

ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE TOXOPLASMA GONDII E CÉLULAS HOSPEDEIRAS APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA .

Sidney Bulizani ¹ , Cristina Pacheco Soares ² .

¹ Mestrando , Universidade do Vale do Paraíba . e-mail : bulizani@uol.com.br

² Professora Doutora , orientadora , Universidade do Vale do Paraíba , cpsoares@univap.br

Palavras-chave: Toxoplasma , Terapia fotodinâmica.

Resumo - A utilização de terapia fotodinâmica visando combater o processo de multiplicação/disseminação do *Toxoplasma gondii* em cultura de tecidos, particularmente células da linhagem VERO, visa possibilitar o desenvolvimento de uma nova ferramenta no combate da enfermidade causada por este patógeno. *Toxoplasma gondii* tem despertado interesse pelo fato de invadir e sobreviver em uma ampla variedade de hospedeiros e tipos celulares, além de ser importante patógeno oportunista em hospedeiros imunocomprometidos e causar sérios comprometimentos fetais. O experimento foi conduzido utilizando laser de baixa potencia , um fármaco fotossensível (cloroalúminio ftalocianina lipossomal) e os ensaios empregando o laser com 2 e 4,5 J/cm². Foi possível verificar que os resultados em culturas de células submetidas a ação do fármaco e irradiadas evidenciaram inibição no desenvolvimento do patógeno e até sua sensível destruição quando do fornecimento de energia na fototerapia da ordem de 4,5 J/cm² .

Introdução

Toxoplasma gondii tem despertado interesse pelo fato de invadir e sobreviver em uma ampla variedade de hospedeiros e tipos celulares (Jones et al.,1972 ; Werk, 1985 ; Morisaki et al.,1995), além de ser importante patógeno oportunista em hospedeiros imunocomprometidos (Luft e Remington, 1992) .

Trata-se de um parasita protozoário do filo Apicomplexa. O estágio sexual e o ciclo de vida desse parasita coccídeo é completado no epitélio intestinal de gatos e outros felinos, que servem exclusivamente como hospedeiros definitivos (Henry, 1999 ; Fraser , 1991).

Uma vez que a imunidade tenha sido desenvolvida , os organismos desenvolvem cistos teciduais que podem eventualmente conter centenas ou milhares de bradizoítas de crescimento lento; a presença de tais cistos é característica de infecções crônicas. Todos os estágios do ciclo de vida ocorrem em felinos, mas somente os estágios de trofozoítas e cistos ocorrem em humanos (fig. 1) e outros hospedeiros intermediários (Henry, 1999).

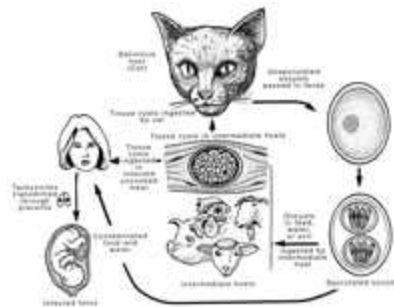


Fig.1 - Ciclo de vida do *T.gondii* (Dubey et al , 1998)

Os humanos adquirem a infecção através da ingestão de carne inadequadamente cozida, especialmente de carneiro ou porco, que contenha cistos teciduais ou pela ingestão de oocistos infectáveis a partir de material contaminado com fezes de gato (Henry, 1999). Epidemias ocorreram a partir da inalação de pó contaminado em um estábulo (Henry, 1999 apud Teutch, 1979) e a partir da ingestão de água contaminada ou leite de cabra não pasteurizado (Henry, 1999 apud Benenson , 1982 e Sacks , 1982). A transmissão por transfusão sanguínea e através de transplante de órgão pode ocorrer (Henry , 1999).O risco de infecção

ao neonato não está relacionado com a presença ou ausência de sintomas nas mães, mas a gravidade da infecção depende do estágio da gestação no qual ela foi adquirida. A morte intra-uterina, microcefalia ou hidrocefalia com calcificações intracranianas podem ocorrer se a infecção for adquirida na primeira metade da gravidez. Geralmente são assintomáticas ao nascimento, apesar de febre, hepatoesplenomegalia e icterícia poderem aparecer. Coriorretinite, retardamento psicomotor e distúrbios convulsivos podem aparecer meses ou anos depois (Henry, 1999).

