

# INFLUÊNCIA DO CICLO CELULAR DAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS CHO E VERO NA INTERAÇÃO COM *TOXOPLASMA GONDII*

Ana Carolina Tosetto Zanelato<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup> UNIVAP/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Av. Shishima Hifumi, 2911 – CEP 12244-000 São José dos Campos – SP. <sup>1</sup> caroltosettoz@bol.com.br ;<sup>2</sup> cpsoare@univap.br.

**Resumo-** O *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, tem sua distribuição geográfica mundial, com alta prevalência sorológica, podendo causar doença clínica grave em crianças recém-nascidas e pacientes com o sistema imune comprometido. A análise da influência do ciclo celular das células hospedeiras CHO e Vero na interação do *Toxoplasma gondii* visa mostrar o grau de infecção em células em intérfase e mitose. Foram usadas cinco linhagens de células CHO e células de linhagem Vero. A análise das amostras foi feita em Microscópio óptico (Leica), nas quais foram realizadas as contagens de ligação e internalização das células em intérfase adjacentes a mitose e na própria mitose. Os resultados sugerem que a mitose tem um certo grau de influência sobre a interação com o *Toxoplasma gondii*, na qual as células em intérfase adjacentes a ela e, na interação do *T.gondii* em células em mitose da linhagem CHO, tiveram seu índice reduzido em relação à linhagem Vero, que apenas continha células em intérfase.

**Palavras-chave:** *Toxoplasma gondii*, ciclo celular, mitose.

**Área do Conhecimento:** Ciências Bilógicas

## Introdução

O *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, pertencente ao Filo Apicomplexa, tem sua distribuição geográfica mundial, com alta prevalência sorológica. A toxoplasmose doença causada por este parasita, frequentemente não causa doença clínica. Em caso de ocorrer doença clínica a forma mais grave encontra-se crianças recém-nascidas e pacientes com sistema imune comprometido (DUBEY, LINDSAY E SPEER, 1998).

Os mecanismos de aquisição da doença podem ocorrer de duas formas: forma adquirida e forma congênita. Na primeira forma o homem pode se infectar através de ingestão de oocistos presentes em jardins, caixa de areia, que são disseminados por insetos, por ingestão de oocistos em carne crua ou mal passada, verduras e água contaminada. Na segunda forma a infecção é transmitida de mãe para filho, onde o taquizoíto do *T. gondii* é capaz de passar a barreira transplacentária (HENRY, 1999).

O mecanismo de invasão do parasita em células hospedeiras tem sido objeto de várias pesquisas, pois consiste em um mecanismo muito complexo e também porque estudos “in vitro” mostraram que até hoje todas as células nucleadas, podem ser infectadas pelo *Toxoplasma gondii* (SOARES, 1998).

Através de informações obtidas por estudos, o ciclo celular da célula hospedeira tem uma influência no nível de infecção pelo *Toxoplasma gondii*. (DUTTA, GRIMWOOD, KASPER 2000).

Com base nisso visa-se o estudo do ciclo celular da células hospedeiras, em suas diferentes fases, para tentar desvendar o mecanismo que exerce influência sobre o grau de infecção pelo *Toxoplasma gondii* nessas células.

## Materiais e Métodos

Parasitas: Taquizoítos de cepa RH de *T.gondii* foram mantidos em cultura de células VERO (Fibroblasto de macaco verde africano, ATCC nº81) e foram coletados em meio mínimo essencial (MEM) em pH 7,2, 48-72 horas depois da infecção. O meio foi coletado e centrifugado a 200x g por 7-10 minutos em temperatura ambiente para remover células hospedeiras e debris. O sobrenadante, que continha os parasitas, foi coletado e centrifugado a 1000x g por 7-10 minutos. O pellet obtido foi lavado 2 vezes em solução tampão fosfato (PBS), pH 7,2 e ressuspenso na densidade de 10<sup>6</sup> parasitas/ml em meio mínimo essencial (MEM). O parasita foi usado depois de 30-40 minutos depois da remoção da cultura celular, e sua viabilidade foi testada usando o azul de Trypan.

Células Hospedeiras: A viabilidade das células foi avaliada através de exclusão de células mortas através do teste com azul de Trypan.

Para a execução do trabalho foram utilizadas cinco linhagens de células CHO (ovário de hamster Chinês), fornecidas gentilmente pelo Dr. P. Stanley (Departamento de Biologia Celular, Universidade de Medicina Albert Einstein, Nova York, E.U.A)

As linhagens consistem em W5-Gat<sup>2</sup>, sendo linhagem parental, Lec 1, IdlD lec1, Lec 2 e Lec 8, sendo mutantes na glicosilação (Tabela 1)

**Tabela 1:** Células CHO mutantes na glicosilação (MONTEIRO; SOARES; SOUZA 1998)

Table 1  
Carbohydrate structures found in CHO cell lines used

CHO Cell lines	Carbohydrate Structure	
	N-linked	O-linked
Parent Gat <sup>2</sup>		
Lec 1		
IDLDLec1		
Lec 2		
Lec 8		

Symbols: [], sialic acid; ●, Gal, GalNAc; ■, GlcNAc; ○, man and S/T, serine or threonine.

