

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

ANÁLISE QUANTITATIVA DE *TRITRICHOMONAS FOETUS*
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FOTOSSENSIBILIZADOR E
RADIAÇÃO LASER

Cláudia de Mello Ribeiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos
créditos necessários para obtenção do
título de Mestre em Ciências Biológicas.

São José dos Campos, SP

2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento

**ANÁLISE QUANTITATIVA DE *TRITRICHOMONAS FOETUS*
SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FOTOSSENSIBILIZADOR
E RADIAÇÃO LASER**

Cláudia de Mello Ribeiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, como complementação dos créditos
necessários para obtenção do título de Mestre
em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva.

São José dos Campos, SP

2004

R368a

Ribeiro, Cláudia de Mello

Análise quantitativa de tritrichomonas foetus submetidos a tratamento com fotossensibilizador e radiação laser/ Cláudia de Mello Ribeiro. São José dos Campos: UniVap, 2004.

p.64: il.; 30cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2004.

1. Protozoários 2. Terapia fotodinâmica 3. Lasers

I. Silva, Newton Soares, Orient. II. Título

Autorizo para fins acadêmicos e científicos a cópia total ou parcial deste trabalho por meios fotocopadores ou eletrônico.

Aluna: 

Data: *São José dos Campos, 28 de outubro de 2004*

“ANÁLISE QUANTITATIVA DE *Tritricomonas foetus* SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM FOTOSSENSIBILIZADOR E RADIAÇÃO LASER”

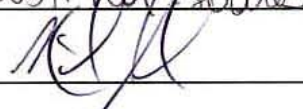
Claudia de Mello Ribeiro

Banca Examinadora:

Profa. **Dra. CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP)



Prof. **Dr. NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)



Prof. **Dr. CLAUDEMIR DE CARVALHO** (UNITAU)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco
Diretor do IP&D - UniVap
São José dos Campos, 28 de outubro de 2004.

**Dedico este trabalho ao meus pais Alcino e
Olga.**

Agradeço

Ao meu orientador Prof. Dr. Newton Soares da Silva — Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Univap.

Ao Prof. Dr. Fernando Costa e Silva Filho — Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho — Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelos ensinamentos transmitidos.

“Aprendi tudo o que está oculto e tudo o que se vê,
pois a Sabedoria, artífice de todas as coisas,
mo ensinou.”

Sb 7, 21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2. 1 <i>Tritrichomonas foetus</i>	03
2. 1. 1 Membrana plasmática.....	06
2. 1. 2 Superfície celular.....	06
2. 1. 3 Sistema endocítico.....	08
2. 1. 4 Sistema mastigonte.....	09
2. 1. 5 Citoesqueleto.....	10
2. 1. 6 Núcleo.....	11
2. 1. 7 Hidrogenossomo.....	11
2. 1. 8 Aparelho parabasal.....	12
2. 1. 9 Retículo endoplasmático.....	14
2. 1. 10 Glicogênio.....	14
2. 2 Tricomoníase bovina.....	15
2. 2. 1 Clínica.....	15
2. 2. 2 Diagnóstico.....	16
2. 2. 3 Tratamento.....	16
2. 3 Terapia fotodinâmica.....	17
2. 3. 1 Fotossensibilizadores.....	18
2. 3. 2 Mecanismo de fotodestruição.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4. 1 <i>Tritrichomonas foetus</i>	21
4. 2 Fotossensibilizador.....	21
4. 3. Incubação dos protozoários com AlPcS ₄	21

4. 4. Irradiação.....	22
4. 5. Contagem dos protozoários após irradiação.....	22
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Espectro de absorção do fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada.....	24
5. 2 Contagem de <i>T. foetus</i> 24 horas após a administração dos tratamentos.....	25
5. 3 Contagem de <i>T. foetus</i> 48 horas após a administração dos tratamentos.....	29
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. 1. 1: Microscopia eletrônica de varredura de <i>Tritrichomonas foetus</i> onde se observa a sua forma e emergência dos flagelos. (http://www.biologo.com.br/marlenebenchimol/fotosmicro/pages/Tfoetus_varredura_jpg.htm).....	04
Figura 2. 1. 2: Corte longitudinal de <i>T. foetus</i> (Microscopia Eletrônica de Transmissão). (N) núcleo; (V) vacúolo; (H) hidrogenossomo; (ER) retículo endoplasmático; (P) pelta; (B) corpo basal; (G) Golgi; (A) axóstilo; (C) costa; (GL) grânulos de glicogênio (MARIANTE et al., 2003).....	05
Figura 4. 4. 1: Desenho esquemático da placa de 24 poços com <i>Tritrichomonas foetus</i> submetidos a tratamento.....	22
Figura 4. 4. 2: Sistema de irradiação da placa de 24 poços.....	23
Figura 5. 1. 1: Espectro de absorção da AlPcS ₄ (10µM em PBS). Pico de absorção em 675 nm.....	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5. 2. 1: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) após a administração de AlPcS ₄ e incubação por 24 horas.....	25
Gráfico 5. 2. 2: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) após 24 horas do tratamento com LASER.....	26
Gráfico 5. 2. 3: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) 24 horas após o tratamento com TFD.....	27
Gráfico 5. 2. 4: Porcentagem de parasitas-controle e de parasitas, 24 horas após a administração dos tratamentos com AlPcS ₄ , LASER e TFD.....	28
Gráfico 5. 3. 1: Comparação do número de parasitas-controle ($\times 10^6$) após 24 e 48 horas do período de incubação.....	28
Gráfico 5. 3. 2: Comparação do número de parasitas ($\times 10^6$) após 24 e 48 horas da administração do fotossensibilizador AlPcS ₄	30
Gráfico 5. 3. 3: Comparação do número de parasitas ($\times 10^6$) 24 e 48 horas após a administração do LASER.....	31
Gráfico 5.3. 4: Número de parasitas ($\times 10^6$) 24 e 48 horas após a administração da TFD.....	32
Gráfico 5. 3. 5: Resultados comparativos do número de parasitas ($\times 10^6$) com a administração de AlPcS ₄ , LASER e TFD, após 24 e 48 horas de incubação.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALA	-	Ácido delta-aminolevulínico
ATP	-	Adenosina trifosfato
AlPcS ₄	-	Alumínio ftalocianina tetrassulfonada
BVECs	-	Células epiteliais vaginais de bovinos
CO ₂	-	Dióxido de carbono
Ca ²⁺	-	Íon cálcio
CHO-K1	-	Linhagem celular de ovário de hamster chinês
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
D.E.	-	Densidade de energia
D-GlcNAc	-	N-acetilglicosamina
EROs	-	Espécies reativas de oxigênio
H ₂	-	Hidrogênio Molecular
H ₂ O ₂	-	Peróxido de hidrogênio
He-Ne	-	Hélio-neônio
HeLa:	-	Linhagem de células do carcinoma cervical humano
InAlGaP	-	Fosfeto de índio-gálio-alumínio
IgG	-	Imunoglobulina G
J	-	Joules
J774	-	Linhagem de células tumorais monocíticas
KDa	-	Kilo Dalton
LASER	-	Amplificação da luz por emissão estimulada de radiação
LDL	-	Lipoproteína de baixa densidade
MLC	-	Concentração mínima letal
μl	-	Microlitro
μM:	-	Micromolar
mM	-	Milimolar
mW	-	Miliwatts
M	-	Molar

nm	- Nanometro
OH^-	- Hidroxil
O_2^-	- Íon superóxido
$^1\text{O}_2$	- Oxigênio singlete
PF	- Filamento parabasal
P	- Potência
PCR	- Reação em cadeia pela polimerase
pH	- Potencial de hidrogênio
PBS	- Salina tampão fosfato
RBCC	- Cultura de células vermelhas
RLP068	- Ftalocianina tetracatiônica
rpm	- Rotações por minuto
t	- Tempo
TFD	- Terapia fotodinâmica
TYM	- Trypticase Yest Medium
UV	- Ultravioleta
λ	- Comprimento de onda
σ	- Desvio padrão

RESUMO

Os efeitos da terapia fotodinâmica com fotossensibilizadores de segunda geração tem sido amplamente investigados em culturas de células neoplásicas, visando a aplicação clínica no tratamento de neoplasias. Porém, os efeitos da terapia fotodinâmica em culturas de protozoários são pouco estudados. Neste trabalho, *Tritrichomonas foetus* foi submetido a tratamento com o fotossensibilizador de segunda geração alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AlPcS₄) e irradiadas com um laser semiconductor (InGaAlP), a uma densidade de energia de 0,5 J/cm². O tratamento fotodinâmico com AlPcS₄ reduz o número destes protozoários *in vitro*.

Palavras-chaves: *Tritrichomonas foetus*, terapia fotodinâmica; alumínio ftalocianina tetrassulfonada, LASER.

ABSTRACT

The effects of photodynamic therapy with second generation photosensitizers, have been widely investigated, aiming their clinical application on the treatment of neoplasms. However, the effects of photodynamic therapy in the protozoan culture has been little studied. In this work, *Tritrichomonas foetus* have been submitted in the treatment with second generation photosensitizer aluminum phthalocyanine tetrasulfonated (AlPcS₄) and radiation from a semiconductor LASER (InGaAlP) at a fluency of 0,5 J/cm². This treatment photodynamic with AlPcS₄ reduce the number this protozoan *in vitro*.

Keywords: *Tritrichomonas foetus*, photodynamic therapy, aluminum phthalocyanine tetrasulfonated, LASER.

1. INTRODUÇÃO

Tritrichomonas foetus é um protozoário flagelado e agente etiológico da tricomoníase bovina, enfermidade infecto-contagiosa, de transmissão venérea. Este protozoário é encontrado na superfície da mucosa do trato urogenital das fêmeas ou nas membranas prepucial e peniana dos touros.

Nas fêmeas, as manifestações clínicas incluem aborto, com repetição de cios a intervalos irregulares, vaginite, cervicite, endometrite e piometra. No touro, pode desenvolver-se um corrimento prepucial associado a pequenos nódulos na membrana prepucial. Depois disso, não existe qualquer sintomatologia clínica, tornando-se portador assintomático e podendo disseminar a infecção.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma terapia que faz uso combinado de um fotossensibilizador e uma fonte de luz, geralmente o LASER. Os efeitos da TFD em protozoários é pouco estudada.

O objetivo deste trabalho é avaliar quantitativamente os efeitos do fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada, do LASER e da terapia fotodinâmica em culturas de *Tritrichomonas foetus*.

Os protozoários *T. foetus* foram submetidos a tratamento com alumínio ftalocianina tetrassulfonada a uma concentração de 10 μM , irradiação com LASER a uma densidade de energia de 0,5 J/cm^2 , e à ação combinada do fotossensibilizador e a luz LASER, ou seja, a TFD.

Os resultados deste experimento sugerem que a terapia fotodinâmica é efetiva para a redução de *T. foetus*, *in vitro*.

A toxicidade da alumínio ftalocianina tetrassulfonada e a ação da ir70 radiação LASER aplicados em culturas destes protozoários necessitam de mais estudos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Tritrichomonas foetus é um protozoário flagelado que habita ambientes pobres em oxigênio, como o trato reprodutivo de bovinos. Este protozoário é encontrado na superfície da mucosa urogenital de machos e fêmeas, causando a tricomoníase bovina, uma enfermidade infecto-contagiosa, economicamente importante, de transmissão venérea, que causa infertilidade e aborto em bovinos aumentando os custos, relativo ao manejo, do rebanho. A tricomoníase é provavelmente a terceira causa de aborto em bovinos (depois da brucelose e da leptospirose) (BONDURANT, 1997).

A tricomoníase apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo, de forma endêmica, principalmente em regiões onde o controle sanitário é deficiente ou o sistema de produção é extensivo, com utilização de monta natural (PELLEGRIN, 1999).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bovinos, mas a baixa eficiência reprodutiva compromete a competitividade da produção nacional no mercado globalizado.

No Brasil, foi diagnosticada pela primeira vez por Roehe (1948) que identificou o agente no sêmen de touros doadores de sêmen em central de Inseminação Artificial (I.A.), no município de Montenegro, Rio Grande do Sul (MIES FILHO, 1982). Estudos posteriores registraram a incidência da tricomoníase bovina nos Estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro (MELLO, 1954). Rabello (1955) registrou a prevalência da tricomoníase em touros de centrais de I.A. Megale (1963) identificou o protozoário pela primeira vez, no Estado de Minas Gerais. Fernandes et al. (1979), no Rio Grande do Sul, acompanharam as manifestações clínicas da tricomoníase em um rebanho leiteiro naturalmente infectado. Gomes et al. (1991), no Rio Grande do Sul, detectaram a infecção em 15 dos 36 municípios pesquisados.

