

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

*"Estudo da Interação de **Toxoplasma gondii** com Células Hospedeiras Após  
Terapia Fotodinâmica- TFD"*

*SIDNEY BULIZANI*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos- SP

2005

**Universidade do Vale do Paraíba**  
**Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento**

"Estudo da Interação de *Toxoplasma gondii* com células hospedeiras após terapia fotodinâmica- TFD"

*SIDNEY BULIZANI*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica

Orientadora: Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos- SP

2005

B953e

Bulizani, Sidney

Estudo da Interação de *Toxoplasma gondii* Com Células Hospedeiras Após Terapia Fotodinâmica- TFD/ Sidney Bulizani. São José dos Campos: UniVap, 2005. 56p.: il.; 30cm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

1. Toxoplasma 2. Cultura de tecidos 3. Células VERO  
4. Terapia a laser de baixa potência 5. Terapia fotodinâmica  
I. Pacheco Soares, Cristina, Orient. II. Título

CDU: 57.086.8

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmico e científicos a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores ou transmissão eletrônica.

Assinatura:



Data: 28 de fevereiro de 2005

**“ESTUDO DA INTERAÇÃO DE *Toxoplasma gondii* COM CÉLULAS HOSPEDEIRAS  
APÓS TERAPIA FOTODINÂMICA - TFD”**

Sidney Bulizani

Banca Examinadora:

Prof. Dr. NEWTON SOARES DA SILVA (UNIVAP)



Profa. Dra. CRISTINA PACHECO SOARES (UNIVAP)



Profa. Dra. LÚCIA DE FÁTIMA DE MENEZES FEITOSA (UFRJ)



Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco  
Diretor do IP&D - UniVap  
São José dos Campos, 28 de fevereiro de 2005.

Dedico este  
trabalho a minha  
amada esposa, Reiko , e nossos  
familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores das várias disciplinas que cursei na fase inicial, pela dedicação e paciência no ensino de conteúdos totalmente novos em minha formação.

Aos colegas de curso, pela cumplicidade, parceria e afetividade ; diminuindo as distâncias entre as várias matizes de conhecimento do grupo, proporcionando um convívio saudável nas fases mais críticas do processo de aprendizado.

A Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, pela acolhida, paciência e presença no processo de ensino prático de bancada; dedicada, incentivadora, objetiva e edificadora em todo o processo de orientação, passando-me bastante segurança e domínio para as atividades laboratoriais e visão perspectiva para novos projetos.

As graduandas bolsistas Maíra Maftoum Costa e Karina Teixeira Naves, assim como as demais bolsistas e estagiárias do laboratório de Biologia Celular e Tecidual do IP&D da UNIVAP pelo auxílio com o material e equipamentos envolvidos no projeto; agradeço profundamente pela paciência, disponibilidade, carinho, dedicação e profissionalismo para ensinar e auxiliar nos primeiros passos e durante as atividades práticas de meu projeto .

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela dedicação e empenho no ensino da terapia fotodinâmica e pela composição e fornecimento do fármaco (Cloro Alumínio Ftalocianina Lipossomal) utilizado em minhas pesquisas.

Ao Mestrando, Sr. Mário Lopes Rebello, colega de estudos e atividades, confiante, ouvinte paciente nas fases mais críticas do mestrado e que, sempre com palavras sábias e estimuladoras, ajudou-me a seguir nesta caminhada.

Aos colegas de trabalho, pelo apoio, compreensão, tolerância e constante incentivo em todas as fases do curso.

**MEUS PROFUNDOS E SINCEROS AGRADECIMENTOS**

"Um grão de ouro é capaz  
de dourar uma grande  
superfície , mas não tão  
grande como um grão de  
Sabedoria"

(Henry Thoreau)

## RESUMO

*Toxoplasma gondii* tem despertado interesse pelo fato de invadir e sobreviver ampla variedade de hospedeiros e tipos celulares, além de ser importante patógeno oportunista em hospedeiros imunocomprometidos e causar sérios comprometimentos fetais. A utilização de Terapia Fotodinâmica (TFD) visando combater o processo de multiplicação/disseminação do *Toxoplasma gondii in vitro*, poderá favorecer o desenvolvimento de uma nova ferramenta no combate da enfermidade causada por este patógeno. Os experimentos foram conduzidos utilizando-se laser de baixa potência (Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio / InGaAlP, 685 nm) empregado com densidade de energia 2 J/cm<sup>2</sup> e 4,5 J/cm<sup>2</sup> e um fármaco fotossensível (cloroalumínio ftalocianina lipossomal). Foi possível verificar que em culturas de células Vero submetidas a ação do fármaco fotossensível e irradiadas, ocorreu inibição no desenvolvimento do patógeno e até sua destruição quando o fornecimento de energia na foi de 4,5 J/cm<sup>2</sup>. Em outro ensaio os parasitos foram isoladamente tratados com a ftalocianina seguido da TFD, sendo posteriormente inoculados em monocamadas de células Vero. Neste ensaio observou-se o intenso desenvolvimento destes no grupo controle; discreta inibição quando na presença da ftalocianina; a discreta invasão dos parasitos nos grupos irradiados quando das primeiras horas da inoculação e a presença de inúmeros vacúolos com conteúdo amorfo após 24 horas da inoculação; tais resultados sugerem a possibilidade do parasita ter perdido algumas de suas propriedades e a célula hospedeira ter desenvolvido seu processo de digestão lisossomal.

**Palavras chave :** *Toxoplasma gondii*, Terapia Fotodinâmica, Ftalocianina Lipossomal.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* has emerged interest for the fact to invade and to survive ample variety of hosts and cellular types, besides being important opportunist pathogen in immunocompromised hosts and to cause serious fetus commitment. The use of Photodynamic Therapy (PDT) aiming at to fight the process of multiplication and or dissemination of the *Toxoplasma gondii in vitro*, will be able to assist the development of a new tool in the combat of the disease caused for this pathogen. The experiments has been lead using itself laser of low power (Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio/InGaAlP, 685 nm) used with density of energy 2 J/cm<sup>2</sup> and 4,5 J/cm<sup>2</sup> and a photosensitive drug (chloroaluminium liposomal phthalocyanine). It was possible to verify that in Vero cells cultures submitted the action of the photosensitive drug and radiated, occurred inhibition in the development of the pathogen and until its destruction when the supply of energy in was of 4,5 J/cm<sup>2</sup>. In another assay the parasites separately had been treated with the phthalocyanine and irradiated them after, being later inoculated in monolayers of cells Vero. In this same assay, there was an intense development of these parasites on control group it was observed ; discrete inhibition when of the presence of the ftalocianina; the discrete invasion of the parasites in the irradiated groups when of the first hours of the inoculation and the presence of innumerable vacuoles with amorphous content after 24 hours of the inoculation; such results suggest the possibility of the parasite to have lost some of its properties and the cell hostess to have developed its process of lisossomal digestion.