Foram cultivadas em meio de cultura MEM alpha médio (Gibco), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino - SFB, e incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (estufa de CO<sub>2</sub> marca *Forma Scientific*), em garrafas plásticas *Nunc* de 25cm<sup>2</sup>. Foram usadas também células Vero, suplementadas com meio MEM e mantidas sob as mesmas condições acima. As células VERO foram gentilmente fornecidas pela Dr<sup>a</sup> Técia Maria

#### Interação Célula Parasita

A passagem das células para placas com 24 poços foi precedida da tripsinização da monocamada de células Vero e CHO obtidas nas garrafas de cultivo celular. Com as células em suspensão, mantendo o ambiente na cabine de fluxo laminar livre de contaminação, fez-se a exposição das placas com 24 poços, tendo uma lamínula estéril no interior de cada poço ou placa. Com um micropipetador, foi pipetado sobre as lamínulas uma alíquota da suspensão obtida, 200µl para os poços. O material foi levado, sem agitação, para o interior da estufa de cultivo celular, permanecendo no interior desta por 15 minutos para fixar as células nas lamínulas. Posteriormente retornou-se com este material, sob condições assépticas, no fluxo laminar e adicionou-se meio MEM para células Vero e MEM $\alpha$  para células CHO em volume suficiente para cobrir a lamínula, 500 µl

para cada poço.

Após 24 horas incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (estufa de CO<sub>2</sub> marca *Forma Scientific*) as células foram infectadas com taquizoítos de *T.gondii* na proporção de 50:1 parasitas por célula.

A análise da interação parasita-célula hospedeira, após 1 hora incubadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (estufa de CO<sub>2</sub> marca *Forma Scientific*), foi feita em amostras onde a lamínula dos poços de 24 foram fixadas em lâminas usando fixador Bouin e foram coradas com Giemsa.

Foram contadas no mínimo 100 células em cada preparação em triplicata. A análise foi feita da seguinte maneira, observando uma célula em mitose nas células CHO, a partir desta célula foram contados o número de ligações e internalizações de taquizoítos de *Toxoplasma gondii* em células em interfase adjacentes a mitose observada. A segunda análise foi feita a contagem de ligações e internalizações de taquizoítos de *T. gondii* nas células em interfase da Linhagem Vero. Foram contadas 300 células em interfase nas cinco linhagens de CHO e na linhagem Vero.

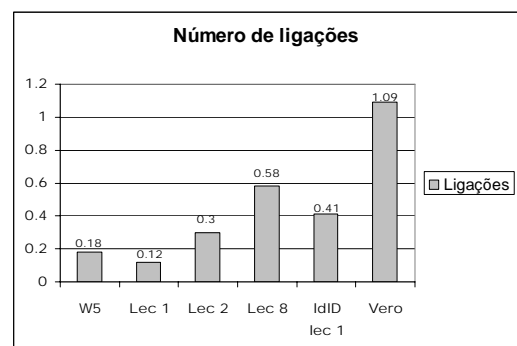
Também foram analisadas as células em mitose em relação ao número de ligação e internalização de taquizoítos de *T. gondii*. A contagem foi realizada em Microscópio óptico (Leica DMLB).

As fotos do experimentos foram feitas no Microscópio óptico (Leica DMLB) acoplado a um sistema fotográfico (Leica MPS-30) usando lente de 1000x.

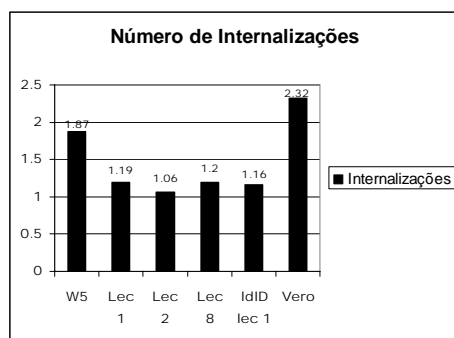
#### Resultados e Discussão

As amostras das linhagens celulares mostraram que as células Vero continham apenas células em interfase e as células de linhagens CHO continham células em interfase e mitose.