Apesar da importância econômica atribuída à tricomoníase bovina, poucos foram os estudos realizados nas últimas décadas sobre ela, deixando assim de ser erradicada e muito menos submetida a um controle rigoroso. Desta forma, a doença continua a causar problemas para o rebanho brasileiro (PELLEGRIN, 1999).

2. 1 *TRITRICHOMONAS FOETUS*

Tritrichomonas foetus Kirby, 1947, pertence à família Trichomonadidae, ordem Trichomonadida Kirby, 1947, classe Zoomastigophora, subfilo Mastigophora, Sarcomastigophora, filo Sarcomastigophora, sub-reino Protozoa e reino Protista (HONIGBERG, 1963). *Tritrichomonas foetus* (figura 2. 1. 1).

Tritrichomonas foetus, *Tritrichomonas suis* (parasita do tubo digestivo e cavidade nasal de suínos), e *Tritrichomonas mobilensis* (parasita do tubo digestivo, principalmente ceco e cólon, de macacos) foram considerados, após análise das seqüências gênicas, como sendo provavelmente cepas ou variantes de uma mesma espécie (TACHEZY et al., 2002; KLEINA et al., 2004).

Tritrichomonas foetus reproduz-se por divisão binária e apresenta aproximadamente 10 a 25 µm de comprimento e 3 a 15µm de largura. Possui uma morfologia bem variável, podendo variar de piriforme à fusiforme ou mesmo arredondada.

Caracteriza-se por apresentar três flagelos anteriores livres e um quarto que se dirige até a parte posterior e é associado à membrana ondulante, que se une, na sua margem interna à costa; o axóstilo que se estende do pólo anterior ao posterior dá rigidez à célula e projeta-se, formando o espinho terminal. Próximo ao pólo anterior, localiza-se o núcleo (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986). Corte longitudinal de *T. foetus* (Figura 2. 1. 2).



Figura 2. 1. 1: Microscopia eletrônica de varredura de *Tritrichomonas foetus*, onde se observa a sua forma e emergência dos flagelos. (http://www.biologo.com.br/marlenebenchimol/fotosmicro/pages/Tfoetus_varredura_jpg.htm).

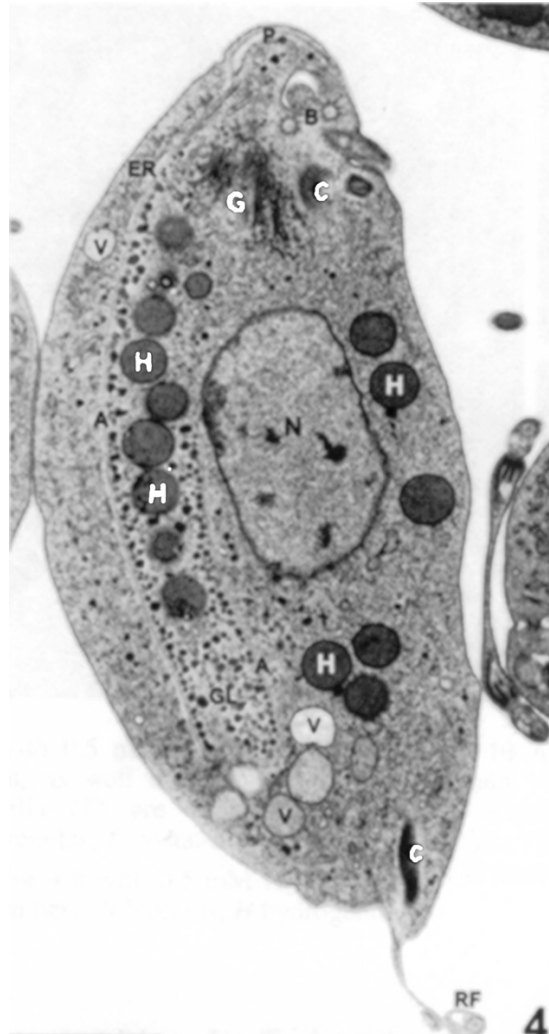


Figura 2. 1. 2: Corte longitudinal de *T. foetus* (Microscopia Eletrônica de Transmissão). (N) núcleo; (V) vacúolo; (H) hidrogenossomo; (ER) retículo endoplasmático; (P) pelta; (B) corpo basal; (G) Golgi; (A) axóstilo; (C) costa; (GL) grânulos de glicogênio (MARIANTE et al., 2003).

2. 1. 1 MEMBRANA PLASMÁTICA

A célula do *T. foetus* é envolta pela membrana plasmática, que apresenta três regiões distintas: a que recobre o corpo celular, a da membrana ondulante e a que recobre os flagelos (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986).

A membrana plasmática deste protozoário possui um considerável nível de fluidez (LOPEZ et al., 2000).

As faces P (protoplasmática) e E (extracelular) de sua membrana plasmática revelam grande heterogeneidade quanto à distribuição das partículas intramembranas. A face P apresenta uma densidade maior de partículas do que a E (BENCHIMOL; ELIAS; DE SOUZA; 1982).

A face P da membrana, que recobre os flagelos anteriores, apresenta partículas intramembranas formando rosetas, que aparecem como um anel de 9 a 12 partículas de 7 a 10 nm de diâmetro. O flagelo recorrente apresenta na região de contato com o corpo celular, na face P da membrana, um arranjo especial de 4 a 6 fileiras de partículas, formando uma faixa, provavelmente constituindo um tipo especial de junção entre membranas. A natureza destas proteínas que compõem as rosetas, ainda não é bem conhecida, mas seu tamanho é compatível, por exemplo, com proteínas de canal de sódio, que são proteínas transmembranas (BENCHIMOL; KACHAR; DE SOUZA, 1992).

Protusões na face P e depressões na face E da membrana plasmática de *T. foetus*, foram observadas quando estas interagem com eritrócitos humanos (DA SILVA; DIAS FILHO; DE SOUZA, 1996).

2. 1. 2 SUPERFÍCIE CELULAR

Entende-se por superfície celular a membrana plasmática da célula associada ao seu glicocálice.

Os constituintes da superfície celular exercem uma função importante na interação parasita-hospedeiro e influenciam na patogênese da doença. Estudos que enfocam a interação tricomonádíneos-célula hospedeira mostram que os parasitas podem exercer seus efeitos citotóxicos através do contato físico estabelecido entre as duas superfícies da célula, por toxinas lançadas dos parasitas no meio de interação, ou a associação de ambos os mecanismos (LOPEZ et al., 2000; DE CARLI; TASCA; PIRES BORGES, 2004).

A superfície celular dos tricomonádíneos tem sido apresentada como um mosaico composto de adesinas, receptores de proteínas da matriz extracelular e outras moléculas envolvidas na adesão dos tricomonádíneos às células hospedeiras (SILVA-FILHO; DE SOUZA; LOPEZ et al., 2000).

T. foetus possui, em sua superfície, sítios aniônicos detectados com o uso de ferro coloidal e ferritina cationizada. Estes sítios aniônicos são principalmente representados pelas glicoproteínas e/ou glicolípídios da membrana plasmática, que contém ácido siálico. Consequentemente, a carga de superfície destes protozoários é negativa, resultado da ionização do grupo carboxila do ácido siálico e fosfatos dos fosfolípídeos. Quanto maior a carga de superfície de *T. foetus*, melhor é sua ligação à superfície das células epiteliais (SILVA-FILHO; DE SOUZA, 1986; LOPEZ et al., 2000).

Outras classes de moléculas presentes na superfície desses protozoários estão relacionadas com a adesão deles às células hospedeiras. Duas delas são as adesinas e as cisteínas proteinases. Em *T. foetus* uma proteína de 100 KDa foi caracterizada como sendo uma adesina, distribuída por toda a superfície celular, principalmente na região dos flagelos (DA SILVA; DIAS FILHO; DE SOUZA, 1996).

As cisteínas proteinases, em *T. foetus*, estão associadas mais com a citotoxicidade exercida pelo parasita em culturas de células epiteliais do que com a citoadesão. Essas proteínas induzem células epiteliais vaginais de bovinos (BVECs), infectadas com *T. foetus*, à morte celular por apoptose, sugerindo que a apoptose está envolvida na patogenia destes protozoários *in vivo* (SINGH et al., 2004)

Sabe-se que o ferro, em *T. foetus*, modula as atividades de ambas as adesinas e cisteínas proteinases, interferindo na habilidade de adesão deste protozoário às células do hospedeiro. Quando *T. foetus* foi cultivado em meio com baixa quantidade de ferro,

observou-se um aumento significativo na citoadesão e redução na citotoxicidade ao interagirem com células HeLa (LOPEZ et al., 2000; MELO-BRAGA; ROCHA-AZEVEDO; SILVA FILHO, 2003).

Sítios de ligação à laminina e à fibronectina presentes em toda a superfície deste protozoário também estão relacionados com o processo de adesão. Uma molécula de superfície de 118 KDa capacita *T. foetus* a reconhecer laminina-1 e a aderir à substratos que possuem laminina. Já a fibronectina é reconhecida, em *T. foetus*, por glicoconjugados contendo resíduos de manose (SILVA FILHO; DE SOUZA; LOPEZ et al., 2000).

Moléculas de lectinas também estão presentes na superfície celular do *T. foetus* e estão relacionadas com o reconhecimento das células epiteliais por estes protozoários (LOPEZ et al., 2000).

A superfície celular de *T. foetus* possui glicoconjugados. Lectinas fluorescentes e conjugadas com ouro, que reconhecem D-GlcNAc, N-acetil-D-galactosamina, ácido siálico, D-manose, D-glucose, L-fucose e D-galactose marcaram a superfície celular deste protozoário (BONILHA et al., 1995; BENCHIMOL; BERNARDINO, 2002).

Estudos histoquímicos com lectinas detectaram aumento de resíduos D-galactose e N-acetil-D-galactosamina no epitélio genital (vagina, útero e oviduto) e D-manose no epitélio do oviduto, de novilhas inoculadas com *T. foetus* via intravaginal. Isso sugere que a presença de *T. foetus* no trato genital e seus fatores de virulência ou processo inflamatório resultam em uma variação das glicoproteínas da superfície epitelial desta região (COBO et al., 2004).

2. 1. 3 SISTEMA ENDOCÍTICO

T. foetus possui uma alta atividade endocítica (pinocitose e/ou fagocitose), responsável pela aquisição de substâncias necessárias para seu crescimento e manutenção. *In vivo*, eles endocitam tais substâncias das secreções do hospedeiro. (KULDA; NOHYNKOVA; LUDVIK, 1986; BENCHIMOL; BATISTA; DE SOUZA, 1990).

Fazem parte do sistema endocítico de *T. foetus* os lisossomos, endossomos, pequenas vesículas e vacúolos. Esses compartimentos endocíticos são ácidos, com pH

variando entre 5.2 a 6.6, apresentam variável morfologia, localização e tamanho. Os lisossomos são organelas envoltas por membrana única, fosfatase ácida-positiva e possuem em torno de 1.5µm de diâmetro. Já os vacúolos movimentam-se e são encontrados principalmente na região perinuclear, embora se possa encontrá-los em todo o citoplasma (AFFONSO; ALMEIDA; BENCHIMOL, 1995).

A via endocítica de *T. foetus* compreende uma população de vesículas periféricas formadas a partir da membrana plasmática. Sítios aniônicos e de ligação às lectinas, presentes na membrana plasmática, são internalizados, tornando-se parte das membranas que formam os compartimentos endocíticos e, subseqüentemente, exocitados. Tais vesículas carregam moléculas endocitadas para um compartimento endossomal prematuro, localizado perifericamente, e então são carregadas para um compartimento endossomal tardio (AFFONSO; ALMEIDA; BENCHIMOL, 1995).

2. 1. 4 SISTEMA MASTIGONTE

É formado pelo sistema locomotor do parasita, constituído pelos flagelos e a membrana ondulante. *T. foetus* possui três flagelos anteriores, denominados 1, 2 e 3, e um recorrente (R), com diâmetros de 0,25 a 0,32µm, e sensibilidade a inibidores da atividade ATPásica da dineína, o que sugere um mecanismo de deslizamento de microtúbulos. Cada flagelo tem origem em um cinetossomo situado no pólo anterior da célula (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986).

O flagelo recorrente estende-se à região anterior, estabelecendo uma junção com a membrana plasmática chamada membrana ondulante, que apresenta de 2 a 3 ondulações. Quanto ao tipo de movimento, os flagelos anteriores apresentam movimento ciliar, enquanto que o recorrente apresenta movimento flagelar típico (BENCHIMOL et al., 1995).

Os flagelos são importantes na interação *T. foetus*-célula hospedeira, já que a citoadesão do protozoário às células se dá inicialmente com seu flagelo anterior e recorrente e, mais tarde, com o corpo celular (SILVA FILHO; DE SOUZA; LOPES, 1988).

