden asistir a la promoción de medidas de prevención y de control, pero para esto es importante garantizar la producción de antígenos en cantidad y calidad, para tomar el cuidado de las necesidades del metodo empleado para garantizar su estandarización. La producción in vitro de tachyzoitos de *T.gondii* usando las células del sarcoma murino TG180 cultivo celular, revela a un alternativa viable para la producción del antígeno del *T. gondii* en cantidad y calidad para el

uso en la diagnosis de esta infección por la prueba de aglutinación directa, qué puede no prohibir a su difusión como prueba rápida en el campo, permitiendo su uso para los profesionales independientes o las unidades de la salud, y así permitiendo a una rapidez más grande en las acciones de la prevención de este zoonose.

Palabras-clave: Toxoplasmoses, Sarcoma Murino TG180, Diagnosis, *Toxoplasma gondii*.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma zoonose de distribuição mundial, causada por um protozoário, o *Toxoplasma gondii*, pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse Coccidia. Acomete todas as espécies animais, causando desde uma infecção assintomática a quadros sistêmicos extremamente graves. Pode se dar por três formas principais: a) por meio da ingestão de oocistos presentes no solo e areia (locais onde gatos ou outros felinos defecam), podendo ser disseminados por vetores mecânicos bem como carregados pela água, b) pela ingestão de carne crua ou mal-cozida contendo cistos (bradizoítos) do agente, e c) pela infecção transplacentária. Essa última, embora represente em seres humanos apenas 1% das infecções pelo toxoplasma, 40% dos fetos infectados são de mulheres que se infectaram durante a gravidez (VERONESI & FOCACCIA, 1999).

Em 1923, JANKŮ observou o agente no olho de uma criança na Tchecoslováquia e TORRES em 1927, descreveu-o como causa de meningoencefalite congênita, miocardite e miosite. O *T. gondii* é talvez o protozoário parasita humano mais difundido. Estima-se que 10 a 90% da população está infectada dependendo da região que se analisa (CARRUTHERS, 1999). A frequência anual de soroconversão é estimada em cerca de 10% em crianças de 0 a 5 anos, 1% entre 6 e 20 anos e 0,3% acima dos 20 anos de idade. MEAD *et al* (1999), verificaram que a toxoplasmose é a terceira causa de óbitos de origem alimentar nos Estados Unidos. No Brasil a taxa de prevalência de anticorpos contra *T. gondii* em adultos varia de 54% no Centro-Oeste a 75% na região Norte (VERONESI & FOCACCIA, 1999).

ROBERTS *et al* (1994) estimaram que a transmissão congênita ocorre em 1 de cada 1000 nascidos vivos nos Estados Unidos. A incidência de infecção por *T. gondii* pré-natal, em diferentes países, esta estimada entre 1 a 100 para cada 10000 nascimentos. Os custos estimados com cuidados de saúde em decorrência da toxoplasmose são estimados em 5,2 bilhões de dólares/ano somente nos Estados Unidos.

Como os danos causados ao hospedeiro pelo parasita ocorrem na fase aguda da primoinfecção ou durante a recidiva de uma infecção anterior, é de extrema importância a diferenciação entre a doença aguda e a crônica (VILLAVEDRA *et al*, 2001). Dentre as provas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos anti-*Toxoplasma gondii* têm-se o MAD que consiste em um teste simples, não espécie-específico e pode ser usado tanto em amostras de soros humanos quanto de animais (WILSON *et al.*, 1990). Desta forma pode ser utilizada como prova de triagem simples e barata, em várias situações, principalmente em mulheres

soronegativas durante a gravidez, e para a detecção de soroconversões, em amostras de soros das diferentes espécies animais.

Para a espécie humana, o teste de aglutinação direta demonstrou sensibilidade de 95,0% e especificidade de 92,0% no estudo de OZKUYUMCU *et al* (1988). VALTAUD *et al* (1991), demonstraram que o teste de aglutinação direta proporcionou melhores resultados que o ELISA quando comparados com a imunofluorescência indireta, com concordância de 97,4% e 96,1% respectivamente.