O número de ligações de taquizoítos de *T. gondii* teve média variação nas cinco linhagens da CHO. Já as células Vero tiveram o maior número de ligações e, dentre a linhagem CHO, a Lec 1 teve o menor índice de ligação como mostrado no gráfico abaixo:



As células Vero obtiveram 50% a mais de ligações que o maior número da Linhagem CHO ; Lec 8 obteve a média de 0,58 ligações por célula e a Vero 1,09 ligações por célula. Pode-se observar a ligação do taquizoíto de *T. gondii* na (figura 1). A análise do número de internalizações teve pouca variação nas linhagens Lec1, Lec 2, IdID lec1 e Lec 8. Já W5 teve um número de internalizações mais alto, mas mesmo assim menor que da linhagem Vero, como mostrado no gráfico abaixo.



A linhagem Vero obteve 20% a mais de ligações que o segundo índice, consistindo das células W5.

Através de observações, notou-se que a linhagem CHO obteve menor número de ligações e internalizações que a linhagem Vero. Na figura 2 podemos observar as internalizações nas células em interfase da linhagem Vero.

Como observado nas figuras 3, 4, e 5, na quais ocorrem células em mitose, as células em interfase adjacentes são pouco infectadas. Em alguns casos as células em interfase mais próximas não contêm ligação ou internalização de taquizoítos, como se observou nas células que se encontravam em anáfase, conforme mostrado nas figuras 5.

A comparação entre as linhagens CHO e Vero em termos de ligação e internalização pode ser vista no gráfico abaixo;

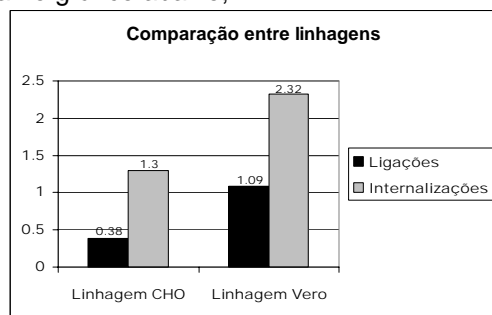


Gráfico 3 Neste gráfico foi feita a média das cinco linhagens de CHO e da linhagem Vero. As células Vero obtiveram 270% de média de ligações e 170% de média de internalizações a mais que a linhagem CHO.

As células em mitose também foram analisadas para ver se encontrávamos ligações e internalizações de taquizoítos de *T. gondii*.

Foram contadas 42 células em mitose, entre elas prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Dentre as 42 células, havia apenas 2 infectadas no início da prófase, sendo que esse número representa menos de 5% do total de células encontradas. Na Figura 6 pode-se observar uma prófase infectada.

Todas as linhagens usadas neste projeto, tiveram tanto ligações como internalizações de taquizoítos de *T. gondii*.

A multiplicação e desenvolvimento de parasitas como *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Leshmania* provavelmente depende da ativação de CDKs relacionadas as quinases. ( MEIJER, 2000)

A linhagem Vero que obteve apenas células em interfase apresentou um índice de ligações e internalizações maior que a linhagem CHO. Isso provavelmente ocorreu por que a interfase possui CDKs e ciclinas, principalmente na fase S da interfase que atrai o *Toxoplasma gondii* segundo GRIMWOOD; MINEO; KASPER. 1996)

A linhagem CHO que obteve células em mitose e interfase obteve um índice menor de ligações e internalizações, pois as CDKs e ciclinas responsáveis pela mitose são diferentes das apresentadas na interfase. Foi observada uma diminuição de células infectadas adjacentes à mitose, provavelmente.

A transição de G2/M é ativada pela CDK 1 e ciclina B que promove a fosforilação da lâmina nuclear. A transição para anáfase e finalização da mitose depende da fosforilação do Complexo Promotor da Anáfase onde a CDK1 e ciclina B requer a proteólise da ciclina B. (MEIJER, 2000).

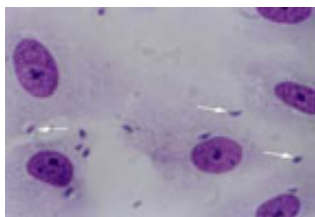
Foi observada uma diminuição de células infectadas adjacentes à mitose, provavelmente. Nas células em anáfase, observou-se que as células em interfase adjacentes as mesmas, não possuíam infecção.

Isso pode ter ocorrido, pois na anáfase a ciclina B sofre proteólise, e este pode ser um empecilho para a infecção pelo *Toxoplasma gondii*.

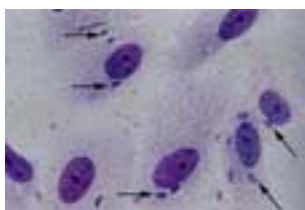
As CDKs e ciclinas presente nesta fase talvez não possuam um receptor que atraia o *Toxoplasma gondii*, pois as células em mitose, mais especificamente em início de prófase teve um índice de infecção menor que 5%.