2. 1. 5 CITOESQUELETO

T. foetus possui um citoesqueleto bem desenvolvido, constituído por uma estrutura microtubular denominada sistema pelta-axostilar, estruturas fibrilares apresentando estriações (costa e filamentos parabasais) e numerosos microfilamentos (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986; BENCHIMOL; DINIZ; RIBEIRO, 2000).

Drogas que interagem com microtúbulos (colchicina e vinblastina) e microfilamentos (citocalasina B) foram relacionadas como inibidores parciais do crescimento celular e mobilidade do *T. foetus*, podendo causar modificações da forma celular sem, no entanto, romperem os microtúbulos do sistema pelta-axostilar (SILVA FILHO; DE SOUZA, 1986).

O axóstilo consiste de uma única fita de 130 microtúbulos dispostos longitudinalmente. Os microtúbulos do axóstilo de *T. foetus* apresentam uma projeção lateral formada por dois protofilamentos a mais que os treze protofilamentos normalmente encontrados nos microtúbulos. A parte anterior do axóstilo é larga, formando o capítulo; posteriormente ele retorna sobre si mesmo formando um tubo: o corpo axostilar. Marcação dos axóstilos foi observada após incubação com anticorpos monoclonais, que reconhecem α -tubulina e tubulina acetilada (BENCHIMOL; DINIZ; RIBEIRO, 2000).

A pelta sustenta a parede do canal periflagelar do qual emergem os flagelos e é constituída por uma única camada de microtúbulos paralelos interconectados (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986).

Os microtúbulos do sistema pelta-axostilar são conectados entre si por pontes, sob a forma de delgados filamentos, regularmente espaçadas com um intervalo de 9 nm. O sistema pelta-axostilar está associado com outras estruturas celulares como o retículo endoplasmático, grânulos de glicogênio, hidrogenossomos e o núcleo. O retículo endoplasmático rugoso, devido a sua associação com o sistema pelta-axostilar, deve fornecer Ca^{2+} aos microtúbulos do axóstilo como em outros sistemas celulares. Os hidrogenossomos provavelmente fornecem ATP aos microtúbulos dos axóstilos,

semelhante ao que ocorre com microtúbulos e mitocôndrias (BENCHIMOL; DINIZ; RIBEIRO, 2000).

A costa é uma larga fibra estriada, que começa nos cinetossomos dos flagelos anteriores 2 e 3, e o recorrente, estendendo-se em direção à região posterior da célula, constituindo uma estrutura de sustentação para a membrana ondulante. A costa é constituída de proteínas. O axóstilo e a costa não expressam qualquer movimento durante a motilidade celular (MONTEIRO-LEAL et al., 1993; 1995).

2. 1. 6 NÚCLEO

O núcleo de *T. foetus* apresenta um envoltório constituído por duas membranas separadas por um espaço de aproximadamente 18nm, e a membrana mais externa faz parte do retículo endoplasmático (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1984; RIBEIRO et al., 2002).

Este envoltório possui complexos de poros nucleares típicos, visualizados pela técnica de criofratura (BENCHIMOL; ELIAS; DE SOUZA, 1982).

T. foetus possui, em seu núcleo, cinco cromossomos, dimorfos, não homólogos, o que sugere a presença de um genoma haplóide. Anticorpos anti-DNA marcaram estruturas extranucleares, sugerindo a presença de DNA citoplasmático em *T. foetus* (RIBEIRO et al., 2002).

Durante o processo de divisão celular, o envelope nuclear mantém-se, e o núcleo assume diferentes tamanhos e formas: oval na interfase; lobulado ou côncavo na prófase; na transição metáfase-anáfase o núcleo sofre uma constrição promovida pelo axóstilo duplicado passando a exibir uma forma em “S”; alongado na transição da anáfase para telófase e, finalmente, separado em dois núcleos. O nucléolo, única estrutura proeminente e esferoidal do núcleo, mantém-se durante a mitose (BENCHIMOL; DINIZ; RIBEIRO, 2000; RIBEIRO et al., 2002).

2. 1. 7 HIDROGENOSSOMO

O hidrogenossomo é uma organela envolvida no metabolismo de energia, típico de eucariotos de vida anaeróbica ou que vivem em ambiente com baixa tensão de

oxigênio e que carecem de mitocôndrias. Está presente em várias espécies de tricomonadíneos e outros protistas como ciliados de vida-livre, ciliados presentes no rúmen e em alguns fungos. Apresenta-se em grande número no citoplasma celular, principalmente nas regiões perinuclear, axostilar e área subcostal (KULDA; NOHYNKOVA; LUDVIK, 1986; BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

Estas organelas são esféricas ou levemente alongadas (quando no processo de divisão), apresentam 0,5 a 1,0 μm de diâmetro, dupla membrana e sua matriz é granular homogênea. Os hidrogenossomos dos tricomonadíneos possuem altos níveis de magnésio, fósforo e cálcio, e possivelmente estão envolvidos na regulação intracelular do nível de Ca^{2+} (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986; BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

Sob condições anaeróbicas, o hidrogenossomo produz dióxido de carbono (CO_2), hidrogênio molecular (H_2) e acetato pela oxidação do piruvato. Este processo é acompanhado pela produção de ATP (MULLER, 1993; BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

Análises bioquímicas dos hidrogenossomos revelam propriedades similares às mitocôndrias: ambos sintetizam ATP. Entretanto há diferenças significantes; esta organela contém pelo menos duas enzimas, importantes componentes de seu metabolismo, que não são encontradas em mitocôndrias: a ferredoxina-oxidase e a hidrogenase. Além disso, nos hidrogenossomos há ausência do ciclo de Krebs, citocromos, fosforilação oxidativa, cardiolipina e material genético (GIEZEN et al., 2002; BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

Resistência de *T. foetus* aos derivados nitroimidazóis tem sido detectada *in vitro*. Este fenótipo resistente surge após prolongada cultura dos parasitas com aumento gradual da dose de metronidazol ou pela cultura dos mesmos com concentração mínima letal (MLC) desta droga. Deve-se tal fenótipo a múltiplas mutações ocorridas durante a cultura, que diminuem o nível de transcrição dos genes que codificam as enzimas ferredoxina-oxidase e hidrogenase, responsáveis pela ativação desta droga no hidrogenossomo (CERKASOVÁ; CERKASOV; KULDA, 1986; LAND; CLEMENS; JOHNSON, 2001).

Os hidrogenossomos dividem-se em qualquer fase do ciclo celular. Durante a interfase eles são distribuídos principalmente ao longo do axóstilo e costa; no início da

mitose migram ao redor do núcleo. Benchimol e Engelke (2003) demonstraram que há 3 formas pelas quais os hidrogenossomos se dividem: por segmentação, crescem, tornam-se alongados, e então, ocorre uma constrição central; por partição, ocorrendo uma invaginação da membrana interna do hidrogenossomo, formando um septo transversal, separando a matriz da organela em dois compartimentos; po forma-central: neste caso os hidrogenossomos crescem e o processo de divisão inicia-se em um dos pólos da organela, a qual torna-se mais larga e, gradualmente, a membrana deste pólo move-se para dentro, dividindo a organela, porém nenhum septo é formado.

Os hidrogenossomos associam-se ao axóstilo, durante a citocinese, para assegurar uma correta distribuição destes às células-filhas (BENCHIMOL; ENGELKE, 2003).

2. 1. 8 APARELHO PARABASAL

Os tricomonadíneos possuem o aparelho parabasal formado pelas cisternas do complexo de Golgi e pelos filamentos parabasais, que estão localizados dorsalmente e a direita do núcleo (KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986).

Pela microscopia eletrônica, o Golgi é visto como uma única e proeminente estrutura, alcançando 6µm de comprimento e 1µm de largura, apresentando 8 a 12 cisternas. Pela técnica da criofratura, observou-se que as cisternas apresentam membranas fenestradas. O espaço luminal dos sáculos é estreito, em torno de 30 a 35 nm; é esta a distância também que separa os sáculos, conferindo ao Golgi uma aparência compacta. Vários tipos de vesículas pequenas estão associadas às bordas de todos os sáculos. As cisternas apresentam conteúdos de densidades diferentes, sendo o compartimento mediano mais denso, indicando que há diferentes conteúdos nas pilhas do Golgi. Lectinas marcadas com ouro detectaram a presença de diferentes açúcares ao longo destas pilhas, sugerindo que uma função do Golgi em *T. fetus* pode ser a glicosilação, como ocorre em outras células eucariotas (BENCHIMOL et al., 2001).

Os filamentos parabasais são estruturas delgadas denominadas PF1 e PF2. Os filamentos parabasais PF1 têm sua origem entre os cinetossomos 2 e 3, e os PF2, entre o 3 e o R (recorrente) (BENCHIMOL, 1984; KULDA; NOHYNKOVÁ; LUDVIK, 1986).

Admite-se para esta estrutura uma provável função de sustentação do complexo de Golgi. Finas fibrilas conectam a primeira cisterna e o filamento parabasal. Esta conexão é importante, pois permite que a organela fique interconectada com os cinetossomos de onde emergem os filamentos parabasais.

O complexo de Golgi participa da regulação de várias funções na célula. Nos tricomonadíneos, o armazenamento de cálcio ocorre nos hidrogenossomos, retículo endoplasmático e, mais recentemente descoberto, no complexo de Golgi. Estudos citoquímicos demonstram a presença de uma bomba Ca^{+} -APTase em suas cisternas, sendo essas o principal local de acumulação deste íon (ALMEIDA et al., 2003).

Durante a mitose, o Golgi torna-se alongado na interfase, mantendo o número de cisternas. Após o alongamento, as cisternas sofrem uma fissão medial. Ocorre a golgicinese, surgindo dois pequenos Golgi medindo entre 1-2 μm cada. Após, cada Golgi migra junto com a porção anterior de cada axóstilo, posicionando entre os cinetossomos e o núcleo. Na telófase, o Golgi alonga-se e cada célula-filha recebe um Golgi (BENCHIMOL et al., 2001).

2. 1. 9 RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

O retículo endoplasmático do *T. foetus* localiza-se ao redor do núcleo e próximo aos hidrogenossomos. Ribossomos estão ligados em suas membranas. Estudos citoquímicos demonstram a presença de lipídios em suas membranas (BENCHIMOL, DE SOUZA, 1985), presença de glicose-6-fosfatase (QUEIROZ et al., 1991) e a presença de bomba Ca^{+} -APTase indicando ser o retículo endoplasmático um local de armazenamento deste íon (BENCHIMOL et al., 2001).

2. 1. 10 GLICOGÊNIO

T. foetus possui grânulos de glicogênio, material de reserva que é utilizado pelo parasita através da glicólise. Os grânulos formam partículas do tipo α , ou rosetas, as quais são constituídas de sub-unidades β . Eles estão distribuídos pelo citoplasma, e grande quantidade deles pode ser vista próximo à costa e em associação com o axóstilo,

seguindo os microtúbulos em toda a sua extensão (BENCHIMOL; DINIZ; RIBEIRO, 2000).

2. 2 TRICOMONÍASE BOVINA

2. 2. 1 CLÍNICA

Doença infecto-contagiosa causada pelo *Tritrichomonas foetus*, a tricomoníase ocasiona distúrbios reprodutivos em bovinos.

A transmissão do agente acontece, durante a cópula pelo macho cronicamente infectado para a fêmea suscetível ou da fêmea infectada para o macho não infectado, ou ainda através da Inseminação Artificial (I.A.) com sêmen contaminado. No foco infeccioso urogenital, o parasita vive em contato com tecidos do hospedeiro e com suas secreções.

No touro, o local preferencial da infecção são as glândulas epiteliais do pênis e prepúcio, raramente a uretra ou outras regiões mais internas do trato urogenital. Logo após a infecção, pode desenvolver-se um corrimento prepucial associado a pequenos nódulos na membrana prepucial e peniana. Depois disso, não existem quaisquer sintomatologia clínica, tornando-se portador assintomático, podendo disseminar a doença.

Nas fêmeas, as manifestações clínicas incluem aborto, com repetição de cios a intervalos irregulares, vaginite, cervicite, endometrite e piometra.

No início da infecção há uma vaginite, muitas vezes com discreto corrimento catarral ou catarropurulento. Por infecção ascendente, desenvolve-se endometrite (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BONDURANT, 1997).

A fertilização e desenvolvimento do embrião não são necessariamente impedidos. *T.foetus* foi adicionado em meio contendo espermatozóides e oócitos, antes da fertilização *in vitro* e em meio contendo zigotos, 24 horas após a fertilização. Microscopia eletrônica de transmissão não detectou a presença de *T. foetus* em zona pelúcida destes embriões (BIELANSKI; GHAZI; PHIPPS-TOODD, 2004).