Infecta células fagocíticas profissionais, como, macrófagos, bem como células não fagocíticas. Tal capacidade de infectar células nucleadas indica que o parasita pode reconhecer uma molécula comum ou tenha muitos mecanismos para a adesão celular (Sibley, 1995); a fagocitose constitui o passo inicial da degradação de células apoptóticas, partículas inertes e agentes infecciosos vivos, isto ocorre como parte crítica de uma função biológica essencial como inflamação, imunidade e desenvolvimento; o processo ocorre por meio de fagócitos profissionais (macrófagos e neutrófilos) e em menor extensão para fagócitos não profissionais como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (Méresse et al., 1999). Para a invasão celular o parasita conta com um complexo de organelas secretoras apicais (fig.2), é altamente polarizado e tem um citoesqueleto bem desenvolvido, que participam da invasão celular (Nichols et al., 1981; Nichols & Chiappino, 1987; Aikawa et al., 1977). A invasão ativa é caracterizada por uma rápida penetração do parasita dentro de um vacúolo citoplasmático, que é formado em 15 – 30 segundos (Sibley, 1995).

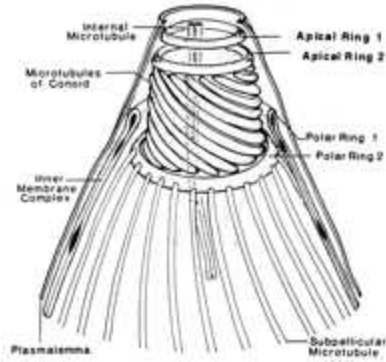


Fig.2 - Complexo apical : repres. esquemática (Dubey et al, 1998)

A TFD tem sido historicamente utilizada no tratamento de tumores cancerígenos, entretanto também tem recentemente sido utilizada para matar bactérias através do uso de fotossensibilizadores alvo. A porfirina e a clorina e6 demonstraram "in vitro" um espectro limitado contra bactérias, enquanto que clorina e6 conjugada a pentalisina mostrou atividade "in vitro" contra todos os microrganismos orais testados, incluindo, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus ctinomycetemcomitans*, *Bacteróides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum* (Rovaldi et al., 2000). A ação da TFD e quimioterápica antimicrobiana (TFQA) na descontaminação de produtos sanguíneos, particularmente inativação viral, tem sido muito utilizada, como o uso de Ftalocianinas associadas a radiação com luz vermelha (600 a 800 nm) visando a inativação do envelope lipídico dos vírus e apoptose dose-luz dependente (Marble, 1996), o mesmo ocorrendo com o *Tripanossoma cruzi* (Clark & Boyle, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as implicações do uso de um fármaco fotossensível, como a Ftalocianina lipossomal, associado a irradiação com diodo laser de Arseneto de Galio 685nm em monocamada de células da linhagem VERO infectadas com *Toxoplasma gondii*, visando assim avaliar a possibilidade do uso futuro deste procedimento associado a terapia convencional.

Metodologia

Para a obtenção de culturas celulares viáveis e passivas de serem infectadas, possibilitarem o desenvolvimento e replicação dos parasitos foram necessárias

a obtenção e manutenção em nitrogênio líquido de vários frascos com células da linhagem VERO, confecção de meio mínimo essencial (MEM) com antibiótico e soro fetal bovino. A manipulação ocorreu no interior de uma câmara de fluxo laminar, tendo como local para a confecção da cultura de células e inoculação do parasito, garrafas estéreis de poliestireno, onde as trocas periódicas de meio e inoculações foram efetuadas com o auxílio de pipetas de vidro estéreis ou micropipetadores com ponteiros estéreis.

A formação de uma monocamada homogênea de células em cada garrafa de cultura, os parasitos foram inoculados; após o desenvolvimento em maior escala tanto de células da monocamada como dos parasitos, tripsinizou-se as células da garrafa sem o parasito e confeccionou-se o cultivo celular em placas de polipropileno estéreis com 24 poços, contendo uma lâmina circular que serviu como superfície para o desenvolvimento celular e posterior tratamento visando a marcação, coloração e fixação do material para posterior confecção de lâminas para ensaios de microscopia.