**Key-words:** *Toxoplasma gondii*, Photodynamic Therapy, Liposomal Phthalocyanine.

# SUMÁRIO

<b>1 - INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1 <i>O Toxoplasma gondii</i></b> .....	01
<b>1.2 Terapia Fotodinâmica - TFD</b> .....	14
<b>1.3 Fotossensibilizantes</b> .....	17
<b>2 - JUSTIFICATIVA</b> .....	21
<b>3 - OBJETIVOS</b> .....	22
<b>4 - MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 – Material de cultura (MEM , PBS e tripsina).....	23
4.1.1 - Meio mínimo essencial (MEM) .....	23
4.1.2 - PBS.....	24
4.1.3 - Soro fetal bovino .....	24
4.1.4 - Tripsina .....	24
4.2 - Células VERO e Toxoplasmas.....	25
4.3 - Laser .....	26
4.4 – Ensaio efetuados.....	27
4.4.1 – Obtenção de células (substrato para infecção) e parasitos.....	27
4.4.2 – Interação célula-parasita.....	28
4.4.3 – O fotossensibilizante.....	28
4.4.4 - Marcadores Fluorescentes.....	28
4.4.4.1 – JC-1.....	28
4.4.4.2 – Rodamina – Faloidina.....	29
4.4.4.3 – DiOC <sub>6</sub> (3).....	29
4.4.4.4 – Marcação.....	29
4.4.5 – Ensaio.....	29

<b>5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6 - CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>7 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do <i>T. gondii</i> .....	03
<b>Figura 2:</b> Imagens esquemáticas de um taquizoíto e um bradizoíto de <i>T. gondii</i> . .....	05
<b>Figura 3:</b> Invasão pelo <i>Toxoplasma gondii</i> .....	06
<b>Figura 4:</b> Ciclo lítico do <i>Toxoplasma gondii</i> .....	09
<b>Figura 5:</b> Complexo apical : representação esquemática .....	10
<b>Figura 6:</b> Mecanismo de entrada de <i>T.gondii</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> em suas respectivas células alvo.....	12
<b>Figura 7:</b> Diagrama de Jablonski.....	15
<b>Figura 8:</b> Diagrama do Espectro Eletromagnético.....	16
<b>Figura 9:</b> Células Vero incubadas com protozoários e irradiadas com Laser na densidade de energia de 2 J/cm <sup>2</sup> , marcado com DiOC <sub>6</sub> (3).....	35
<b>Figura 10:</b> Células Vero inoculadas com <i>T. Gondii</i> (controle) marcação com DiOC <sub>6</sub> (3)...	35
<b>Figura 11:</b> Tratamento dos parasitos apenas com Ftalocianina lipossomal , marcado com DiOC <sub>6</sub> (3) .....	37
<b>Figura 12:</b> Terapia fotodinâmica com D.E. 2 J/cm <sup>2</sup> marcado com DiOC <sub>6</sub> (3), após 12 horas.....	37
<b>Figura 13:</b> Cultura celular em microscopia de fluorescência , marcada com Rodamina faloidina (grupo controle = somente parasitos inoculados).....	39
<b>Figura 14:</b> Grupo controle anterior marcado com DiOC <sub>6</sub> (3) .....	39
<b>Figura 15 :</b> Cultivo celular 24 horas da biomodulação com Laser , D.E 4,5 J/cm <sup>2</sup> , marcada com DiOC <sub>6</sub> (3).....	41
<b>Figura 16:</b> Cultura celular marcada com DiOC <sub>6</sub> (3) após 24 horas da TFD com 4,5 J/cm <sup>2</sup> .....	41
<b>Figura 17:</b> Cultura celular marcada com JC-1 , 12 horas após inoculação dos parasitos pré-tratados com TFD 4,5 J/cm <sup>2</sup> .....	43
<b>Figura 18:</b> Cultura celular marcada com DiOC <sub>6</sub> (3) , 24 horas após inoculação dos parasitos pré-tratados com TFD 2 J/cm <sup>2</sup> .....	43

<b>Figura 19:</b> Imagem de cultura celular marcada com JC-1, 12 horas pós inoculação dos parasitos pré-tratados com ftalocianina lipossomal .....	45
<b>Figura 20:</b> Células marcadas com JC-1, 24 horas pós inoculação dos parasitos sem qualquer pré-tratamento.....	45
<b>Figura 21 :</b> Cultura celular marcada com JC-1, 12 horas pós inoculação dos parasitos com pré-tratamento por Ftalocianina Lipossomal .....	47
<b>Figura 22 :</b> Cultura celular marcada com Rodamina-faloidina, 12 horas pós inoculação dos parasitos com pré-tratamento por Ftalocianina Lipossomal .....	47
<b>Tabela 1 :</b> Séries de ensaios efetuados.....	30

## ABREVIATURAS/SÍMBOLOS

AMP : Adenosina monofosfato.

á: Alfa.

â: Beta.

cm<sup>2</sup> : Centímetro quadrado.

ë : Comprimento de onda.

D.E. = Densidade de energia.

Ø = diâmetro.

DiOC<sub>6</sub>(3) : 3,3'- dihexiloxocarbocianina iodado.

CLSM : Escaneamento por microscopia confocal laser.

EROs : Espécies reativas de oxigênio.

S<sub>0</sub> : Estado fundamental.

S<sub>1</sub> : Estado singleto .

K<sub>f</sub> : Fluorescência.

<sup>0</sup>C : Grau centígrado.

IgG : Imunoglobulina G.

J : Joules.

LPS : Lipopolissacarídeo.

MEM : Meio mínimo essencial.

ìl : Microlitro.

nm : Nanometro.

<sup>1</sup>O<sub>2</sub> : Oxigênio singleto.

RE : Retículo endoplasmático.

SRE : Sistema retículo endotelial.

PBS : Solução tampão fosfato.

SFB : Soro fetal bovino.

TFD : Terapia fotodinâmica.

TFQA : Terapia fotoquimioterápica antimicrobiana.

Ö : Teta

T<sub>1</sub> : Tripleto baixo .



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* desperta interesse pelo fato de invadir e sobreviver em uma ampla variedade de hospedeiros e tipos celulares (JONES et al.,1972; MORISAKI et al., 1995), além de ser importante patógeno oportunista quando infecta hospedeiros imunocomprometidos (LUFT; REMINGTON, 1992).

Foi descrito em 1908 por Nicolle e Manceux trabalhando no norte da África e por Splendore trabalhando no Brasil; a designação da espécie originou-se de um roedor do norte da África (*Ctenodactylus gondi*) do qual este parasito foi isolado; o nome do gênero é derivado do grego Toxon, significando “curvado” e referindo ao formato crescente do organismo (BLACK ; BOOTHROYD, 2000).