Freqüentemente é necessária uma grande produção de antígeno para ser usado em testes sorológicos, o que demanda uma quantidade significativa de animais, elevando não somente os custos financeiros, mas levantando questionamentos éticos sobre o uso da técnica como diagnóstico de rotina. O uso de animais para fins científicos e mesmo didáticos tem suscitado amplos debates entre ativistas, população e cientistas, pelos direitos dos animais.

Em 1959, William Russel e Rex Burch, citados por VEISSIER (1999), escreveram um livro intitulado “Principles of Humane Experimental Technique”, onde os autores sugerem o delineamento do que deve ser um experimento correto envolvendo animais, e que ficou conhecido como o conceito dos três “R”: *Refinement, Reduction, Replacement*. A produção de antígeno, em cultivo celular, pode então ser utilizada para atender a demanda, com extrema facilidade, de uma grande quantidade de taquizoítos intactos, de localização extracelular e com menor número de células, sem a utilização de modelos animais.

HARMER *et al* (1996), relataram várias vantagens da sua produção por meio de cultivo *in vitro*, tais como: custo de investimentos e de manutenção baixo, e menor demanda de pessoal e de estrutura física. Embora o custo para a produção de taquizoítos *in vitro* seja estimado como sendo de um terço a metade do custo da sua produção em animais, o uso rotineiro desse método não é empregado com freqüência (EVANS *et al*, 1999). COUATARMANACH *et al* (1991), citado por BARBOSA *et al* (2000), demonstraram que a cultura celular de TG180 pode produzir uma grande quantidade de taquizoítos de *T. gondii* chegando a mais de 259 parasitas /células.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção da linhagem de sarcoma murino TG 180

A manutenção das células da linhagem do sarcoma TG180 (SARTORELLI & BOOTH, 1961), foi realizada por meio de passagens em camundongos albinos Swiss a cada 12 dias, inoculando-se por via intraperitoneal cinco camundongos com idade entre 40 e 50

dias, com 0,2 mL de exsudato intraperitoneal contendo células do sarcoma TG180, recuperados de camundongos previamente inoculados.

A manutenção dos taquizoítos da cepa RH genótipo tipo I foi realizada por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss. Três a quatro dias após realizava-se o lavado intraperitoneal, com 5 mL de solução fisiológica 0,9% estéril para a recuperação dos taquizoítos. Após a avaliação dos lavados, eram reinoculados aqueles que apresentavam maior número de taquizoítos descartando-se os hemorrágicos e/ou com contaminantes.

Para a produção dos soros-controle, foram utilizados ratos Fischer, a saber: Grupo 1 (G1) quatro animais que receberam por via oral, 10^4 bradizoítos de *T. gondii*, com auxílio de gavagem, e, Grupo 2 (G2) com quatro animais inoculados por via oral, com solução salina 0,9% estéril, com auxílio de gavagem sendo considerados como grupo controle.

Para a inoculação dos animais foi utilizada a cepa BTU 4 (genótipo I), isolada de cérebro de cão com sintomatologia nervosa, que é mantida por inoculação intraperitoneal semanal em camundongos Swiss, albinos. Ela é patogênica para camundongos albinos, e propicia a formação de cistos teciduais cerebrais em ratos. Os animais foram mantidos sob observação por um período de três meses a partir da infecção, realizando-se colheitas semanais de sangue para obtenção de soro. Ao final do período de observação os animais foram sacrificados em câmara saturada com vapor de isoflurano.

Para avaliação celular utilizou-se o teste de exclusão do corante – “*Dye Test Exclusion*”. Em microplacas de 96 poços, acrescentou-se 10 µl da amostra a ser avaliada acrescentando-se 40 µl de solução Azul Tripán 0,4% (diluição 1:5). Com auxílio de micropipeta, transferiu-se 10 µl da suspensão de células coradas, para a câmara de Neubauer, procedendo-se a contagem em microscópio óptico em aumento de 100X. As células inviáveis absorvem o corante, corando-se em azul e algumas vezes de forma assimétrica. Por sua vez, as células viáveis aparecem redondas e refringentes.