O inóculo, nos poços, foi realizado na proporção de 5 parasitos/células. Após incubação overnight, avaliando-se a infecção das células, foram divididos grupos, submetidos aos seguintes tratamentos:

- Apenas com Ftalocianina;
- Com Ftalocianina associada ao laser;
- Apenas o laser;
- Um grupo que só recebeu a inoculação com os parasitos e
- Um Grupo que só possui células VERO visando acompanhar a viabilidade e o desempenho da cepa celular.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata, visando atenuar os efeitos de possíveis falhas no processo e na manipulação do material.

A coleta das lâminas para sua fixação visando a confecção das lâminas para os ensaios em microscopia foram feitas nos intervalos de 1, 12 e 24, sendo feita uma avaliação de cada poço em microscópio invertido antes de retirar e tratar as lâminas.

O preparo das lâminas, antes de serem fixadas, visa a marcação com DioC6(3),

para corar o retículo endoplasmático, das células hospedeiras e também a marcação com Rodamina Faloidina para o citoesqueleto celular.

Preparou-se ensaios variados, visando acompanhar de forma repetitiva o desempenho das células e destas frente a inoculação com o microrganismo utilizando-se o laser de arseneto de galio (vermelho – 685nm) com área do feixe de 1 cm², distância de 8 cm, potência de 35 mW e densidade variável, com os ensaios repetitivos hora com 2 J/cm², hora com 4,5 J/cm². Além disso, tais ensaios visaram desenvolver processos variados de marcação/coloração dos parasitos, tais como as já descritas marcações de retículo e citoesqueleto, como também sua fixação com Bouim visando corar o material pelo método de May Grunwald – Giemsa, confeccionando lâminas cujas lâminulas foram fixadas com bálsamo do Canadá.

Resultados e discussão

De maneira geral foi possível avaliar um certo padrão de ocorrência em todos os ensaios efetuados que, a despeito de não serem muitos, evidenciam certa tendência, onde:

- Células controle: cultivadas com a finalidade de avaliar as condições fisiológicas da linhagem e ser fonte de comparação frente a possíveis variações dos demais ensaios; estas não sofrem qualquer ação de laser ou ftalocianina.
- Células infectadas: igualmente, não sofrem ação de laser ou ftalocianina, desenvolveram-se como esperado, produzindo vários vacúolos grandes e, a medida que se faziam as verificações, os vacúolos e as formas livres cresciam exponencialmente.
- Células infectadas tratadas com ftalocianina: em todos os ensaios foi possível verificar, a despeito do desenvolvimento dos vacúolos e liberação de parasitos, a ocorrência, dentro das 24 horas, era quantitativamente inferior, com vacúolos menores e mais demora na

liberação de parasitos .

- Células infectadas e tratadas com laser : em todos os ensaios verificou-se um discreto incremento na produção de vacúolos e de formas livres se comparado com as lâminas apenas infectadas.

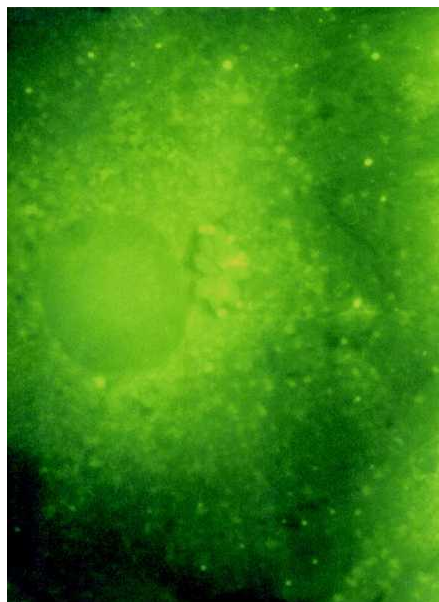
- Células infectadas, tratadas com ftalocianina e irradiadas com laser 685 nm 2 J/cm²: foi possível , até o momento , verificar uma inibição discretamente superior a perpetrada pela ftalocianina isolada , principalmente no que se refere a liberação de formas livres dentro das 24 horas , contudo , deve-se estar avaliando , no decorrer dos ensaios, as variações dos marcadores ou outro atributo que possa ser determinado para permitir uma melhor avaliação deste ensaio .