Trata-se de um parasita protozoário do filo Apicomplexa. O estágio sexual e o ciclo de vida desse parasita coccídeo é completado no epitélio intestinal de gatos e outros felinos, que servem exclusivamente como hospedeiros definitivos (HENRY, 1999; FRASER, 1991); estágios assexuados e sexuados desenvolvem-se por endodiogenia e os oocistos originados são eliminados pelas fezes (FRASER, 1991). Tais oocistos, que contém 2 esporocistos com 4 esporozoítos cada, maturam-se durante o estágio infeccioso, no meio ambiente, de 2 a 21 dias. A ingestão de oocistos infecciosos pode levar a infecção de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados suscetíveis, onde os trofozoítas que crescem ativamente (taquizoítas) podem infectar qualquer célula nucleada. A proliferação dos taquizoítos resulta em morte celular e dano ao hospedeiro durante a infecção aguda. Uma vez que a imunidade tenha sido desenvolvida, os organismos desenvolvem cistos teciduais que podem eventualmente conter centenas ou milhares de bradizoítas de crescimento lento; a presença de tais cistos é característica de infecções crônicas. Todos os estágios do ciclo de vida ocorrem em felinos, mas somente os estágios de trofozoítas e cistos ocorrem em humanos e outros hospedeiros intermediários (HENRY, 1999).

Todos os Apicomplexa são parasitas intracelulares obrigatórios. A maioria dos parasitas deste filo crescem e replicam dentro de vacúolos parasitóforos, não fagossomais, que são compartimentos delimitados por membrana, segregando da maior parte da célula hospedeira. A proliferação destes organismos ocorre pela invasão de uma célula hospedeira sendo seguido pelo crescimento do parasito e de divisão celular até que a célula seja lisada pelos parasitas replicantes. Parasitas liberados pela lise das células hospedeiras não crescem ou sofrem divisão celular no meio extracelular, podendo rapidamente invadir outras células hospedeiras na sequência para sobreviver ( MORISSETE ; SIBLEY, 2002).

Três formas ou estágios podem iniciar a infecção: o trofozoíto (taquizoíto) ativamente proliferativo, observado em infecções disseminadas agudas estando presente no sangue, urina, lágrimas, sêmen, fezes ou líquidos corpóreos e em grande variedade de tecidos; o cistozoíto (bradizoíto) que representa a forma latente da toxoplasmose e está presente em infecções assintomáticas ou crônicas, tanto congênicas como adquiridas, encontradas em cistos principalmente no cérebro, olho, fígado e musculaturas esquelética e cardíaca. Esta forma bradizoítica pode sobreviver em tecidos por vários dias após a morte do hospedeiro, mas é prontamente destruída por cozimento a 66<sup>0</sup>C ou mais. O oocisto é a forma eliminada nas fezes de gatos susceptíveis após a ingestão de qualquer uma das três formas infectantes. Seguindo uma ingestão de cistos contendo *Toxoplasma* , os oocistos surgem nas fezes após 4 a 5 dias e continuam sendo excretados sempre em número elevado por 3 a 20 dias. Os oocistos são muito resistentes e podem sobreviver por mais de um ano sob condições favoráveis; são destruídos por calor seco a 70<sup>0</sup>C, água fervente e soluções fortes de iodeto e amônia (FRASER, 1991).

O oocisto com seus oito esporozoítos , quando ingeridos , podem repetir este ciclo sexuado no gato ou – se ingerido por um roedor ou outro mamífero, inclusive o homem – estabelece uma infecção na qual se reproduz na forma assexuada. Mais tarde, o oocisto abre-se no duodeno do animal e libera os esporozoítos que passam através da parede intestinal, circulam no corpo e invadem várias células, onde formam trofozoítas viáveis, que por sua vez multiplicam-se, rompem as células e propagam a infecção para os gânglios linfáticos e para outros órgãos (fase aguda da doença). Posteriormente, penetram em células

nervosas, em especial aquelas do cérebro e nervo óptico, multiplicam-se e eventualmente formam cistos teciduais (fase crônica da doença)(JAWETZ, 2000).

*T. gondii* infecta a maioria das espécies animais homeotérmicas, incluindo aves e o homem, tendo distribuição cosmopolita (FRASER, 1991). Infecções por este parasita unicelular acham-se largamente propagadas no ser humano e em outros animais e apresentam geralmente um decurso clinicamente assintomático. Seres humanos adultos, conforme a região e faixa etária, chegam a acusar a presença de anticorpos em mais de 50% dos casos e estão por isso protegidos contra uma nova infecção. De maior relevância é a infecção por *Toxoplasma* no período gestacional, onde o agente pode transmitir-se ao feto por via transplacentária, produzir aborto, parto prematuro ou morte intra-uterina. Este pode provocar outros danos graves, como hidrocefalia, coriorretinite, calcificação intracerebral ou retardo mental (REMINGTON; DESMONDS, 1983; HENRY, 1999; BLACK; BOOTHROYD, 2000).

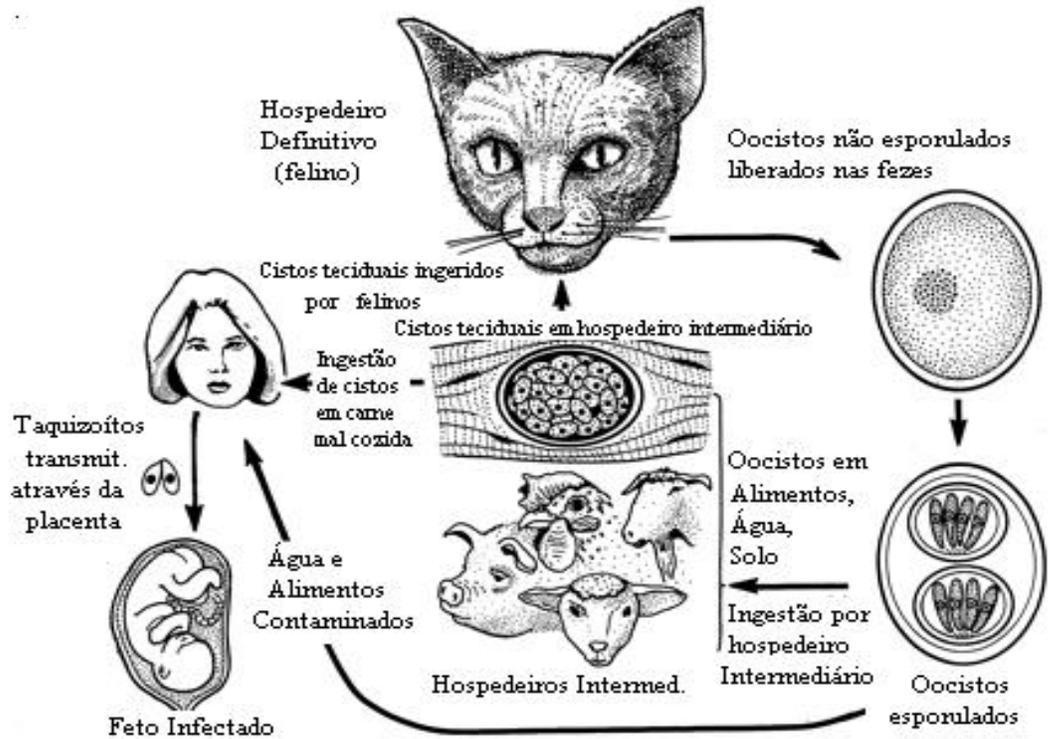


Figura 1: Ciclo de vida : representação esquemática (DUBEY et al, 1998).