O número de células viáveis (CV) por mL, foi calculado de acordo com a fórmula abaixo, e foi utilizado para avaliação do cultivo da linhagem de sarcoma murino TG 180, na escolha das amostras utilizadas para os repiques das histoculturas e contagem dos taquizoítos viáveis.

$$CV: \frac{\text{nº. de células viáveis}}{\text{nº. de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{Fator de Diluição}$$

O número de células viáveis totais da suspensão original (VT), foi estabelecido pela fórmula abaixo e com ele foi possível comparar a produção da linhagem TG180 em histocultura, e passagem intraperitoneal em camundongos.

VT: N°. de células viáveis totais X Volume da suspensão original

Para cálculo da viabilidade em porcentagem (V%) utilizou-se a fórmula a seguir. Este dado fornece uma referência para análise de perdas na produção de células de sarcoma e dos taquizoítos.

$$\text{V\%: } \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células viáveis}}{\text{n}^{\circ} \text{ de células totais}} \times 100$$

Para os exames sorológicos, as amostras de sangue foram colhidas por punção do seio orbital previamente à inoculação dos ratos, e semanalmente durante o período de observação, por até três meses, incluindo-se o dia do sacrifício dos animais. O soro sangüíneo obtido por centrifugação a 1000G durante 10 minutos, foi transferido para microtubos identificados e congelados a temperatura de -20°C até o momento da prova.

A produção do antígeno para a utilização no método de aglutinação direta (MAD), foi realizado de acordo com o protocolo: no dia zero foram inoculados cinco animais com a linhagem de sarcoma murino TG180, mantidas por repique a cada 12 dias. No dia 4: foram inoculados pela via intraperitoneal 10 camundongos Swiss (Grupo 3 – G3) com 30 dias de idade, com 1 mL de lavado peritoneal rico em taquizoítos da cepa RH de *Toxoplasma gondii*. No dia 7 foi realizado o lavado peritoneal desses animais com 10 mL de solução fisiológica 0,9%. Após avaliação foram descartados aqueles os hemorrágicos ou com contaminação, aproveitando-se somente aqueles ricos em taquizoítos. No caso de lavados com menor concentração taquizoítica, eles foram concentrados por centrifugação a 1000G por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante, ressuspensando-se a seguir o sedimento, em volume menor que o inicial, com solução fisiológica 0,9%. Após a avaliação e seleção dos lavados peritoneais do G3, inoculou-se 1 mL do lavado final em 20 camundongos Swiss (Grupo 4 – G4), com 30 dias de idade, também intraperitoneal. No dia 10, realizou-se o lavado dos animais do grupo 4, com 10 mL de solução fisiológica 0,9%. Novamente foram avaliados, e aproveitados somente aqueles ricos em taquizoítos. No mesmo dia realizou-se a recuperação de células de sarcoma murino TG180 inoculadas no dia 0, descartando-se os lavados que se

apresentavam hemorrágicos ou contaminados. Após a seleção, os lavados contendo taquizoítos foram homogeneizados resultando um volume de 90 mL, que por meio do “*dye test*”, demonstrou uma concentração de $8,4 \times 10^3$ taquizoítos/mL. O recuperado de células de sarcoma murino TG180, foi de 20 mL, e pelo “*dye test*” revelou $1,05 \times 10^6$ células/mL.

Um volume de 7,5mL da suspensão de células de sarcoma foi diluído em 52,5 mL de solução fisiológica 0,9% (diluição 1:8), obtendo-se um volume final de 60 mL, com uma concentração de $1,32 \times 10^5$ células/mL. A suspensão celular foi homogeneizada, volume/volume, com a suspensão antigênica de taquizoítos, totalizando 120 mL. A seguir, foram inoculados, pela via intraperitoneal, 60 camundongos Swiss (Grupo 5 – G5), com 30 dias de idade, com 2 mL da suspensão final para cada um. No dia 13, foram realizados os lavados dos camundongos do G5, com 5 mL de solução fisiológica 0,9%, homogeneizados e avaliados em microscópio óptico, separando somente aqueles ricos em taquizoítos e com poucas células. Os que continham muitas células e poucos taquizoítos foram descartados, resultando um volume final de 80 mL. A suspensão obtida foi submetida ao seguinte protocolo: 1) os lavados foram homogeneizados e centrifugados a 65g por 5 minutos; 2) o sobrenadante, rico em taquizoítos foi pipetado para outro tubo de centrífuga (o sedimento foi reservado); 3) centrifugou-se o sobrenadante a 440g por 20 minutos; 4) o sedimento resultante da segunda etapa, foi ressuspendido em solução fisiológica 0,9%; 5) e centrifugado a 260G por 10 minutos; 6) o sobrenadante foi então adicionado à suspensão obtida no passo 2, totalizando 64,5 mL, que foi submetida à técnica de fixação do antígeno pela formalina, segundo DESMONTS & REMINGTON (1980). Durante a preparação do antígeno, a suspensão foi mantida em gelo seco, para preservação de sua viabilidade.