A patogenia da perda da gestação ainda não está bem descrita. Se a morte embrionária ocorrer antes do reconhecimento materno da prenhez, entre 14º e 18º dias

após a concepção, as vacas infectadas podem retornar ao estro no período normal (21 dias após o cio). Porém, as perdas embrionárias tardias resultam em intervalos de ciclos longos (2-5 meses). Se não ocorrer morte embrionária, forma-se a placenta, que também reage com inflamação purulenta. O útero então desenvolve intensa piometra, podendo haver aborto, geralmente do 3º ao 5º mês de gestação, com retenção de placenta.

Entre 5 e 10% dos fetos podem não ser abortados; a gestação segue seu curso até que o protozoário penetre a cavidade amniótica; o feto, então, morre e é macerado (CORRÊA; CORRÊA, 1992; BONDURANT, 1997).

As fêmeas infectadas podem autocurar-se muitas vezes, devido à produção de anticorpos contra *T. foetus*, principalmente IgG1 e IgG2, em secreção cervico-vaginal e útero. A imunidade adquirida da infecção natural raramente as protege contra novos desafios (BASTIDA-CORCUERA, 2000).

2. 2. 2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico é feito pela pesquisa de *T. foetus* em material fetal (fluidos do feto abortado e suas membranas fetais), em smegma de prepúcio e pênis de touros e em muco cervico-vaginal das fêmeas (BONDURANT, 1997; PARKER; CAMPBELL; GAJADHAR, 2003).

Técnicas de biologia molecular têm sido empregadas no diagnóstico da tricomoniase bovina tais como sondas de DNA específicas para o ácido nucleico de *T. foetus* e amplificação por reação em cadeia pela polimerase (PCR), que apresenta uma especificidade em torno de 90% (BONDURANT, 1997; MUKHUFHI; IRONS; MICHEL; PETA, 2003).

2. 2. 3 TRATAMENTO

Em um rebanho com muitos animais a tratar, é bastante difícil combater a tricomoniase por via terapêutica nas fêmeas; é viável, portanto tratar somente os machos.

O tratamento de touros infectados pode ser feito pela aplicação tópica com tripaflavina na mucosa prepucial e mucosa peniana, porém os resultados são

inconsistentes. Os machos infectados e com idade superior a 5 anos devem ser descartados pois geralmente tornam-se portadores assintomáticos e, constituem o grande entrave no controle da infecção ou da doença. Há também, tratamento baseado no uso de derivados nitroimidazóis administrados via oral. Deve-se levar em consideração os efeitos colaterais de anorexia, estase rumenal e diarreia com o uso do dimetridazol, além de serem medicações carcinogênicas (PELLEGRIN, 1999).

A vacinação terapêutica ou preventiva tem sido pesquisada. Pesquisas realizadas com fêmeas após imunização com *T. foetus* inativado, em adjuvante oleoso, detectaram a produção de anticorpos específicos contra *T. foetus*, principalmente IgG1 e IgG2, em útero e muco cervico-vaginal desses animais (BASTIDA-CORCUERA, 2000).

Outros estudos demonstram que a vacinação resulta em um significativo aumento da taxa de natalidade em rebanhos, vacinados quando comparados com os não vacinados (VILLARROEL; CARPENTER; BONDURANT, 2004).

Vacinas contendo antígenos de *Campylobacter foetus* e *T. foetus*, administradas por via sistêmica e intravaginal, antes da estação de monta ou no início desta, protegeu novilhas, cobertas por touros portadores de *C. fetus* e *T. foetus* (COBO et al., 2004).

A vacinação pode diminuir a severidade e a duração da infecção, mas nem sempre protege contra novos desafios (VILLARROEL; CARPENTER; BONDURANT, 2004).

2. 3 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade nova de terapia através do uso combinado de um corante (fotossensibilizador) e uma fonte de luz, geralmente o LASER (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) (FERREIRA et al., 2004).

Embora a TFD tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia do câncer, é evidente seu grande potencial terapêutico no que concerne a outras moléstias como a psoríase, micoses e destruição de infecções bacterianas resistentes a tratamentos com antibióticos. A terapia fotodinâmica com derivados de ftalocianinas tem sido eficiente na inativação de vírus, como o do herpes (MACHADO, 2000; CALZAVARA-PINTON et al., 2004; HAMBLIN; HASAN, 2004).

O conceito de TFD teve origem em 1900, quando Oscar Raab demonstrou que paramécios poderiam ser eficientemente mortos por iluminação na presença de fotossensibilizador. No entanto, o começo da TFD moderna teve origem com estudos feitos por Lipson e Schwartz em 1960. Estes pesquisadores observaram que injeção de hematoporfirina induzia o surgimento de fluorescência em lesões neoplásicas que eram visualizadas durante a cirurgia (SIBATA et al., 2000).

2. 3. 1 FOTOSSENSIBILIZADORES

Fotossensibilizadores são substâncias que absorvem energia da luz, de específico comprimento de onda, e são capazes de usar essa energia para induzir reações em moléculas que não a absorvem (SIBATA et al., 2000).

Uma variedade de fotossensibilizadores sintéticos tem sido proposta como a segunda geração destes, por exemplo, as ftalocianinas e clorinas. Pesquisas utilizando esses fotossensibilizadores têm sido desenvolvidas com o intuito de eliminar problemas associados aos fotossensibilizadores da primeira geração, que apresentam fotossensibilização cutânea e fazem uso ineficiente da luz em um comprimento de onda de pouca penetração (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995).

As ftalocianinas induzem sensibilidade à luz na região de comprimento de onda entre 600-1.200 nm, e podem ser conjugadas com uma variedade de metais, como alumínio e zinco, que aumentam seu tempo de vida e melhoram a toxicidade fotodinâmica. A presença de grupos laterais nestes fotossensibilizadores podem alterar sua carga e solubilidade, afetando sua captação pelas células. O aumento no grau de sulfonação das ftalocianinas reduz progressivamente sua afinidade para bicamada lipídica, tornando-as menos fototóxicas. A associação do fotossensibilizador com a bicamada lipídica pode se mais importante que a quantidade produzida de oxigênio reativo produzida (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; ROKITSKAYA et al., 2000).

O transporte da ftalocianina, *in vivo*, geralmente é realizado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL). As LDL são reconhecidas por proteínas receptoras de LDL presente na membrana plasmática. Este processo pode ser favorecido pelas células que contenham um grande número destes receptores, como as células que apresentam alta

taxa de mitose: as tumorais e as endoteliais O complexo LDL-ftalocianina liga-se à receptores para LDL, e então, pode ser internalizado pelas células via endocitose. LDL-ftalocianina geralmente é depositada na membrana plasmática, lisossomos e mitocôndria (FISHER; MURPHREE; GOMER, 1995; MARTINS; ALMEIDA; LARANJINHA, 2004).

2. 3. 2 MECANISMO DE FOTODESTRUÇÃO

A terapia fotodinâmica pode ser designada como uma terapia baseada na fotooxidação da matéria biológica pela sensibilização do fotossensibilizador no tecido alvo. Embora muitos destes fotossensibilizadores possam ser constituintes naturais dos tecidos, numa primeira etapa do tratamento, devem ser introduzidos nos tecidos pela administração direta. Em uma segunda etapa, os tecidos contendo o fotossensibilizador são submetidos à irradiações com o LASER, no comprimento máximo de onda de absorção do fotossensibilizador. A luz, interagindo com o fotossensibilizador, torna-o excitado. Nesse estado, a meia vida do fotossensibilizador é de poucos milionésimos de segundo, durante os quais é capaz de rápida energização do oxigênio dissolvido, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido (H_2O_2), radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) e íons superóxidos ($\text{O}_2^\cdot$), os chamados EROs (espécies reativas de oxigênio). Tais espécies reativas são danosas às funções celulares, resultando em morte celular. Várias organelas celulares podem ser alvos para TFD com diferentes fotossensibilizadores entre elas: membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, Complexo de Golgi, lisossomos e estruturas do citoesqueleto (PAZOS et al., 2003; SCHIEKE, 2004).

3. OBJETIVOS

- Avaliar quantitativamente o efeito citotóxico do fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada em culturas de *Tritrichomonas foetus*, padronizando a concentração e o tempo de incubação anteriormente `a TFD.
- Avaliar quantitativamente o efeito da irradiação laser com meio ativo de InGaAIP, em culturas de *T. foetus*.
- Avaliar quantitativamente o efeito citotóxico da terapia fotodinâmica em cultura de *T. foetus*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *TRITRICHOMONAS FOETUS*

Tritrichomonas foetus linhagem K, gentilmente cedidos pelo Dr. Fernando Costa e Silva Filho — Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho — UFRJ, foram mantidos em meio TYM Diamond's (DIAMOND, 1957) suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa (Forma Scientific) a 37°C com 5% CO₂, e subcultivados a cada 48 horas. O número de protozoários foi padronizado a 1×10^6 células.ml⁻¹.

4.2 FOTOSSENSIBILIZADOR

Foi utilizada a alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AlPcS₄) (Porphyrin Products, INC.). A droga foi dissolvida em salina tampão fosfato (PBS) a uma concentração de 1mM, estocada a 4°C. Para o experimento, o corante foi preparado a uma concentração de 10μM, a partir da solução-estoque e seus espectros de absorção traçados em espectrofotômetro (UV-VIS Varian Cary 50), sendo a leitura realizada em cubeta de quartzo tipo 111-QS 10mm (Hellma[®], Sul Americana LTDA).

4.3 INCUBAÇÃO DOS PROTOZOÁRIOS COM AlPcS₄

Diluições séricas de cultura de *T. foetus* (1×10^6 células.ml⁻¹) foram alicotadas (500μl) em 12 tubos Eppendorf. Em seguida, procedeu-se ao tratamento: 6 tubos sem tratamento e 6 tubos com AlPcS₄. As células foram, então, incubadas por 60 minutos, no escuro, em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e com ele, o fotossensibilizador não captado. 500μl de meio TYM suplementado com 10% de soro fetal bovino foram adicionados em cada tubo Eppendorf.

4.4 IRRADIAÇÃO

O conteúdo de cada Eppendorf foi transferido para cada poço (área = 1,8 cm²) de uma placa de 24 poços: 3 poços para controle (sem tratamento); 3 poços para a AlPcS₄; 3 poços para o LASER; 3 poços para a TFD (figura 4. 4. 1).

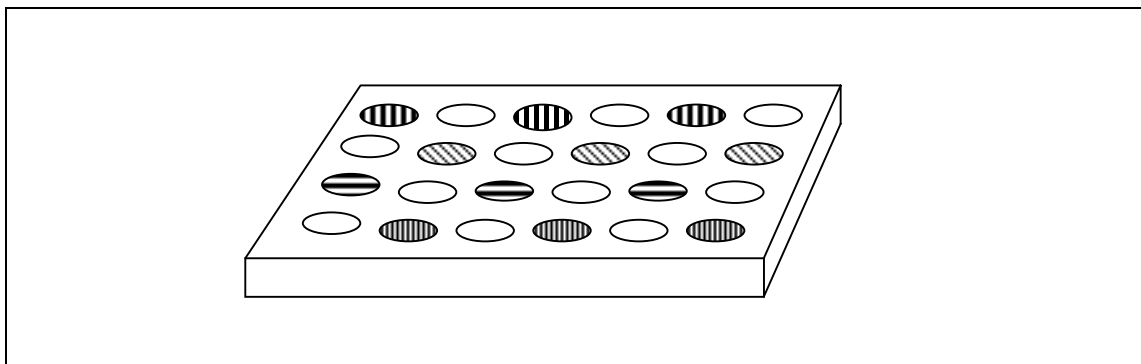


Figura 4. 4. 1: Desenho esquemático da placa de 24 poços com *Tritrichomonas foetus* submetidos a tratamentos:  controle;  AlPcS₄;  LASER;  TFD.

A placa de 24 poços foi submetida a irradiação, no escuro, com um LASER semiconductor (Thera Lase – DMC), com meio ativo de InGaAlP ($\lambda=685$ nm; P=26mW; D.E=0,5 J/cm²; t=35s). A distância da ponta da fibra óptica até os protozoários foi de 10 cm (figura 4. 4. 2). Após a irradiação, as células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por 24 e 48 horas.

4. 5. CONTAGEM DOS PROTOZOÁRIOS APÓS IRRADIAÇÃO

As células foram contadas em câmara de Neubauer 24 e 48 horas após irradiação em Microscópio Óptico Leica ILMB.