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

Em indivíduos imunossuprimidos, especialmente aqueles com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), infecções com *Toxoplasma* geralmente aparecem juntamente com o envolvimento do sistema nervoso central (HENRY, 1999). Doenças de imunodeficiência, drogas imunossupressoras ou as modificações de resistência do hospedeiro podem fazer com que uma infecção crônica torne-se aguda ou fulminante (JAWETZ, 2000). Outras manifestações clínicas e patológicas possíveis incluem pneumonites, miocardite, retinite, pancreatite ou orquite (HENRY, 1999 apud LUFT, 1989 e SCHNAPP, 1992). As infecções por *Toxoplasma* podem ser difíceis de diagnosticar clinicamente e frequentemente são descobertas durante a autópsia. Essas infecções geralmente resultam da reativação de uma infecção latente, adquirida meses ou anos antes, ocasionalmente resultam de uma infecção primária (HENRY, 1999).

O taquizoíta tem muitas vezes o formato de meia-lua , com aproximadamente 2 por 6  $\mu$ m, com extremidade anterior conoidal e posterior encurvada ; o parasito constitui-se de várias organelas e corpos de inclusão, incluindo uma película (revestimento externo), anéis apicais, espiral polar, conóide, rôptrias, micronemas, microporos, mitocôndria, microtúbulos subpeliculares, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, ribossomos, retículo endoplasmático liso e rugoso, núcleo, grânulos densos, grânulos de amilopectina (que pode estar ausente), e uma membrana múltipla semelhante a um plastídeo que também foi denominada aparelho ou complexo de Golgi adjunto ou apicoplasto. Entre a extremidade anterior e o núcleo estão de 8 a 10 organelas em forma de “clava” denominadas Rôptrias, estruturas secretórias encontradas no sentido longitudinal no interior do conóide; os Micronemas são estruturas em forma de círculo que ocorrem em maior

quantidade na porção anterior do parasito. Embora taquizoítos possam se mover por deslizamento, flexionamento, ondulação e rotação, eles não tem meios visíveis de locomoção como cílios, flagelos e pseudópodos. O Conóide pode rotacionar, inclinar, estender e retrainr tanto quanto a extremidade do parasito na célula hospedeira imediatamente antes da penetração. Estes invadem a célula hospedeira por penetração ativa direto no plasmalema da célula hospedeira ou por fagocitose. Após a penetração na célula hospedeira os taquizoítos tornam-se ovóides e formam vacúolos parasitóforos; seguida a penetração forma-se uma membrana tubulovesicular desenvolvida dentro do vacúolo parasitóforo, esta é formada a partir da extremidade posterior do parasito (DUBEY et al, 1998; LECORDIER et al, 1999; MERCIER et al, 2002).

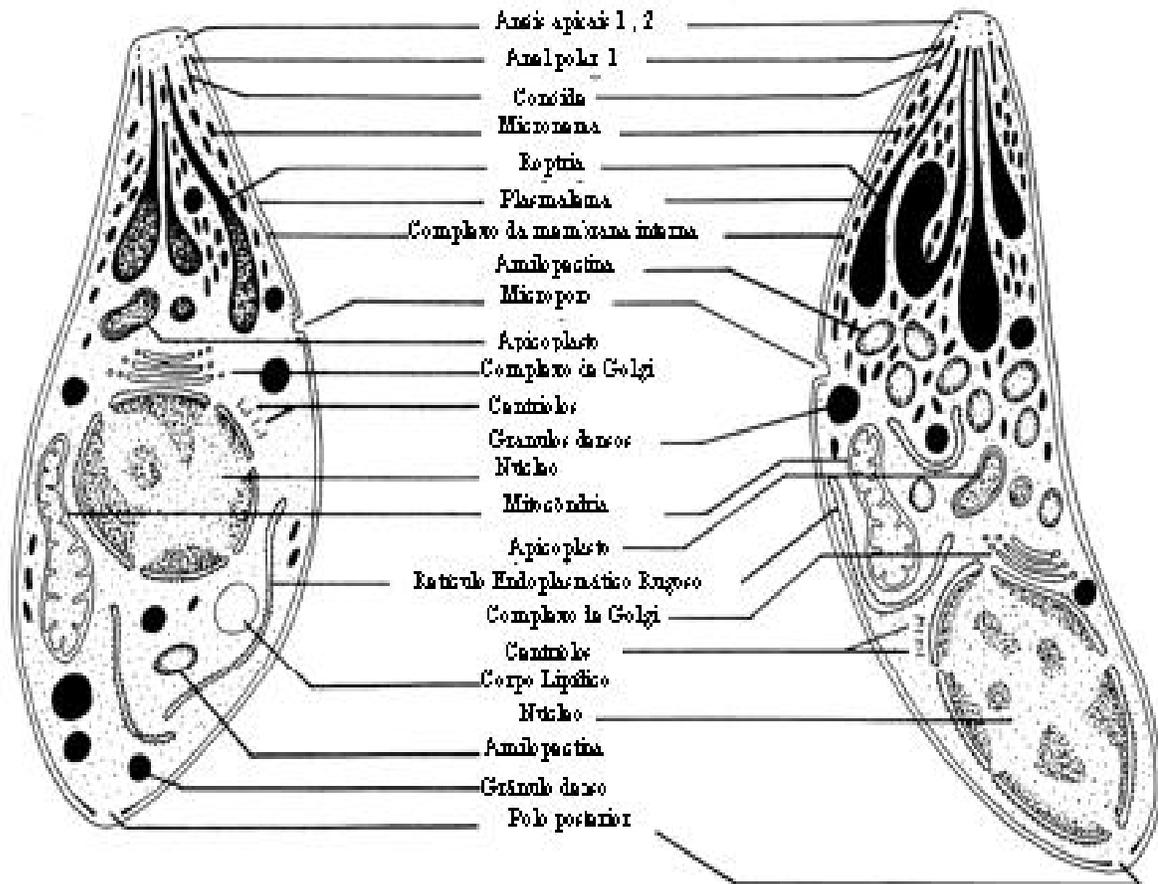


Figura 2: Figuras esquemáticas de um taquizoíto (esquerda) e um bradizoíto (direita) de *T. gondii*. Compostas de imagens em microscopia eletrônica (DUBEY et al, 1998).