Para a produção da linhagem de sarcoma murino TG180 em histocultura, utilizou-se garrafa de 25 cm² de histocultura, com 5 mL de Meio de Eagle Modificado (MEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células de sarcoma murino TG180 foram contadas para determinação de sua viabilidade, sendo cada garrafa inoculada com $6,0 \times 10^5$ células viáveis/mL. Após esse processo as garrafas eram mantidas em estufa de cultivo em atmosfera de 5% de CO₂ a temperatura de 37 °C. A partir do segundo dia, procedia-se a troca do meio de cultura, que era realizada em função do crescimento celular e conseqüente demanda de nutrientes determinada pelo início de alteração na cor do meio. Desta forma a troca podia ser diária ou a cada dois dias. As garrafas inoculadas foram avaliadas diariamente para observação do desenvolvimento celular por microscopia de luz invertida e também pela contagem de células viáveis, para se determinar o melhor momento de uso.

A adaptação a partir de amostras de células criopreservadas de sarcoma murino TG180, mantidas em nitrogênio líquido foi realizada descongelando-se e contando-se para determinação da viabilidade. A seguir foram inoculadas segundo o protocolo de trabalho. Após 12 horas a suspensão de cada garrafa, contendo células e meio, foram centrifugadas em tubos de Falcon, a 1000G por 10 minutos sendo o sobrenadante desprezado e o pelete formado ressuspensionado em 5 mL de meio MEM. Essa troca é necessária em decorrência da toxicidade do DMSO, utilizado na criopreservação em temperaturas acima de 4° C. A partir da primeira troca de meio, procedeu-se como anteriormente. As garrafas inoculadas com amostras de sarcoma criopreservadas não conseguiam manter a viabilidade adequada a partir da terceira passagem, pois se inicia o processo de degeneração celular.

A adaptação a partir de amostras frescas do sarcoma murino TG180 mantida pela inoculação intraperitoneal de camundongos albino swiss, com idade entre 40 e 50 dias. O animal foi eutanasiado realizando-se o aspirado do conteúdo intraperitoneal até o máximo volume conseguido, mantendo-se em câmara de gelo para a preservação da integridade celular, e posteriormente diluída (V/V) e homogeneizada com solução salina tamponada com antibióticos (SST + ATB) contendo estreptomicina 5.000 UI/mL e penicilina mg/mL, também resfriada para a preservação da amostra.

Realizou-se a lavagem da suspensão obtida, segundo dois protocolos: no primeiro, metade da amostra inicial foi centrifugada a 1000G por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante, ressuspensionando-se o pelete em volume igual ao da suspensão inicial; repetindo-se o processo por mais duas vezes, ressuspensionando-se finalmente o pelete em 5 mL de SST + ATB, procedendo-se a contagem. No segundo protocolo procedeu-se da mesma forma, centrifugando-se a amostra a 800G.

Para a titulação do antígeno foram usadas três amostras de soros controle positivas (com títulos maiores que 256) e três controles negativas. Utilizou-se como prova sorológica a MAD (DESMONTS & REMINGTON, 1980), testando-se 19 soros-controle positivos e 11 negativos. Os soros testados bem como os controles positivo e negativo, foram diluídos em microplaca de fundo chato, nas diluições 1:16, 1:64 e 1:256. A seguir, 25µl de cada diluição testada foi transferida para os respectivos poços em microplaca de fundo “V”; acrescentando-se em cada uma delas 25µl de solução de 2-mercaptoetanol 0,2 M e 50 µl do antígeno já diluído em solução tampão borato pH 8,7, na diluição 1:5, de acordo com o resultado de titulação prévia. A placa foi selada com filme plástico, homogeneizada por um minuto e incubada a temperatura ambiente por seis horas, procedendo-se após esse período, a leitura. Para os resultados positivos considerou-se a formação de uma “rede” ou película em

pelo menos metade do fundo da cavidade, e negativos aqueles com formação de um botão no fundo dos poços.