- Células infectadas , tratadas com ftalocianina e irradiadas com laser 685 nm 4 J/cm²: foi possível , até o momento , verificar a sensível destruição dos parasitos , sendo o acompanhamento efetuados em microscópio invertido antes de cada trabalho de marcação e fixação ; outro dado relevante é o da sensível redução de celularidade e a alteração do contorno da membrana externa das células restantes , presença de alguns vacúolos citoplasmáticos em raras células , entretanto , esta celularidade não reduziu com o passar do tempo de observação.

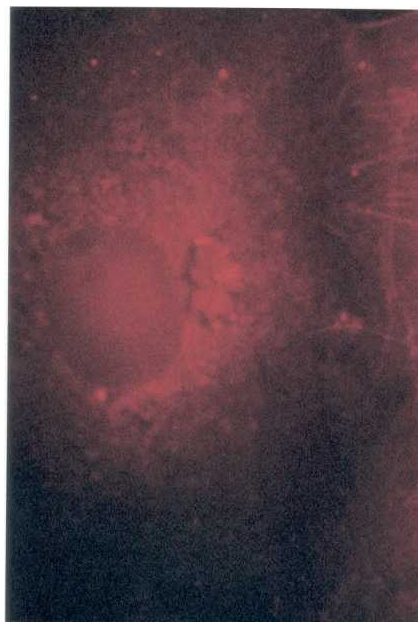
OBS: vale frisar que , nos poços submetidos a irradiação com laser na ausência de ftalocianina a celularidade teve franco aumento se comparado com o grupo controle celular,obvio que antes da replicação dos parasitos no interior dos vacúolos e sua liberação para infectar novas células .

Na atual situação do projeto , as observações posteriores dos varios perfis

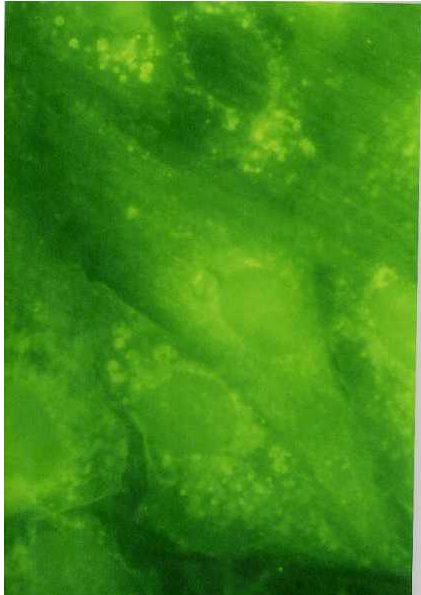
de ensaios , além das verificações correntes , vinculadas as feses de evolução do projeto , fotografias com marcadores especificos poderão servir como fonte de dados importantes dentro do processo de avaliação ; como exemplo , seguem-se algumas fotografias obtidas por microscopia de fluorescência.



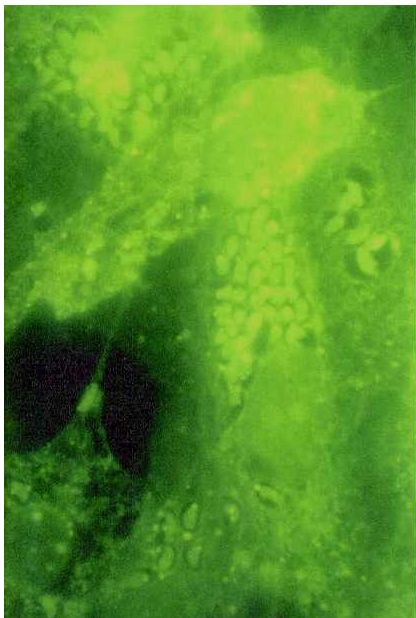
Fotografia em microscopia de fluorescência mostrando vacúolo com parasitos fixados 24 horas após inoculação; uso de DioC6 para marcação de retículo.(foto do autor , 2004).