Os bradizoítos multiplicam-se lentamente dentro do cisto formado; tais cistos crescem e permanecem no interior das células variando de tamanho, de pequenos, com 5µm para dois bradizoítos até cistos mais velhos com centenas de bradizoítos. Os cistos no cérebro são muitas vezes esféricos e raramente alcançam um diâmetro de 70 µm, ao passo que, no tecido muscular eles são alongados e podem alcançar 100 µm, contudo os cistos podem se desenvolver em vários tecidos como pulmões, fígado e rins, mas com mais prevalência em cérebro, olhos, musculatura esquelética e cardíaca. A parede do cisto é elástica e se desenvolve dentro do citoplasma da célula hospedeira, é composta de material da célula hospedeira e do parasito (DUBEY et al, 1998). A diferença entre taquizoítos e bradizoítos é muito pequena, onde o núcleo do primeiro é mais central e o do segundo é mais posterior (fig. 2); bradizoítos são mais delgados e menos susceptíveis a enzimas proteolíticas que os taquizoítos e o período pré-patogênico em gatos, após a ingestão de bradizoítos, é mais curto que o seguinte a ingestão com taquizoítos (DUBEY et al, 1998).

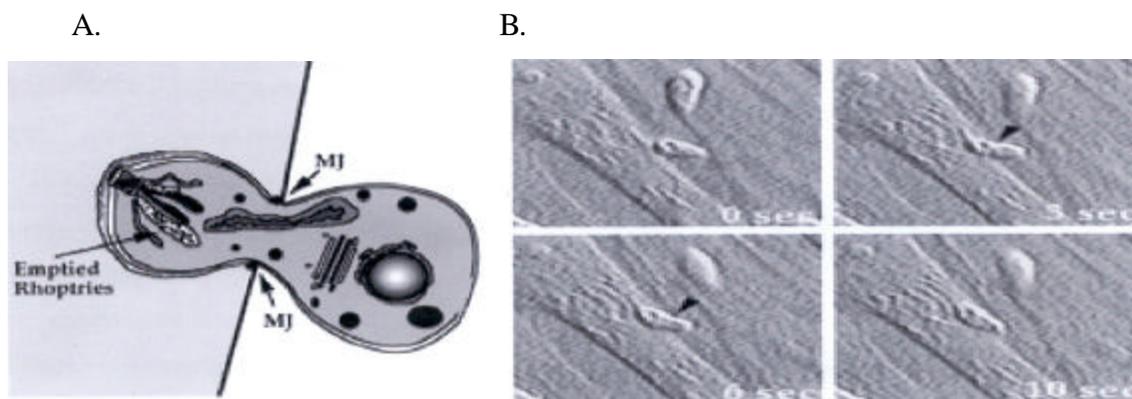


Figura 3 :Invasão pelo *Toxoplasma gondii* (A) Ilustração dos eventos críticos associados a invasão da célula hospedeira. A secreção das róptrias é representada pelas vesículas vazias e liberação do material membranoso dentro do vacúolo parasitóforo em formação. Tão bem como a compressão do parasito dentro da célula (como indicado pela constrição no corpo do parasito), verifica-se uma forma de junção móvel entre a superfície do parasita e o plasmalema hospedeiro. (B) Imagens imóveis de um vídeo mostrando o parasito invadindo um fibroblasto humano. O tempo do evento é demonstrado no canto inferior direito de cada imagem e foi virtualmente completado 10 segundos após o acoplamento. Como em um desenho, a constrição é evidenciada com o parasito passando através do citoesqueleto da célula hospedeira (indicado pelas fechas) (BLACK ; BOOTHROYD , 2000).

Trabalhos demonstram que a invasão é polarizada, conduzida pela extremidade apical do parasito; a invasão é rápida (15 a 30 segundos), com uma constrição do corpo do parasita quando passa ao interior da célula (BLACK; BOOTHROYD, 2000; MORISSETE ; SIBLEY, 2002).

O parasito após invasão reside em um compartimento especializado, o vacúolo parasitóforo que resiste a fusão com a célula hospedeira e seus compartimentos lisossomais, este vacúolo é extensamente modificado via produção de proteínas pelo parasita incluindo a proteína dos grânulos densos GRA5 que é especificamente dirigida para a delimitante membrana do vacúolo parasitóforo (MVP). GRA5 é secretada em uma forma solúvel dentro do vacúolo após o qual forma-se uma associação estável com a membrana do vacúolo. Estudos demonstraram que GRA5 foi inserida no vacúolo parasitóforo como uma proteína transmembrana com seu N-terminal estendendo domínio dentro do citoplasma e seu C-terminal no lúmen do vacúolo (LECORDIER et al, 1999).

O *T. Gondii* infecta células fagocíticas profissionais, como macrófagos, bem como células não fagocíticas. Tal capacidade de infectar células nucleadas indica que o parasita pode reconhecer uma molécula comum ou tenha muitos mecanismos para a adesão celular (SIBLEY, 1995; LECORDIER et al, 1999); a fagocitose constitui o passo inicial da degradação de células apoptóticas, partículas inertes e agentes infecciosos vivos, isto ocorre como parte crítica de uma função biológica essencial como inflamação, imunidade e desenvolvimento; o processo ocorre por meio de fagócitos profissionais (macrófagos e neutrófilos ) e em menor extensão para fagócitos não profissionais como fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (MÉRESSE et al, 1999).

Após a internalização pelos fagócitos descritos, os patógenos intracelulares controlam os compartimentos limites de sua membrana, limitando ao redor as defesas da célula hospedeira e além disso a degradação , transformando seus compartimentos dentro de um ambiente rico em nutrientes; a natureza destes nichos são muito variáveis, indicando que os patógenos controlam a biossíntese de tais membranas; o termo vacúolo havia sido largamente utilizado para determinar a membrana delimitante de vários patógenos, e sugere-se que este termo possa ser estendido para descrever os fagossomos especializados

cuja maturação é afetada por seus ocupantes patogênicos (MÉRESSE et al., 1999). Além disso, Melo et al (2000) comprovaram a presença de uma única mitocôndria, localizada em sua maior parte na região anterior do protozoário, a qual parece participar do processo de invasão, podendo estar relacionada a atividade das organelas e estruturas do complexo apical durante a invasão celular. Comparações em relação ao citoesqueleto da célula hospedeira durante a invasão por *Toxoplasma gondii* e durante a fagocitose também indica que estes dois processos são fundamentalmente diferentes (SIBLEY et al., 1994 ; MORISAKI et al., 1995).

Na fagocitose, a invasão por patógenos como *Toxoplasma* sp. é bloqueada por citocalasinas (RYNING; REMINGTON, 1978; SCHWARTZMAN; PFEFFERKRON, 1983), que desestabilizam os microfilamentos de uma grande variedade de organismos eucarióticos. No caso de bactérias intracelulares, a ação de citocalasinas ocorre diretamente sobre os microfilamentos da célula hospedeira. Este evento é completamente diferente do observado na fagocitose do *Toxoplasma* por fagócitos profissionais (ex. : Macrófagos); o parasita não reorienta e o processo é muito lento (2 a 4 minutos); a fagocitose é associada com um marcado rearranjo do citoesqueleto em células de mamíferos, rearranjo diferente ocorre na invasão (BLACK; BOOTHROYD, 2000; MORISSETTE ; SIBLEY, 2002).