RESULTADOS

Parte dos resultados já foram apresentados com a metodologia, pois algumas adaptações foram realizadas ao longo da fase experimental, em função desses resultados. Serão apresentados os resultados mais significativos quanto a produção do antígeno. Na produção *in vivo* de antígeno para MAD, além das perdas de amostras de sarcoma devido a hemorragia, contaminando o lavado com hemácias, ocasionando uma baixa qualidade do antígeno e da morte de alguns animais, notou-se que o volume de total de aspirado de sarcoma murino TG180, não foi aproveitado em sua totalidade, devendo ser diluído em PBS pH7,2; o volume de lavados contendo taquizoítos era muito próximo do que seria utilizado, entretanto, eventualmente poderia ser descartado um volume maior; a contagem das células de sarcoma murino e de taquizoítos viáveis revelaram concentrações inferiores às estabelecidas no protocolo de trabalho, $1,32 \times 10^5$ células/mL de aspirado e $8,4 \times 10^3$ taquizoítos/mL de lavado peritoneal, respectivamente; ao serem homogeneizadas para posterior inoculação nos animais, as concentrações resultantes foram respectivamente de $8,25 \times 10^3$ células de sarcoma/mL e de $4,2 \times 10^3$ taquizoítos/mL (numa razão de 1,96:1), muito abaixo do que se estabeleceu para a histocultura (6×10^5 células de sarcoma/mL de meio de cultura e 1×10^6 taquizoítos/mL de meio, em uma razão de 3:1). Desta forma optando-se, para não prejudicar o volume final do inóculo (células sarcomatosas + taquizoítos), não se ajustar as concentrações para os valores propostos para a histocultura.

Os resultados referentes às células viáveis, inviáveis e células totais trabalhando-se com amostras de sarcoma murino TG180 criopreservadas e frescas podem ser observados na Tabela 1.

(Tabela 1)

Utilizando as fórmulas para o cálculo de número de células viáveis por mL (CV), número de células viáveis totais da suspensão original (VT) e viabilidade em porcentagem (V%), chegou-se aos resultados apresentados na Tabela 2.

(Tabela 2)

Quanto a adaptação das células e a produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura verificou-se que: a adaptação das células de sarcoma murino TG180 em histocultura a partir de amostras criopreservadas, não se mostrou adequada devido a baixa viabilidade celular, optando-se pelas amostras oriundas de passagem em camundongo; as células da linhagem de sarcoma apresentam degeneração celular a partir da terceira passagem, dificultando a sua manutenção ao longo do tempo; a produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura embora viável, apresentou um baixo rendimento, uma vez que as amostras de sarcoma murino apresentavam uma perda significativa da viabilidade, dificultando a multiplicação intracelular do parasita; após a realização da contagem para cálculo da viabilidade, verificou-se que a centrifugação a 800G manteve a preservação de um maior número de células, sem comprometer a leitura em decorrência de excessiva coloração de fundo pelo Azul Tripán.

A comparação dos resultados dos exames sorológicos pela MAD, nas amostras de soros controle positivos e negativos com os antígenos produzidos “*in vivo*” a partir da inoculação intraperitoneal em camundongos e em histocultura não revelou resultados discordantes, como mostra o Quadro 1.

(Quadro 1)

DISCUSSÃO

A discussão esclarece os resultados obtidos, pois não há dados na literatura que permitam discutí-los. O objetivo principal era a obtenção de um antígeno que permitisse a realização da MAD com resultados seguros, conferindo à prova sensibilidade e especificidade, para a sua padronização. Na produção do antígeno *in vivo* pela inoculação intraperitoneal de camundongos há um significativo descarte de material que a princípio poderia ser aproveitado com um volume maior de inóculo, entretanto, a utilização de um número maior de camundongos criaria também um impasse no que diz respeito aos princípios de bioética que nortearam em parte a execução desse trabalho, quanto a redução, ou utilização do menor número possível de animais no experimento.