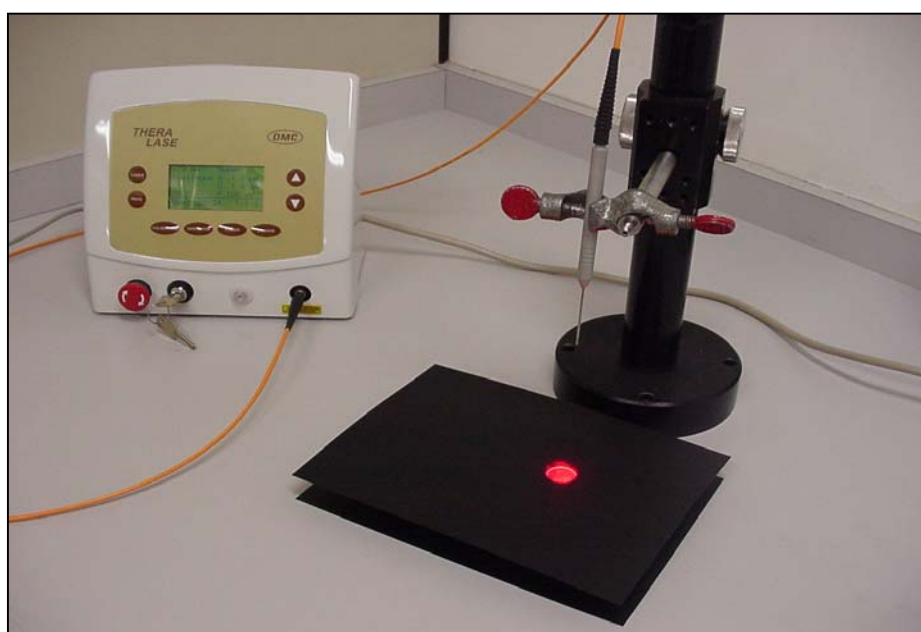


Figura 4. 4. 2. Sistema de irradiação da placa de 24 poços com barreira opaca com orifício do diâmetro do poço.

5. RESULTADOS

5. 1 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO FOTOSSENSIBILIZADOR ALUMÍNIO FTALOCIANINA TETRASSULFONADA (AlPcS₄)

As ftalocianinas têm alta absorção em comprimentos de onda entre 650 – 700nm (KESSEL; DOUGHERTY, 1999). Os fotossensibilizadores, com um alto coeficiente de extinção na região comprimento de onda longo do espectro visível (região do vermelho), são os mais adequados para aplicações em terapia fotodinâmica (KOLÁROVÁ et al., 1999), pois é nessa região em que há uma maior penetração da luz nos tecidos biológicos (WAN et al., 1981). O espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado, AlPcS₄, é mostrado na figura 5. 1. 1.

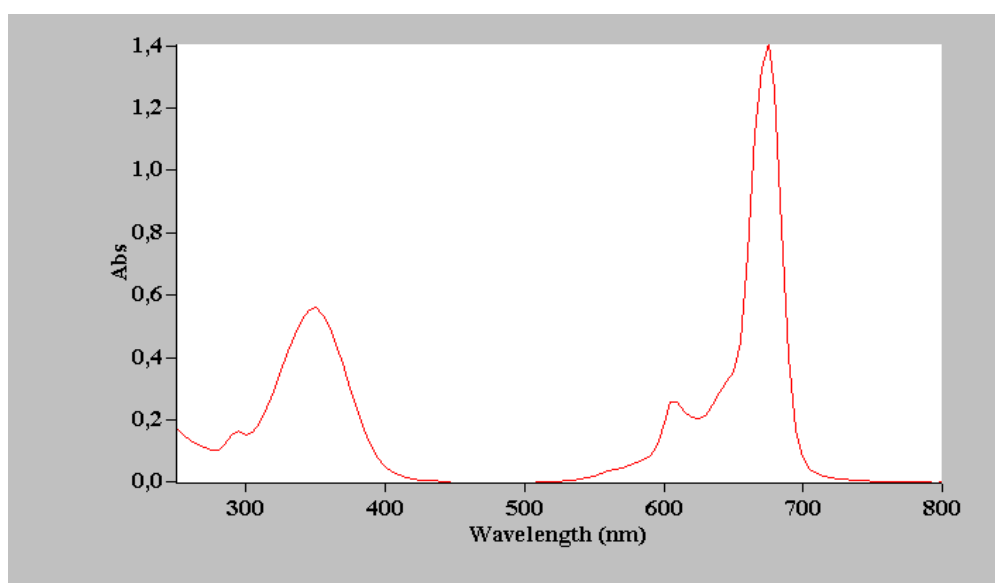


Figura 5. 1. 1: Espectro de absorção da AlPcS₄ (10μM em PBS). Pico de absorção em 675 nm.

5. 2 CONTAGEM DE *T. FOETUS* 24 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Os efeitos do fotossensibilizador AlPcS₄, do LASER e da TFD sobre a cultura de *T. foetus*, foram investigados pela contagem dos parasitas, em câmara de Neubauer, após 24 e 48 horas dos respectivos tratamentos.

O número médio de parasitas-controle obtido pela contagem 24 horas após o período de incubação foi de $11,64 \times 10^6$ células.ml⁻¹ ($\sigma = 0,3$). Já o número médio de parasitas obtido 24 horas após a administração do fotossensibilizador AlPcS₄ foi de $6,2 \times 10^6$ células.ml⁻¹ ($\sigma = 0,8$).

O número de parasitas-controle (sem tratamento) e dos parasitas que receberam AlPcS₄, após 24 horas da administração do tratamento, demonstra que houve uma queda no número de parasitas após a administração da AlPcS₄ (gráfico 5. 2. 1).

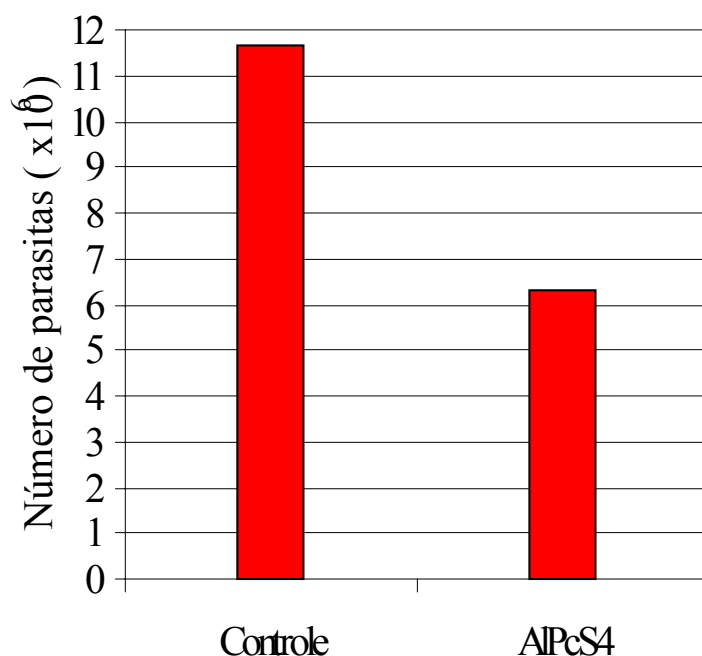


Gráfico 5. 2. 1: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) após a administração de AlPcS₄ e incubação por 24 horas.

Vinte e quatro horas após a administração do LASER sobre *Tritrichomonas foetus*, foi realizada a contagem destes parasitas. O número médio obtido de parasitas foi de $12,3 \times 10^6$ células. ml^{-1} ($\sigma = 1,9$). Comparando o número destes com o obtido na contagem dos parasitas-controle, observa-se que houve um aumento no número de parasitas após o tratamento com LASER (gráfico 5. 2. 2).

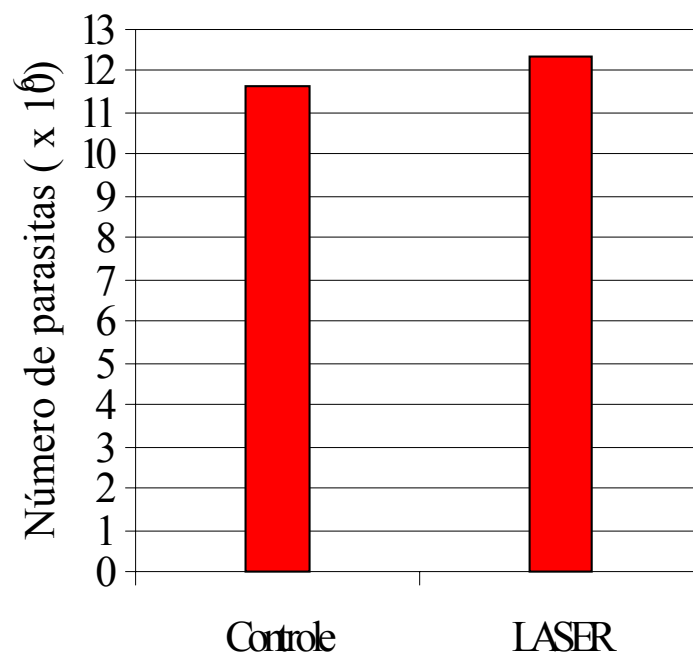


Gráfico 5. 2. 2: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) após 24 horas do tratamento com LASER.

Sobre *T. foetus* foi administrado a TFD e, 24 horas após o tratamento, foi realizada a contagem dos parasitas. O número médio obtido de *Tritrichomonas foetus* foi de $2,2 \times 10^6$ células. ml^{-1} ($\sigma = 0,5$). Comparando o número destes com o obtido na contagem dos parasitas-controle, observa-se que houve uma queda significativa no número de parasitas (gráfico 5. 2. 3).

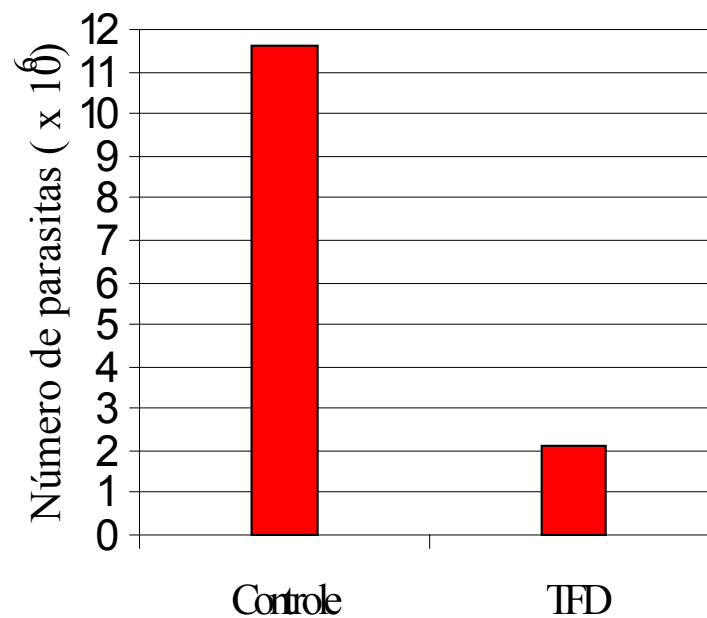


Gráfico 5. 2. 3: Número de parasitas-controle e de parasitas ($\times 10^6$) 24 horas após o tratamento com TFD.

Os resultados em porcentagem, obtidos da contagem dos parasitas-controle e dos parasitas que receberam a administração de AlPcS₄, LASER e TFD, após 24 horas, são demonstrados pelo gráfico 5. 2. 4.

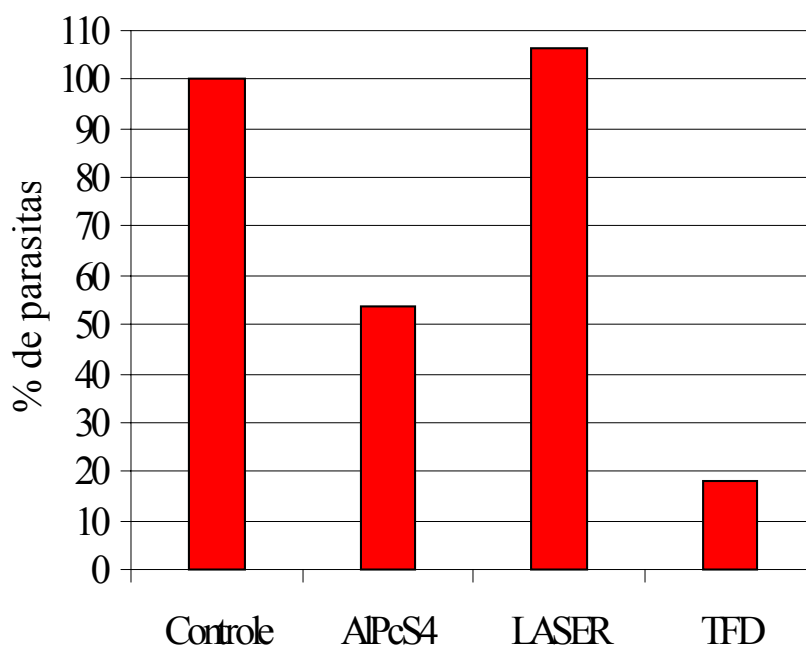


Gráfico 5. 2. 4: Porcentagem de parasitas-controle e de parasitas, 24 horas após a administração dos tratamentos com AlPcS₄, LASER e TFD.