Para proporcionar um teste definitivo do papel dos microfilamentos do hospedeiro *versus* parasita na invasão, foi usada uma combinação de parasitas mutantes que são resistentes ao efeito de citocalasinas, mostrando que a invasão é bloqueada por citocalasinas devido a sua ação direta no parasita (SIBLEY et al., 1994). Conseqüentemente, a penetração ativa na célula hospedeira é dirigida por um mecanismo conhecido, e a motilidade baseada em microfilamentos dentro do parasita ainda necessita ser determinada (MORISSETTE ; SIBLEY, 2002).

Como referido anteriormente, os parasitos sobrevivem dentro da célula hospedeira em um compartimento conhecido como vacúolo parasitóforo que é inicialmente formado pela invaginação da membrana plasmática da célula, este compartimento é modificado pela secreção de proteínas do parasito oriundos de suas próprias e grânulos densos ao tempo da invasão, tal vacúolo parasitóforo resiste à fusão com outros compartimentos celulares,

incluindo lisossomos e endossomos tanto precoces como tardios. Várias proteínas abundantes de membrana plasmática da célula hospedeira estão presentes em recentemente formados vacúolos parasitóforos, estas são removidas e permanecem ausentes em vacúolos maduros. A habilidade para excluir compartimentos da célula hospedeira durante a formação do vacúolo parasitóforo ou para modificar rapidamente a membrana pode prover um mecanismo para subsequente esquívamento do processamento endocítico (PACHECO-SOARES; SOUZA, 1996).

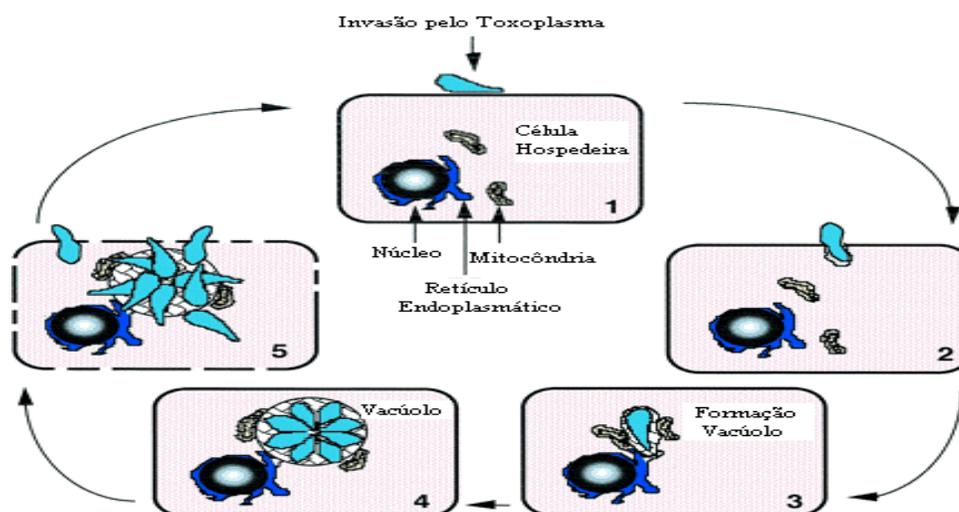


Figura 4: Ciclo lítico do *Toxoplasma gondii*. Este diagrama descreve os cinco eventos que são responsáveis pela fase aguda da toxoplasmose. O primeiro evento é o acolamento do parasito com a célula hospedeira (passo 1). Este passo pode envolver duas formas de contato: uma interação transiente inicial de tal modo que sinaliza a secreção dos micronemas seguidos por uma firme aderência que utiliza proteínas transmembranas dos micronemas (e.g., MIC2). Como o parasita desliza através da superfície, este é reorientado para formar contato com a superfície através da sua extremidade apical e para iniciar a invasão (passo 2). Durante a invasão, o vacúolo parasitóforo é formado pela secreção das rôprias e, depois, dos grânulos densos. Após o parasita entrar no hospedeiro, este para de mover-se e o vacúolo fecha-se na sua porção final. O vacúolo recém formado imediatamente recruta mitocôndrias e porções do retículo endoplasmático do hospedeiro (passo 3). Esta associação fechada entre organelas hospedeiras e o vacúolo parasitóforo é do tipo que desempenha um papel na aquisição de nutrientes essenciais (possivelmente lipídeos) para o crescimento intracelular. Os parasitas passam por vários estágios de replicação (passo 4) até este receber um sinal de qualquer dos próprios parasitas ou da célula hospedeira, resultando na liberação (passo 5). A liberação da célula hospedeira é um processo tipicamente destrutivo que lisa a célula hospedeira e libera parasitas móveis. Estes parasitas rapidamente invadem células vizinhas para completar o ciclo (BLACK ; BOOTHROYD, 2000).

O citoesqueleto do *T. gondii* é uma complexa orquestração de microtúbulos e outras estruturas macromoleculares que tem, aparentemente, envolvimento para oferecer uma integridade estrutural, para dirigir secreção polarizada, capacitar o parasita para escorregar através da superfície e invadir a célula hospedeira. Na extremidade anterior da célula existem dois anéis pré-conoidais ao redor de uma típica estrutura tubular denominada conóide, este consiste de 14 elementos de composição desconhecida em espiral anti-horária igualmente distinta do pólo posterior. Estes tubos são ligados fortemente e são embebidos em uma densa matriz que é intimamente associada com as apicalmente associadas Róptrias e Micronemas; tem sido postulado que a função dos microtúbulos é como uma estrutura dirigindo estas organelas para passar através do conóide e secretar seus conteúdos no ápice (BLACK ; BOOTHROYD , 2000).

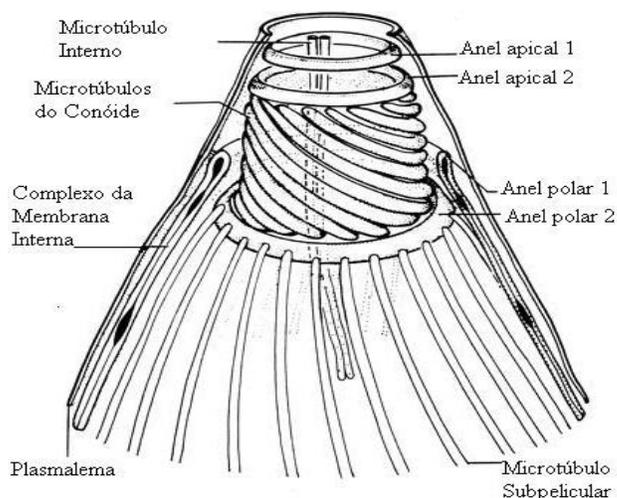


Figura 5: Complexo apical : representação esquemática (DUBEY et al, 1998)