É preciso considerar ainda, os custos para a manutenção de um número maior de animais e a necessidade de espaço físico para acomodação adequada. Outro dado importante é a ausência de padronização das concentrações de células de sarcoma e de taquizoítos, o que ocasiona uma menor eficiência na produção *in vivo*, além de possibilitar variações significativas entre partidas de antígenos diferentes, o que inviabilizaria a produção em larga escala. Comparando-se o que fora estabelecido no protocolo para produção *in vitro*, uma única garrafa de histocultura já inoculada para produção de antígeno, teria três vezes mais células de sarcoma, e duas vezes mais taquizoítos inoculados do que nos 120 mL de inóculo produzido *in vivo*.

Em relação à produção em histocultura a literatura tem relatado a produção de linhagens celulares de sarcoma murino TG 180 na produção de taquizoítos de *T.gondii*, objetivando estudos de novos fármacos e para estudos de fisiologia do parasita. Entretanto as mesmas têm utilizado amostras já adaptadas em meio de cultura (EVANS *et al.*, 1999; BARBOSA *et al.*, 2000; CHATTERTON *et al.*, 2002).

A perda de viabilidade das amostras de sarcoma murino aumenta o custo de produção uma vez que é necessário refazer o repique a partir de amostras frescas. Para a resolução desse problema pode-se adquirir linhagens de sarcoma em laboratórios em que a produção esteja padronizada, fato que deve ser avaliado, pois nem sempre é fácil a sua obtenção, transporte, entre outros aspectos.

Embora comparadas a adaptação do sarcoma murino a partir de amostras criopreservadas e frescas, deve-se ressaltar que a utilização de outros protocolos de criopreservação devem ser avaliados a fim de minimizar os problemas no que se refere à

baixa viabilidade celular. A produção de taquizoítos pode ser melhorada com a utilização de amostras de sarcoma murino, já adaptadas, pois a viabilidade baixa acarreta na não multiplicação do *T. gondii*, refletindo diretamente na menor produção de taquizoítos.

Em decorrência das dificuldades de adaptação em histocultura da linhagem de sarcoma, a produção de antígeno de *T. gondii* não foi obtida, como imaginou-se inicialmente. O antígeno produzido nas condições do presente estudo foi utilizado para a comparação frente ao produzido em camundongos, pela a MAD, não revelando diferenças quanto aos resultados na detecção de títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, fator importante quanta à qualidade dos antígenos.

Apesar dos resultados apresentados não corresponderem na íntegra aos objetivos pretendidos, a produção de antígeno em histocultura, pode ser variável, devendo-se, entretanto, avaliar outros aspectos referentes à linhagem celular, para se assegurar a multiplicação taquizoítica, para a estabilização e padronização de uma técnica segura para a pesquisa sorológica de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*, e nas condições do presente estudo pode-se concluir que a produção de antígeno de *T. gondii* em histocultura de sarcoma murino TG180 mostra-se viável e de fácil manutenção no laboratório; quanto a qualidade do antígeno produzido em histocultura não houve discordância de resultado com o obtido segundo a técnica de passagem em camundongos, na pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii*; e face aos resultados obtidos sugerem-se novos estudos para a obtenção da linhagem de sarcoma murino TG180 para a produção de antígeno de *Toxoplasma gondii* em larga escala.

AGRADECIMENTOS

A Rodrigo Costa da Silva e Veruska Maia da Costa, Karen Roth e Benedito Donizete Menozzi pelo auxílio durante o desenvolvimento do projeto.

BIBLIOGRAFIA⁵

BARBOSA, H.M.R.; SILVA, M.; FERRO, E.A.V.; MINEO, J.R. Ultrastructural study of TG180 murine sarcoma cell invasion by *Toxoplasma gondii* comparison between *in vivo* and *in vitro* cell culture. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.2, p.265-270, 2000

CARRUTHERS, V.B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses and arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International*, v.48, p.1-10, 1999.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. Toxoplasmose: In: _____ *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 1.ed. Medsi, 1992, p.757-766.

DESMONTS, G.; REMINGTON, J.S. Direct agglutination test for diagnosis of *Toxoplasma* infection: method for increasing sensitivity and specificity. *Journal of Clinical Microbiology*, v.11, p.562-568, 1980.