Mesma tomada evidenciando outro marcador, a Rodamina , com a finalidade de marcar o citoesqueleto celular (foto do autor, 2004)



Fotografia em microscopia de fluorescência , marcada com DioC6 para retículo (24h após incubação), evidenciando pequeno vacúolo após tratamento apenas com Ftalocianina, sem o estímulo do Laser (foto do autor , 2004).



Fotografia mostrando a grande quantidade de parasitos e vacúolos após a bioestimulação ($4,5\text{J}/\text{cm}^2$), marcação com DioC6(3). (foto do autor, 2004).

Conclusão

Foi possível verificar ser viável o uso de PDT , ao menos a nível de cultura de tecido celular, no combate ao parasito , entretanto , torna-se necessário repetir tais ensaios visando tornar mais consistente as avaliações , verificar através dos marcadores utilizados as alterações ocorridas no padrão celular, além de efetuar ensaios especificamente no parasito antes de sua inoculação nas celulas visando verificar possíveis alterações na viabilidade do toxoplasma após PDT .

Bibliografia

- AIKAWA , M.; KOMATA , Y.; ASAI, T. ; Kawa, M. In: Transmission and Scanning electron microscopy of cell entry by *Toxoplasma gondii* . Amer. Jour. Pathol .1977 . 285-290 .
- CLARK , C.; BOYLES , S. Phthalocyanine may eliminate parasites from blood cells . In: EBSCO host . Academic Search Elite , 10656073 , 07/29/96.arquivo extraido em 10/02/2003 de file://A:EBSCOhost%202.htm.
- DUBEY ,J.P. ; LINDSAY , D.S.; SPEER , C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* , Bradizoites , and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts . In: Clinical Microbiology Reviews .1998 , p. 267-299 , vol.11 , n.02 .
- FRASER, C.M. In: Manual MERCK de Veterinária . 1991. São Paulo : Ed.Roca . 1803 p.
- HENRY , J.B. In: Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais . 1999 . São Paulo : Ed. Manole . 19ª Edição . 1552 p .
- JONES , T.C. ; YEH, S. ; HIRSCH, J.G. In: The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells . Jour. Exp. Med. 1972. 136 :1157 – 1171.
- LUFT , B.J. ; REMINGTON, J.S. In: Toxoplasmic encephalitis in AIDS . Clin. Infect. Diseases. 1992. 15:211-12 .

MARBLE ,M. Blood Safety (virus inactivation). In: EBSCO host . Source: AIDS Weekly Plus , 10691456, 05/06/96, arquivo extraído em 12/02/2003 de file://A:EBSCOhost%203.htm. p.24 .

MÉRESSE , S.; STEELE-MORTIMER , O.; MORENO , E.; DESJARDINS, M.; FINLAY , B.; GORVEL , J.P.. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death . In: Nature Cell Biology , 1999 , november , vol 1 , p.183-188 .

MORISAKI , J.H. ; HEUSER , J.E. ; SIBLEY, L.D. In: Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. Jour.of Cell science .1995. 108: 2457-2464 .

NICHOLS , B.A. ; CHIAPPINO, M.L. In: Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii* . Jour. Protozool. 1987 . 34(2): 217-226.

NICHOLS , B.A. ; O'CONNOR, G.R.. In: Penetration of mouse peritoneal Macrophages by the protozoon *Toxoplasma gondii* . Laboratory Investigation . 1981 . 44(4): 324-335 .

ROVALDI , C.R. ; PIEVSKY , A. ; SOLE, N. A. ; FRIDEN, P. M. ; ROTHSTEIN, D.M.; SPACCIAPOLI, P. In:Antimicrob. Agents Chemother . 2000 Dec; 44(12):3364-7 .Photoactive porphyrin derivative with broadspectrum activity against oral pathogens "in vitro".

SIBLEY, L.D. In: Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii* .Trends in Cell Biol.. 1995. 5:129-132 .