As fases do ciclo celular também possuem inibidores das CDKs, onde esses vem sendo investigados, como potencial antiparasita. A mitose apresenta inibidores de quinases, como WEE1, MIK1, MYT1 PP2A. ( MEIJER, 2000).

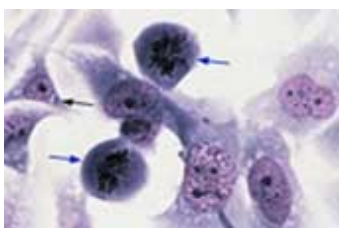
Esses inibidores encontrados na mitose podem estar relacionados com resultados obtidos.



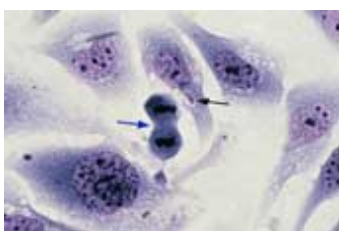
**Figura 1:** Células Vero em interfase contendo ligações de taquizoítos de *T.gondii* ( seta branca) 1000x



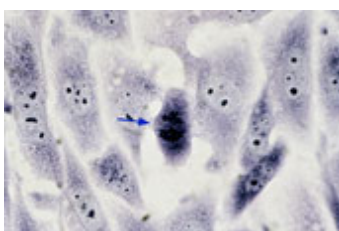
**Figura 2:** Células Vero em interfase com internalizações de taquizoítos de *T.gondii* ( seta preta) 1000x



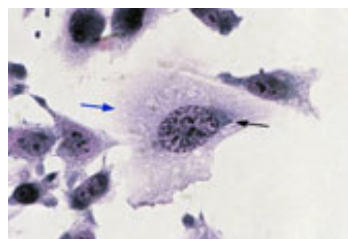
**Figura 3:** Células Lec1 apresentando 2 metáfases (setas azuis) e célula em interfase infectada (seta preta) 1000x.



**Figura 4:** Células Lec1 contendo uma telófase ( seta azul) e célula em interfase infectada. (seta preta) 1000x.



**Figura 5:** Células W5 apresentando anáfase (seta azul) e células em interface adjacentes sem infecção. 1000x.



**Figura 6:** Células IdID lec1 contendo uma prófase (seta azul) e a mesma encontra-se infectada por um taquizoíto ( seta preta). 1000x.

## Conclusão

Após a análise dos grupos CHO e Vero pode-se concluir:

- Análise de ligações de taquizoítos de *T. gondii* foi maior na linhagem Vero que continha apenas células em intérfase. A linhagem CHO, que continha em intérfase e mitose, teve um número bem menor que células Vero, onde as células em mitose pode ter influenciado no processo de ligação.

O número de internalizações de Taquizoítos de *T.gondii* teve como resultado nas células Vero e menor internalizações nas células CHO. As células em fase mitótica apresentavam células em interfase adjacentes pouco infectadas, conforme já demonstrado.

Esses resultados mostram que a mitose diminui o número de internalizações de células em interfase adjacente.

- As células em mitose foram submetidas à contagem de ligações e internalizações, que apresentou apenas duas internalizações a qual representam menos de 5% das fases observadas e nenhuma ligação. O número mínimo de interação do *Toxoplasma gondii* com células em mitose leva-nos a considerar que esta fase possui um possível inibidor para interação com *Toxoplasma gondii*.

## Referências

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

DUTTA, C.; GRIMWOOD, J.; KASPER, L.H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to a Specific Membrane Fraction of CHO Cells. *Infection and Immunity*, Vol. 68, nº 12, p. 7198-7201. Dec, 2000

GRIMWOOD, J.; MINEO, J.R.; KASPER, L.H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to Host Cell Is Host Cell Cycle Dependent. *Infection and Immunity*. Vol. 64, nº 10, p. 4099-4104, Oct 1996

HENRY , J.B. Diagnóstico Clínico e Tratamento por Métodos Laboratoriais.19.ed. São Paulo : Ed. Manole .1999. 1552 p.

MEIJER.L. Cyclin-dependent kinases inhibitor as potential anticancer, antineurodegenerative, antiviral e antiparasitic agents. Mini-reviews. Station Biologique de Roscoff, CNRS UPR, Bretagne. France. Vol.3 pg 83-88, 2000.

MONTEIRO.V.G.;SOARES.C.P;SOUZA.W. Host surface sialic acid residues are involved on the process of penetration of *Toxoplasma gondii* into mammalian cells. Elsevier science FEMS Microbiology Letters 164 p-323-327. May 1998

SOARES, C.P. Estudos da participação da superfície da célula hospedeira na formação do vacúolo parasitóforo na interação com *Toxoplasma gondii*. 100p. Tese (Doutorado) –Universidade Estadual Norte Fluminense ,Campos dos Goytacazes-RJ, Rio de Janeiro, (1998).