EVANS, R.; CHATTERTON, J.W.M.; ASHBURN, D.; JOSS, A.W.L.; HO-YEN, D.O. Cell-culture system for continuous production of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, n.18, p.879-884, 1999.

HARMER, C.; HASSL, A.; KREINECKER, S.; ASPÖCK, H. *Toxoplasma gondii* in vitro cultivation: economic and efficient mass production. *Journal of Microbiological Methods*, v.27, n.2-3, p.225-228, 1996.

OZKUYUMCU, C.; DURUPINAR, B.; GIRISKEN, E. Comparison of the IFA, ELISA IgG, ELISA IgM, IHA and the direct agglutination tests in *Toxoplasma gondii*. *Mikrobiology Bulletin*, v.22, p. 2171-275, 1988.

ROBERTS, T.; FRENKEL, J.K. Estimating income losses and other preventable costs caused by congenital toxoplasmosis in people in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.249-256, 1994.

SARTORELLI, A. C. & BOOTH, B. A.. Studies on mechanisms of therapeutic synergy by combinations of asazerine and purine analogs. *Fed Proceed*, v.20, p.156, 1961.

⁵ UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. *Normas para publicações da UNESP*. São Paulo: Editora UNESP, 1994. v.2: Referências bibliográficas.

VAULTAUD, E.; LACROIX, C.; RODIER, M.H.; TOULLAT, G.; JACQUEMIN, J.L. Critical study of ELISA technique and high sensitivity direct agglutination test for the screening of antitoxoplasma IgG. *Annales de Biologie Clinique*, v.49, p.397-400, 1991.

VEISSIER, I. Expérimentation animale: biologie, éthique, réglementation. *INRA Productions Animales*, n.12, p.365-375, 1999.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de Infectologia*, 2^a ed. São Paulo, Atheneu, 1999. 1764p

VILLAVEDRA, M.; RANSOLDI, C.; CAROL, H.; BAZ, A.; BATTISTONI, J.J.; NIETO, A. Identification of circulating antigens, including an immunoglobulin binding protein, from *Toxoplasma gondii* tissue cyst and tachyzoites in murine toxoplasmosis. *International Journal for Parasitology*, v.31, p.21-28, 2001.

WILSON, M.; WARE, D.; JURANEK, D. Serologic aspects of toxoplasmosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.196, n.2, p.277-281, 1990.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de células de amostras criopreservadas e frescas, Botucatu. 2007.

Condição	Amostra Criopreservada	Amostra fresca	
		Protocolo 1	Protocolo 2
Células Viáveis	270	212	388
Células Inviáveis	385	134	59
Células Totais	655	346	447

TABELA 2 – Resultados obtidos com relação ao conteúdo celular de amostras criopreservadas e amostras frescas, Botucatu. 2007.

Condição	Amostra Criopreservada	Amostra fresca	
		Protocolo 1	Protocolo 2
Volume inicial	2 mL	5 mL	5 mL
CV (células/mL)	$1,35 \times 10^4$	$10,6 \times 10^5$	$19,4 \times 10^5$
VT (células Totais)	$2,7 \times 10^5$	$21,2 \times 10^5$	$38,8 \times 10^5$
V%	41,22%	61,27%	86,80%

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Comparação dos resultados sorológicos para a pesquisa de anticorpos anti-*T. gondii* utilizando-se antígenos produzidos a partir da inoculação intraperitonial em camundongos (in vivo) e em histocultura. Botucatu, 2007.

Amostra	Antígeno		Amostra	Antígeno	
	<i>in vivo</i>	histocultura		<i>in vivo</i>	histocultura
1	256	256	16	64	64
2	64	64	17	64	64
3	256	256	18	64	64
4	256	256	19	256	256
5	64	64	20	Negativo	Negativo
6	256	256	21	Negativo	Negativo
7	256	256	22	Negativo	Negativo
8	64	64	23	Negativo	Negativo
9	256	256	24	Negativo	Negativo
10	256	256	25	Negativo	Negativo
11	64	64	26	Negativo	Negativo
12	256	256	27	Negativo	Negativo
13	64	64	28	Negativo	Negativo
14	64	64	29	Negativo	Negativo
15	64	64	30	Negativo	Negativo