Os resultados obtidos neste experimento demonstram que o número de *T. foetus* após incubação, no escuro, com a AlPcS₄ na concentração de 10μM, resultou em diminuição do número destes protozoários em 46%. Já o tratamento destes parasitas com LASER resultou em um aumento do seu número em 6%. A ação da TFD ocasiona uma acentuada diminuição do número de *T. foetus*, 82%.

5. 3 CONTAGEM DOS PARASITAS 48 HORAS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Os parasitas-controle (sem tratamento) e os parasitas que receberam o tratamento com AlPcS_4 , LASER e TFD foram contados após 48 horas da administração destes tratamentos.

O número médio obtido pela contagem de *T. foetus*, 48 horas após a incubação, foi de $6,7 \times 10^6$ células. ml^{-1} ($\sigma = 0,5$).

Os resultados demonstram uma queda do número de parasitas-controle, após 48 horas de incubação, em relação ao número de parasitas-controle contados após 24 horas de incubação (gráfico 5. 3. 1).

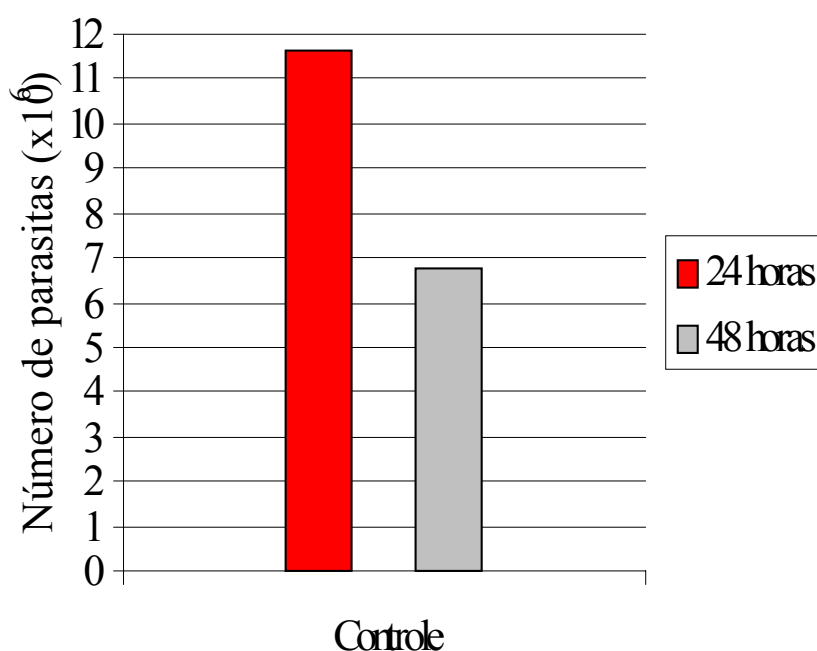


Gráfico 5. 3. 1: Comparação do número de parasitas-controle ($\times 10^6$) após 24 e 48 horas do período de incubação.

Quarenta e oito horas após a administração de AlPcS_4 em *T. foetus*, o número médio destes parasitas obtido pela contagem foi de $6,4 \times 10^6$ células. ml^{-1} ($\sigma = 0,4$).

Houve um pequeno aumento do número de parasitas 48 horas após o tratamento com AlPcS_4 quando comparado com o número de parasitas obtidos 24 horas após o mesmo tratamento (gráfico 5. 3. 2).

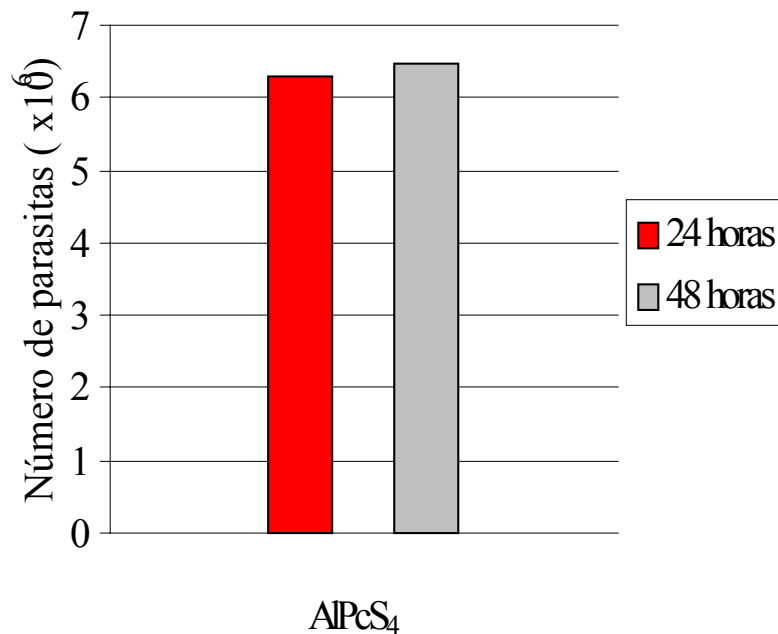


Gráfico 5. 3. 2: Comparação do número de parasitas ($\times 10^6$) após 24 e 48 horas da administração do fotossensibilizador AlPcS_4 .

A contagem dos parasitas, após 48 horas do tratamento com LASER, resultou em um número médio de $5,7 \times 10^6$ células. ml^{-1} ($\sigma = 0,3$). Este número foi comparado com o número de parasitas após 24 horas da administração do mesmo tratamento. Verificou-se uma queda do número destes após 48 horas do tratamento com LASER (gráfico 5. 3. 3).

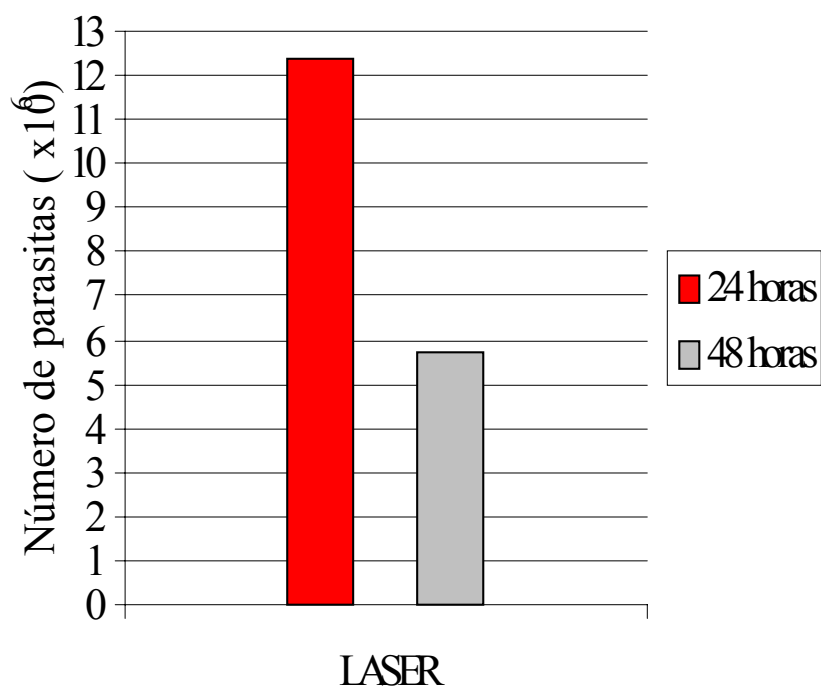


Gráfico 5. 3. 3: Comparação do número de parasitas ($\times 10^6$) 24 e 48 horas após a administração do LASER.

Um aumento significativo no número de parasitas 48 horas após a administração de TFD foi observado após a contagem: $4,54 \times 10^6$ células.ml⁻¹ ($\sigma = 0,2$) (gráfico 5. 3. 4)

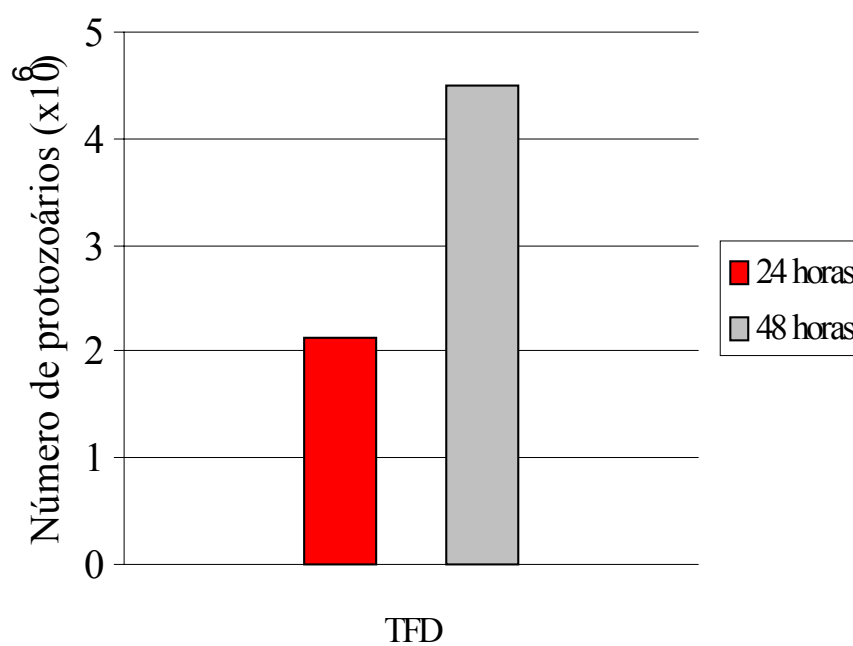


Gráfico 5. 3. 4: Número de parasitas (x10⁶) 24 e 48 horas após a administração da TFD.

Os resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico 5. 3. 5, quando se compara o número de parasitas-controle e parasitas 24 e 48 horas após administração de AlPcS_4 , do LASER e da TFD.

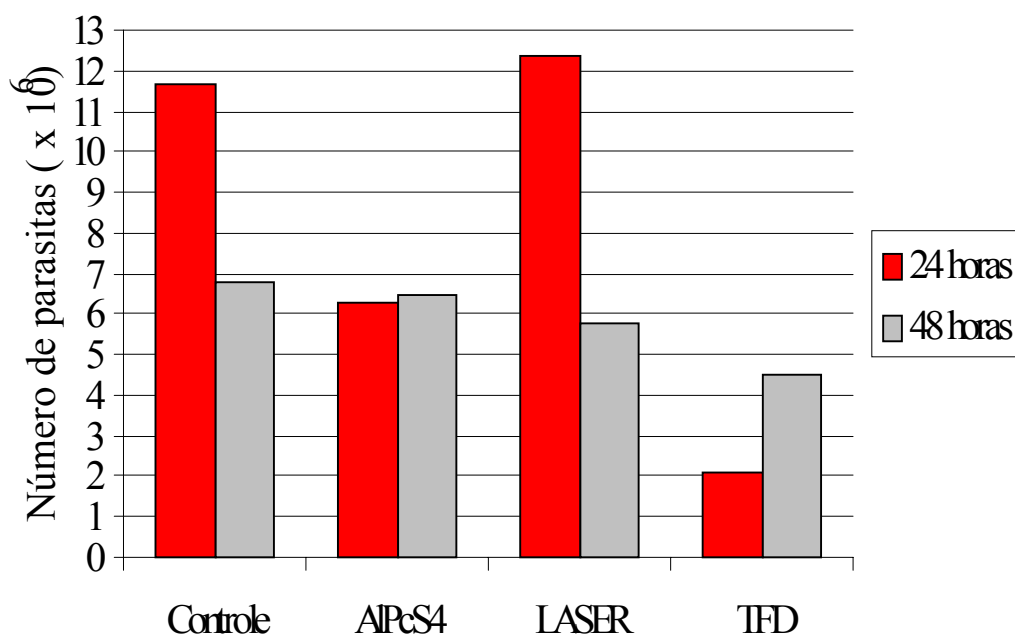


Gráfico 5. 3. 5: Resultados comparativos do número de parasitas (x10⁶) com a administração de AlPcS_4 , LASER e TFD, após 24 e 48 horas de incubação.

6. DISCUSSÃO

Tritrichomonas foetus é o agente etiológico da tricomoníase bovina, uma doença sexualmente transmissível, que apresenta ampla distribuição mundial. No foco infeccioso, o parasita vive em contato com tecidos do hospedeiro e com suas secreções. Neste ambiente de baixa tensão de oxigênio, a permanência da infecção tem sucesso, visto ser o parasita anaeróbico facultativo.