Na penetração ativa, o taquizoíta é envolvido completamente pela membrana da célula hospedeira e o vacúolo formado é rapidamente rodeado por mitocôndrias e retículo endoplasmático da célula hospedeira (SIBLEY et al., 1986 ; MELO et al., 1992 ). A membrana da célula hospedeira é modificada durante a invasão; por exemplo, em macrófagos essa membrana perde seus sítios  $Mg+ATPase$  e 5'-nucleotidase, mas não seus sítios aniônicos (CARVALHO ; SOUZA, 1989; 1990). Tal modificação do vacúolo deve prevenir os eventos iniciais no processamento do compartimento endocítico que poderia

comprometer a sobrevivência do parasito (SIBLEY et al., 1985 ). A membrana do vacúolo é também modificada por secreção de proteínas de suas organelas secretoras . O parasita, além disso, elabora uma rede de túbulos membranosos que se conectam diretamente com a membrana do vacúolo parasitóforo (SIBLEY et al., 1986). Purificação e análise dessa rede mostra que ela contém uma variedade de proteínas que são secretadas pelo parasita (SIBLEY ; KRAHENBUHL, 1989). A utilização de sondas fluorescentes para a marcação de proteínas de membrana, sialoglicoproteínas e lipídios, permitiram a observação da existência de um processo dinâmico de componentes associados das membranas do parasita e da célula hospedeira durante o processo de interação (PACHECO-SOARES; SOUZA, 1998; 2000). Estudos utilizando digitonina, que liga-se ao colesterol formando complexos digitonina-colesterol, facilmente visualizados em réplicas de criofratura, não demonstrou a presença de colesterol na membrana do vacúolo parasitóforo, embora intensa marcação da membrana da célula hospedeira tenha sido observada (PACHECO-SOARES ; SOUZA, 2000). A marcação da rede de túbulos revelou a presença de colesterol na rede membranosa intravacuolar, que é formada pela liberação de substâncias armazenadas nas róprias e grânulos densos encontrados nos taquizoítos. A ausência de colesterol na membrana do vacúolo parasitóforo é interessante pois os esteróis são fundamentais no controle da fluidez das membranas biológicas, e no caso de *T.gondii*, influencia no transporte de substâncias através do vacúolo parasitóforo (COPPENS ; JOINER, 2003).

No mecanismo de entrada, os eventos influenciando o destino de vacúolos, o tipo de célula infectada e a quantificação da rota são extremamente importantes; mecanismos de internalização são diferentes em fagócitos profissionais e não profissionais e podem afetar a patogênese modulando o trânsito intracelular de parasitos, adaptação ao hospedeiro e respostas imunes inatas. Partículas inertes como as dos microrganismos mortos, células apoptóticas e gotas de látex são capturados por fagócitos por meio de receptores Fc para partículas opsonizadas Ig, receptores complemento CR1, CR3 e CR4 para partículas complemento-opsonizadas, e também os receptores manose , integrinas e scavenger ; vários patógenos podem utilizar estes receptores como um meio para invadir células fagocíticas hospedeiras, por exemplo, adicionalmente ao receptor manose, CR1 e CR3 são importantes no encaixe e quantificação para *Micobacterium* por fagócitos profissionais e são também

envolvidas na quantificação de *Legionella pneumophila* tanto morta pelo calor como viva (MÉRESSE et al , 1999).

No que envolve a formação de vacúolos e fagossomos, os fagossomos são compartimentos resultantes da internalização de partículas inertes por fagócitos profissionais; o fagossomo nascente interage com compartimentos endocíticos sucessivos, induzindo para sua maturação em um fagolisossomo no qual partículas são degradadas; este processo é controlado pela célula hospedeira. Em contraste, patógenos intracelulares têm desenvolvido estratégias com as quais controlam o destino de suas membranas limítrofes dos vacúolos. Vacúolos nascentes são formados como resultado da internalização dos patógenos, os quais podem ocorrer por uma variedade de mecanismos, como um sistema de secreção para translocar proteínas efetoras dentro da célula hospedeira (MÉRESSE et al., 1999).

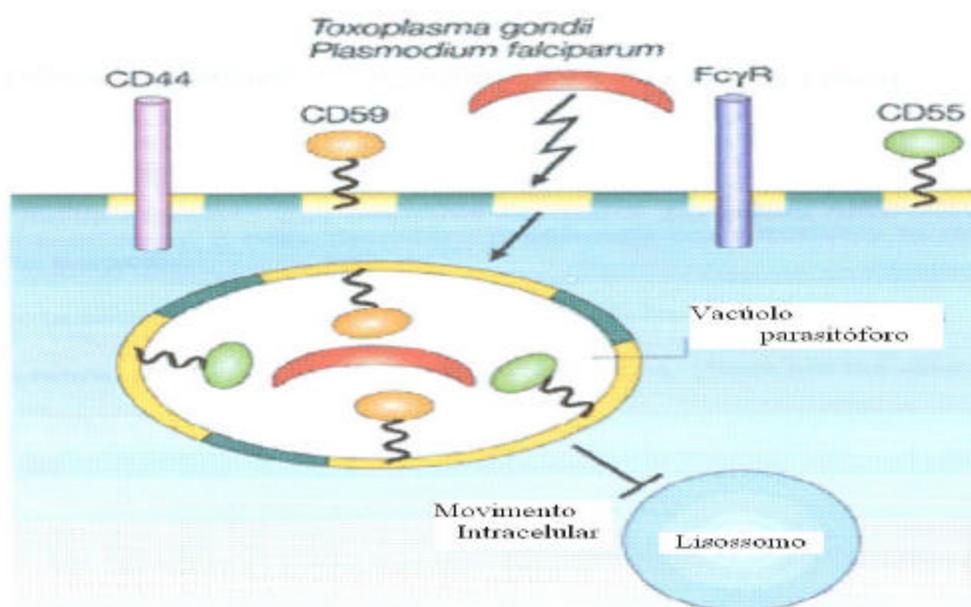


Figura 6: Como o *T.gondii* e *Plasmodium falciparum* entram em suas respectivas células alvo usando um mecanismo de penetração ativo que resulta na formação dos vacúolos parasitóforos. Para iludir os compartimentos degradativos, estes parasitos incorporam ativamente específicas estruturas associadas aos componentes das células hospedeiras dentro do vacúolo. Os mecanismos que subordinam a inclusão ou exclusão destas específicas estruturas associadas a proteínas dentro do vacúolo são desconhecidas (MAÑES et al, 2003).

O uso do corante CMXRos demonstrou, com o uso de escaneamento por microscopia confocal laser (CLSM), que a mitocôndria do parasito, tanto na forma extracelular quanto intravacuolar foram intensamente marcados, demonstrando estar funcionais; adicionalmente a atividade da Citocromo c oxidase pode ser citoquimicamente detectada na membrana interna de taquizoítos intravasculares. A reconstrução tridimensional por secções ópticas seriadas de taquizoítos marcados com CMXRos e observados por CLSM e as secções seriadas examinadas por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o protozoário apresenta somente uma mitocôndria ramificada (MELO et al., 2000).