A terapia fotodinâmica, historicamente, é utilizada no tratamento de neoplasias, entretanto esta terapia tem sido empregada na destruição de microorganismos patogênicos, por exemplo, no tratamento de placas bacterianas. Uma variedade de fotossensibilizadores, naturais e sintéticos, estão disponíveis com diferentes propriedades físico-químicas e de absorção de luz, possibilitando o estudo de novos métodos para destruição de microorganismos (WAINWRIGHT, 1998; CALZAVARA-PINTON, 2004; HAMBLIN; HASAN, 2004).

A terapia fotodinâmica com o emprego dos fotossensibilizadores porfirina e clorina mostraram *in vitro* um efeito fototóxico limitado contra bactérias, enquanto que clorina conjugada a pentalisina mostrou atividade *in vitro* contra todos os microorganismos orais testados, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum* (ROVALDI et al., 2000).

A ação citotóxica da terapia fotodinâmica em protozoários tem sido pouco estudada.

A TFD, com o fotossensibilizador silício ftalocianina (Pc 4), inativa *Trypanosoma cruzi*, na forma tripomastigota, em culturas de células vermelhas (RBCC) e plasma sanguíneo (GOTTLIEB et al., 1995).

Estudos demonstraram que *Leishmania amazonensis* transfectadas com genes que codificam enzimas catalizadoras da biossíntese do grupo heme, suplementadas com ácido delta-aminolevulínico (ALA), produziam uroporfirina I. A infecção, *in vitro*, de células tumorais monocíticas (J774) pelas *L. amazonensis* transgênicas, seguidas pela irradiação UV, resultou em lise destas células. O autor sugere o uso desses protozoários como fonte de porfirinas exógenas para terapia fotodinâmica, no tratamento de câncer e outras doenças malignas (SAH et al., 2002).

Morte celular por apoptose ocorreu em *Acanthamoeba palestinensis* incubada, por 3 horas, com o fotossensibilizador ftalocianina tetracatiônica (RLP068) a uma concentração de 1.0 μM e irradiada com LASER ($\lambda = 700\text{nm}$; D.E.= 30 J/cm^2) (KASSAB et al., 2003).

Não há pesquisas sobre a ação da TFD em culturas de *T. foetus*, sendo assim, neste experimento, foi testada a ação do fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada (AlPcS₄), LASER e da terapia fotodinâmica (TFD) em culturas de *Tritrichomonas foetus*.

Os testes *in vitro* apresentam vantagens devido à rápida disponibilidade dos dados referentes à natureza do efeito das substâncias testadas, exatidão e objetividade dos resultados dos testes. Esse modo de teste prevê informações complementares importantes sobre as propriedades biológicas das substâncias examinadas *in vivo*.

Segundo Pazos et al. (2003) a captação dos fotossensibilizadores em suspensão de células tumorais tem sido padronizada a uma concentração inicial de 10 μM , o tempo de incubação por 60 minutos à temperatura de 37°C. Para a realização deste experimento, padronizou-se, então, a incubação de *T. foetus* com o fotossensibilizador (AlPcS₄) a uma concentração de 10 μM por 60 minutos à temperatura de 37°C.

A padronização do tempo para análise dos efeitos da terapia fotodinâmica, do fotossensibilizador (AlPcS₄) e do LASER nos parasitas foi, também, de acordo com Pazos et al. (2003), que verificou uma maior porcentagem de células HeLa e CHO-K1 danificadas após 24 horas da terapia fotodinâmica. *T. foetus* não tratados foram utilizados como controle.

Os protozoários parasitas submetidos a tratamento com AlPcS₄, LASER e TFD foram contados após 24 e 48 horas de incubação, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% CO₂.

Observou-se uma queda no número de parasitas-controle após 48 horas de incubação, quando comparado com o número de parasita-controle após 24 horas de incubação. O crescimento acelerado nas primeiras horas após incubação é explicado pela disponibilidade de alimento e espaço no meio de cultura; sendo as condições boas para o crescimento, ele ocorre sem impedimentos. Com o decorrer das horas, é provável que ocorreu uma estabilização do crescimento seguida de um declínio do tamanho

populacional e morte dos indivíduos, devido à falta de alimento e excretas liberados pelos parasitas.

A ação da AlPcS₄ em *T. foetus* resultou em uma acentuada queda no número de parasitas (em torno de 46%), após 24 horas da administração e incubação no escuro destes com a droga.

Os protozoários *Trypanosoma cruzi*, na forma tripomastigota, também apresentaram morte celular após tratamento com a silício ftalocianina, no escuro (GOTTLIEB et al., 1995).

PAZOS et al. (2003) observaram uma baixa toxicidade da AlPcS₄ em células HeLa e CHO-K1 no escuro.

Fatores podem ter influenciado no resultado aqui obtido: o tipo celular e a forma como o fotossensibilizador liga-se à bicamada lipídica deste protozoário (ROKITSKAYA et al., 2000).

São necessários mais estudos sobre a toxicidade da AlPcS₄ em *T. foetus*, pois este fotossensibilizador pode ser usado como proposta de tratamento para a tricomoniase, com ou sem a exposição de luz.

Constatou-se um aumento no número de parasitas, 24 horas após o tratamento com LASER (em torno de 6%), a uma densidade de energia igual a 0,5 J/cm², quando comparado com o número de parasitas-controle, 24 horas após o período de incubação. Provavelmente o LASER estimulou a proliferação celular, tendo, portanto, um efeito bioestimulador.

A radiação LASER pode estimular a proliferação celular e a diferenciação celular, mecanismo este dependente da densidade de energia aplicada (GROSSMAN et al., 1998; GRECO et al., 2001).

Estudos demonstram que o LASER He-Ne (632.8 nm) a uma densidade de energia de 0,6 J/cm², combinado à fatores de crescimento e hormônio de crescimento estimulam a proliferação celular (AL-WATBAN; ANDRES, 2000).

Proliferação celular ocorreu em culturas de hepatócitos irradiados com LASER He-Ne (632.8 nm) a uma densidade de energia igual a 0,24 J/cm². A estimulação celular está relacionada com a interação luz-mitocôndria que resulta em aumento: do potencial de membrana; seqüestro de Ca²⁺; síntese de ATP (GRECO et al., 2001).

Após 48 horas da administração do LASER em *T. foetus*, o número destes diminuíram, provavelmente devido à grande quantidade de parasitas e conseqüente falta de alimento e excretas liberados por eles no meio de cultura, como discutido anteriormente.

Neste experimento, a ação da TFD em *T. foetus* resultou em uma acentuada diminuição do número destes (em torno de 82%), 24 horas após o tratamento, demonstrando que este tipo de terapia é eficaz contra *T. foetus in vitro*.

A ação da TFD resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são danosas às funções celulares, resultando em morte celular (SCHIEKE et al., 2004).

Pesquisas demonstram que H_2O_2 produz morte celular em *Leishmania donovani* com ativação de proteínas semelhantes às caspases, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e perda de volume celular (DAS; MUKHERJEE; SHAHA, 2001).

Lloyd et al. (2000) demonstrou que em *Giardia intestinalis* danos oxidativos afetam o sistema de eletro-transporte, responsável pela redução de O_2 , bem como a membrana plasmática que tem alterado o processo de regulação do volume celular, tendo como conseqüência o inchaço destas células.

Após tratamento de culturas de *T. foetus* com H_2O_2 , observou-se a inibição da motilidade e aumento da incidência da morte celular, ambas dependentes da concentração de H_2O_2 , sugerindo a importância do grau de estresse oxidativo para a sobrevivência da célula (MARIANTE et al., 2003).

A contagem do número de *T. foetus* após 48 horas da aplicação da TFD demonstra que houve um aumento do número destes parasitas. Este fato pode ser explicado pelo ciclo de vida deste protozoário, que leva em torno de 4 horas.

Considerando-se que 18% dos protozoários demonstraram não serem afetados pela TFD após 24 horas, e que, portanto, havia disponibilidade de alimento e espaço no meio de cultura, já que o número destes era reduzido, acredita-se que estes parasitas dividiram-se, contribuindo para o aumento de seu número. O mesmo foi observado após tratamento destes protozoários parasitas com H_2O_2 , seguido de teste imunocitoquímico, com o anticorpo CM1, que marcou proteínas semelhantes às caspases-3. Após 8 horas do tratamento de *T. foetus* com H_2O_2 , houve um aumento do número de células negativas para esta marcação (MARIANTE et al., 2003).

São necessários estudos adicionais da ação, concentração e tempo de incubação do fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada em culturas de *T. foetus*, bem como a ação citotóxica da TFD nestas culturas, para o desenvolvimento de um tratamento adequado contra a tricomoniase bovina.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, chega-se às seguintes conclusões:

- A terapia fotodinâmica é efetiva contra *Tritrichomonas foetus in vitro*.
- O fotossensibilizador alumínio ftalocianina tetrassulfonada possui uma ação citotóxica em culturas de *Tritrichomonas foetus*, podendo vir a ser utilizado como um tratamento em potencial contra a tricomoníase bovina.
- O aumento do número de *Tritrichomonas foetus*, após a irradiação LASER a uma densidade de energia de $0,5 \text{ J/cm}^2$, sugere a ação bioestimulatória desta irradiação.
- Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os mecanismos de morte celular deste protozoários submetidos à TFD.
- A toxicidade e seletividade dos fotossensibilizadores e os parâmetros do LASER empregados em culturas de *T. foetus* deverão também ser analisados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFFONSO, A. L.; ALMEIDA, J. C. A.; BENCHIMOL, M. Partial characterization of cytoplasmic compartments involved in the endocytic process of *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, n. 72, p. 247-256, 1995.

ALMEIDA, J. C. A.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W.; OKOROKOV L. A. Ca^{2+} -sequestering in the early-branching amitochondriate protozoan *Tritrichomonas foetus*: an important role of the Golgi complex and its Ca^{2+} -ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1615, p. 60-68, 2003.

AL-WATBAN, F. A. H.; ANDRES, B. L. Effect of He-Ne Laser (632.8 nm) and PolygenTM on CHO cells. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v.18, n.3, p.145-150, 2000.

BASTIDA-CORCUERA F.; BUTLER J. E.; HEYERMANN H.; THOMFORD J. W.; CORBEIL L. B. *Tritrichomonas foetus* extracellular cysteine proteinase cleavage of bovine IgG2 allotypes. **J. Parasitol.**, v 86, n. 2, p. 328-32, 2000.

BENCHIMOL, M.; ELIAS, C. A.; DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: ultrastructural localization of basic proteins and carbohydrates. **Exp. Parasitol.**, n. 54, p. 135-144, 1982.

_____. *Tritrichomonas foetus*: fine structure of freeze-fractured membranes. **J. protozool.**, n. 29, p. 348-353, 1982.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. *Tritrichomonas foetus*: cytochemical visualization of the endoplasmic reticulum-Golgi complex and lipids. **Experimental Parasitology**, n. 59, p. 51-58, 1985.

BENCHIMOL, M.; BATISTA, C.; DE SOUZA, W. Fibronectin and lamin iniceated endocytic activity in the parasitic protozoa *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **J. Submicrosc. Cythol. Pathol.**, n. 22, p. 39-45, 1990.

BENCHIMOL, M.; KACHAR, B.; DE SOUZA, W. Surface domains in the anogenic protozoan *Tritrichomonas foetus*. **J. Protozool.**, n. 39, p. 480-484, 1992.

BENCHIMOL, M.; DINIZ, J. A. P.; RIBEIRO, K. The fine structure of the axostyle and its associations with organelles in *Trichomonads*. **Tissue & Cell**, v. 32, n. 2, p. 178-197, 2000.

BENCHIMOL, M.; RIBEIRO, K. C.; MARIANTE, R. M.; ALDERETE, J. F. Structure and division of the Golgi complex in *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, n. 80, p. 593-607, 2001.

BENCHIMOL, M.; BERNARDINO, M. V. Ultrastructural localization of glycoconjugates in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol Res.**, n. 88, p. 134-143, 2002.

BENCHIMOL, M.; ENGELKE, F. Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. **Biology of the cell**. n. 95, p. 283-293, 2003.

BIELANSKI A.; GHAZI D. F.; PHIPPS-TOODD B. Observations on the fertilization and development of preimplantation bovine embryos in vitro in the presence of *Tritrichomonas foetus*. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 821-829, 2004.

BONDURANT, R. H. Pathogenesis, diagnosis, and management of Trichomoniasis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 13, n.2, p. 345-361, 1997.

BONILHA, V. L.; CIAVAGLIA, M. C.; DE SOUZA, W.; SILVA-FILHO, F. C. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. **Parasitol Res.**, v. 81, p. 121-126, 1995.

CALZAVARA-PINTON P. G.; VENTURINI M.; CAPEZZERA R.; SALA R.; ZANE C. Photodynamic therapy of interdigital mycoses of the feet with topical application of 5-aminolevulinic acid. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 20, n. 3, p.144-147, 2004.

CERKASOVÁ, A.; CERKASOV, J.; KULDA, J. Resistance of trichomonads to metronidazole. **Acta Universitatis Carolinae- Biologica.** , n. 30, p. 485-503, 1986.

COBO E. R.; MORSELLA C.; CANO D.; CIPOLLA A.; CAMPERO C. M. Immunization in heifers with dual vaccines containing *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* antigens using systemic and mucosal routes. **Theriogenology**, v. 62, n. 8, p. 1367-1382, 2004.

COBO E. R.; CAMPERO C. M.; GIMENO E. J.; BARBEITO C. G. Lectin binding patterns and immunohistochemical antigen detection in the genitalia of Tritrichomonas foetus-infected heifers. **J Comp Pathol.**, v.131, n. 2-3, p. 127-134, 2004.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. N. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos.** Rio de Janeiro: Medsi, 1992. 245p.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J Cell Sci.**, n . 114, p. 2461-2469, 2001.

DA SILVA, N. S.; DIAS FILHO, B. P.; DE SOUZA, W. Structural changes at the site of *Tritrichomonas foetus*-erythrocyte interaction. **Cell Structure and Function.** n. 21, p. 245-250, 1996.

DAVIS, S. R.; LUSHBAUGH, W. B. Oxidative stress and *Trichomonas vaginalis*: the effect of hydrogen peroxide in vitro. **Am J Trop Med Hys.**, v. 48, n. 4, p. 480-487, 1993.

DE CARLI G. A.; TASCA T.; PIRES BORGES F. *Tritrichomonas foetus*: a scanning electron microscopy study of erythrocyte adhesion associated with hemolytic activity. **Vet. Res.** V. 35, n. 1, p. 123-130, 2004.

DIAMOND, L.S. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. **The Journal of Parasitology**, n. 43, p.488-490, 1957.

FERNANDES, J. C. T.; MARQUES, C.; FARIA, M. L. E.; FARIA, C. M. Tricomonose bovina em rebanho leiteiro. **Arq Fac Vet UFRGS.** v. 7, p. 155-161, 1979.

FERREIRA, S. R. M.; TEDESCO, A. C.; SOUSA, G.; ZÂNGARO, R. A.; SILVA, N. S.; PACHECO, M. T. T.; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlPcS₄. **Lasers in Medical Science**, n. 18, p. 207-212, 2004.

FISHER, A. M. R.; MURPHREE, A. L.; GOMER, C. J. Clinical and preclinical photodynamic therapy. **Lasers in Surgery and Medicine**, n. 17, p. 2-31, 1995.

GIEZEN, M.; SLOTBOOM, D. J.; HORNER, D. S.; DYAL, P. L.; HARDING, M.; XUE, G.; EMBLEY T. M.; KUNJI, E. R. S. Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: a common origin for both organelles. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 4, p. 572-579, 2002.

GOMES, M. J. P.; FERNANDES, J. C. T.; SILVA, C. E.; SOUSA, S. T. B. Identificação do *Tritrichomonas foetus* em bovinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq Fac Vet UFRGS.**, v. 19, p. 103-111, 1991.

GOTTLIEB, P.; SHEN, L.; CHIMEZIE, E.; BAHNG, S.; KENNEY, M. E.; HOROWITZ, B.; BEN-HUR, E. Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components by photodynamic treatment with phthalocyanines. **Photochemistry and Photobiology**. v. 62, n. 5, p. 869-874, 1995.

GRECO, M.; VACCA, R. A.; MORO, L.; PERLINO, E.; PETRAGALIO, V.; MARRA, E.; PASSARELLA, S. Helium-neon laser irradiation of hepatocytes can trigger increase of the mitochondrial membrane potential and can stimulate *c-fos* expression in a Ca^{2+} -dependent manner. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 29, p. 433-441, 2001.

GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 22, p. 212-218, 1998.

HAMBLIN M. R.; HASAN T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochem Photobiol Sci.**, v.3, n. 5, p. 436-50, 2004.

HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **J Protozool.**, v. 10, p. 10-63, 1963.

KASSAB K.; DEI D.; RONCUCCI G.; JORI G.; COPPELLOTTI O. Phthalocyanine-photosensitized inactivation of a pathogenic protozoan, *Acanthamoeba palestinensis*. **Photochem Photobiol Sci.** v. 2, n. 6, p. 668-672, 2003.

KESSEL, D.; DOUGHERTY, T. J. Agents used in photodynamic therapy. **Rev Contemp Pharmacother.**, n. 10, p. 19-24, 1999.

KLEINA P.; BETTIM-BANDINELLI J.; BONATTO S. L.; BENCHIMOL M.; BOGO M. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences. **Int J Parasitol.** , v. 34, n. 8, p. 963-970, 2004.

KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; LUDVIK, J. Basic structure and function of the trichomonad cell. **Acta Universitatis Carolinae- Biologica.** n. 30, p. 181-198, 1986.

LAND, K. M.; CLEMENS, D. L.; JOHNSON, P. J. Loss of multiple hydrogenosomal proteins associated with organelle metabolism and high-level drug resistance in trichomonads. **Experimental Parasitology**, n. 97, p. 102-110, 2001.

LLOYD, D.; HARRIS, J. C.; MAROULIS, S.; BIAGINI G. A.; WADLEY, R. B.; TURNER, M. P.; EDWARDS, M. R. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: oxygen and its reaction products collapse membrane potential and cause cytotoxicity. **Microbiology**, v. 146, p. 3109-3118, 2000.

LÓPEZ, L. B.; MELO-BRAGA, M. B.; LÓPEZ J. O.; ARROYO, R.; SILVA-FILHO, F. C. Strategies by which some pathogenic trichomonads integrate diverse signals in the decision-making process. **An Acad Bras Cie.**, v. 72, n. 2, p. 173-186, 2000.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v.23, n. 2, p.237-243, 2000.

MARIANTE, R. M.; GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R.; BENCHIMOL, M. Hydrogen peroxide induces caspase activation and programmed cell death in the amitochondrial *Tritrichomonas foetus*. **Histochem. Cell Biol.** N. 120, p. 129-141, 2003.

MARTINS J.; ALMEIDA L.; LARANJINHA J. Simultaneous production of superoxide radical and singlet oxygen by sulphonated chloroaluminum phthalocyanine incorporated in human low density lipoproteins. Implications for photodynamic therapy. **Photochem Photobiol.** 2004 Mar 1.[prelo]

MEGALE, F. Identificação do *trichomonas foetus* em Minas Gerais. **Arq Esc Vet UFMG.**, n. 15, p. 405, 1963.

MELO, M. R. Dados sobre a incidência da tricomonose bovina em alguns estados do Brasil. **Boletim de Inseminação Artificial**, n. 6, p. 16-23, 1954.

MELO-BRAGA, M. B.; ROCHA-AZEVEDO, B.; SILVA-FILHO, F. *Tritrichomonas foetus*: the role played by iron during parasite interaction with epithelial cells. **Experimental Parasitology**, n. 105, p. 111-120, 2003.

MONTEIRO-LEAL, L. H.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Isolation and biochemical characterization of the costa of *Tritrichomonas foetus*. **European Journal of Cell Biology**, v. 60, p. 235-242, 1993.

MONTEIRO-LEAL, L. H.; FARINA, M.; BENCHIMOL, M.; KACHAR, B.; DE SOUZA, W. Coordinated flagellar and ciliary beating in the protozoon *Tritrichomonas foetus*. **J Euk Microbiol.**, v. 42, n. 6, p. 709-714, 1995.

MUKHUFHI N.; IRONS P. C.; MICHEL A.; PETA F. Evaluation of a PCR test for the diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in bulls: effects of sample collection method, storage and transport medium on the test. **Theriogenology.** , v. 60, n.7, p. 1269-1278, 2003.

MÜLLER, M. The hydrogenosome. **Journal of General Microbiology**, n.. 139, p. 2879-2889, 1993.

PARKER S, CAMPBELL J, GAJADHAR A. Comparison of the diagnostic sensitivity of a commercially available culture kit and a diagnostic culture test using Diamond's media for diagnosing *Tritrichomonas foetus* in bulls. **J Vet Diagn Invest.**, v. 15, n. 5, p. 460-465, 2003.

PAZOS, M. C.; PACHECO C. S.; DA SILVA N. S.; DAMATTA R. A.; PACHECO M. T. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. **Biocell.** v. 27, n. 3, p. 301-309, 2003.

PELLEGRIN, O. A. A campilobacteriose e tricomonose são doenças emergentes? **Rev Bras Reprod Anim.**, v. 23, n. 4, p. 523-531, 1999.

QUEIROZ, R. C. B.; SILVA SANTOS, L. M.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. Cytochemical localization of enzymes markers in *Tritrichomonas foetus*. **Parasitol Res.**, n. 77, p. 561-566, 1991.

RAAB, O. Über die wirkung fluoreszierenden stoffen. **Infusoria Z Biol.**, n. 39, p. 524-546, 1990.

RABELLO, E. X. Incidência de *Trichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) em touros usados para inseminação artificial no Estado de São Paulo. **Rev Fac Med Vet São Paulo**, v. 5, n. 3, p. 539-548, 1995.

RIBEIRO, K. C.; MARIANTE, R. M.; COUTINHO, L. L.; BENCHIMOL, M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. **Biology of the Cell**, n. 94, p. 289-301, 2002.

ROEHE, R. Tricomoniase bovina. **Bol Dir Prod Anim.**, v. 4, n. 6, p. 21-26, 1948.

ROKITSKAYA, T. I.; BLOCK, M.; ANTONENKO, Y. N.; KOTOVA, E. A.; POLT, P. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels. **Biophys J.**, v. 78, n. 5, p. 2572-2580, 2000.

ROVALDI, C. R.; PIEVSKY, A.; SOLE, N. A.; FRIDEN, P. M.; ROTHSTEIN, D. M.; SPACCIAPOLI, P. Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 44, n. 12, p.3364-3367, 2000.

SAH, J. F.; ITO, H.; KOLLI, B. K.; PETERSON, D. A.; SASSA, S.; CHANG, K. Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 17, p.14902-14909, 2002.

SIBATA, C. H.; COLUSSI, V. C.; OLEINICK N. L.; KINSELLA, T. J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. *Braz. J Med Biol Res.*, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SCHIEKE S.M.; VON MONTFORT C.; BUCHCZYK D. P.; TIMMER A.; GRETHER-BECK S.; KRUTMANN J.; HOLBROOK N. J.; KLOTZ L. O. Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic Res.*, v. 38, n. 7, p. 729-737, 2004.

SILVA-FILHO, F. C.; DE SOUZA, W. Effect of colchicine, vimblastine and cytochalasin B on cell surface anionic site of *Tritrichomonas foetus*. *J protozool.*, n. 33, p. 6-10, 1986.

SILVA-FILHO, F. C.; DE SOUZA, W.; LOPES, J. D. Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc Natl Acad Sci.*, n. 85, p. 8042-8046, 1988.

SINGH B. N.; LUCAS J. J.; HAYES G. R.; KUMAR I.; BEACH D. H.; FRAJBLAT M.; GILBERT R. O.; SOMMER U.; COSTELLO C. E. *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells. *Infect Immun.*, v. 72, n. 7, p. 4151-4158, 2004.

VILLARROEL A.; CARPENTER T. E.; BONDURANT R. H. Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against *Tritrichomonas foetus* on reproductive efficiency in beef herds. *Am J Vet Res.*, v. 65, n. 6, p. 770-775, 2004.

TACHEZY J.; TACHEZY R.; HAMPL V.; SEDINOVA M.; VANACOVA S.; VRLIK M.; VAN RANST M.; FLEGR J.; KULDA A. J. Cattle pathogen *tritrachomonas foetus* (Riedmuller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J Eukaryot Microbiol.*, v. 49, n. 2, p. 154-163, 2002.

TRICOMONOSE BOVINA. In: MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina. 1982. p. 295-307.

ULTRAESTRUTURA CELULAR. **Publicações eletrônicas**. Disponível em: <http://www.biologo.com.br/marlenebenchimol/fotosmicro/pages/Tfoetus_varredura_jpg.htm>. Acesso em : 10 set. 2004.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **J Antimicrob Chemother.**, v. 42, n. 1, p. 13-28, 1998.

WAN, S. Transmittance of nonionizing radiation in human tissues. **Photochem Photobio.**, v. 34, p. 679-681, 1981

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)