Macrófagos (M $\phi$ ) infectados com taquizoítos de *Toxoplasmas* oportunistas são bloqueados na produção de citocinas pró inflamatórias tipo Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina 12 (IL-12) em resposta ao estímulo pelo Lipopolissacaride (LPS) *in vitro* e isto está associado com a inibição parasito-induzida da translocação do fator de necrose NF $\alpha$ B; o LPS foi um estímulo surpreendentemente mais potente para a produção de citocinas inflamatórias para macrófagos (M $\phi$ ) do que foi para bacillus Calmette-Guérin (BCG) e enterotoxina estafilocócica A (SEA). Experimentos sugerem que a invasão ativa e sobrevivência do parasita dentro do vacúolo parasitóforo são requeridos para induzir e manter as citocinas macrófago-específicas não responsivas ao LPS; a invasão ativa requer habilidade do parasita para mediar esta supressão. Nenhum antígeno solúvel do taquizoíto nem produtos secretados foram supressivos, assim como inativação pelo calor; taquizoítos revestidos com anticorpos entram mais eficientemente na célula através de receptores de superfície, inibindo as respostas ao LPS. É possível que a atividade supressiva do parasito represente uma estratégia de evasão imune ou meios pelo qual o mesmo evita a superindução de citocinas pró-inflamatórias. A identificação molecular do fator inibitório do parasito é requerido para entender este papel na interação hospedeiro-parasita e pode conduzir ao desenvolvimento de agentes anti-inflamatórios de amplo emprego clínico (BUTCHER ; DENKERS , 2002).

Uma vez consideradas contidas, doenças infecciosas de origem bacteriana estão retornando atualmente; a falta de terapias inovadoras e o surgimento de patógenos

resistentes ao arsenal medicamentoso estão transformando-se em um sério problema. O melhor entendimento da interação patógeno-hospedeiro a nível celular e molecular torna-se necessário para definir novos alvos nos esforços contra os microrganismos (MÉRESSE et al., 1999).

Através da evolução, organismos hospedeiros têm desenvolvido atividades de imunovigilância para se proteger de potenciais patógenos. No que diz respeito às células, os eventos sinalizantes que regulam estas respostas defensivas ocorrem na estrutura da membrana, microdomínios dinâmicos enriquecidos em colesterol e glicoesfingolipídeos, que facilitam algumas interações proteína – proteína e lipídeo – proteína para a superfície celular. Patógenos tem desenvolvido algumas estratégias para assegurar a sua própria sobrevivência e para iludir o sistema imune do hospedeiro, em alguns casos seqüestrando estruturas. Contudo, a compreensão dos meios pelos quais os patógenos aproveitam estruturas poderá conduzir para novas estratégias terapêuticas visando prevenir ou aliviar certas doenças infecciosas como as que são causadas por HIV-1 ou vírus Ebola (MAÑES et al., 2003).

## **1.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)**

Os comprimentos de onda da energia laser variam seus respectivos espectros, que vão desde o ultravioleta, ondas mais curtas, até a região do infravermelho longo, ondas mais longas. O laser visível apresenta comprimentos de ondas que ocupam pequena parte deste espectro eletromagnético. O comprimento de onda é a distância entre duas sucessivas ondas ou picos do espectro eletromagnético, sua unidade de medida é o nanômetro, e determina a cor; a amplitude de uma onda é a altura do topo da crista, na vertical, e indica a força da onda; a frequência é a medida do número de cristas ou picos que passam por um determinado ponto durante o período de um segundo e é expressada em Hertz (Hz) (SILVA, 2003 apud GENOVESE, 2000; MELLO, 2001).

O mecanismo utilizado de conversão da energia dos fótons em medicina com o emprego do laser é o aquecimento associado com a destruição dos tecidos (corte, coagulação, ablação). Para baixas intensidades de luz, busca-se a conversão fotoquímica da energia absorvida por um fotoceptor prevalente. Em medicina a absorção da luz por uma

molécula fotoceptora não especializada (isto é, moléculas que podem absorver luz para determinados comprimentos de onda, mas que não são completas para especializada recepção luminosa em órgãos) é usado mais extensivamente. A molécula absorvente pode transferir a energia para outras moléculas, e esta molécula ativada pode causar reações químicas nos tecidos ao redor (KARU, 2000).

A reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por uma molécula fotorreceptora funcional (fotoceptor). Para distinguir moléculas fotorreceptoras como as rodopsinas, fitocromos, bacteriorodopsinas e clorofilas de cromóforos não especializados (moléculas capazes de absorver o comprimento de onda utilizado para a irradiação resultando em uma resposta fotobiológica) utiliza-se o termo fotoceptor. Os fotoceptores dão início a uma reação metabólica na célula que não é conectada com uma resposta luminosa. Após absorver a luz no comprimento de onda usado para a irradiação, estas moléculas assumem um estado eletronicamente excitado do qual os processos moleculares primários podem conduzir a um efeito biológico mensurável em determinadas circunstâncias. Os efeitos sobre os fotoceptores podem ocorrer sob ação da iluminação (reações primárias) ou seguintes ao final do estímulo luminoso (reações secundárias) (KARU,2000).

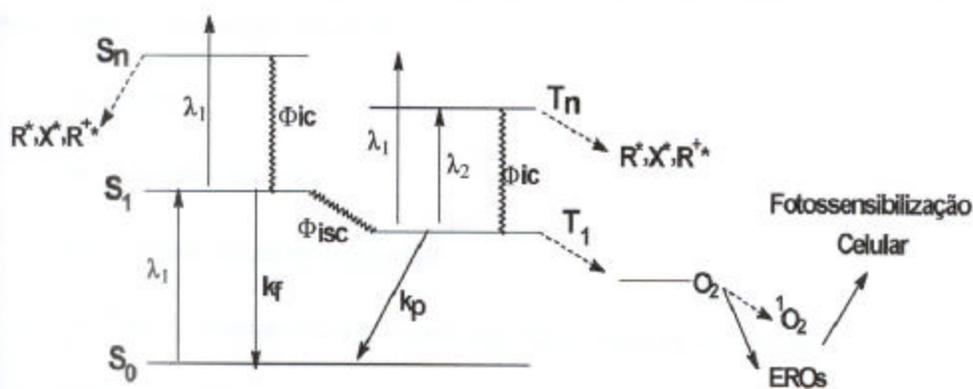


Figura 7 : Diagrama de Jablonski: a reação fotobiológica leva a molécula fotoceptora de seu estado fundamental ( $S_0$ ) ao primeiro estado pós excitação, o estado singleto ( $S_1$ ), podendo fluorescer ( $k_f$ ) e retornar ao estado fundamental, ou realizar um cruzamento intersistema ( $\Phi_{isc}$ ) para o estado tripleto mais baixo ( $T_1$ ). A reação desta molécula com o oxigênio molecular inicia o processo de produção dos EROs ( $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $^{\cdot}OH$ ,  $H_2O_2$ ).

A Citocromo c oxidase é discutida como um possível fotoceptor quando células são irradiadas com luz monocromática vermelha ou infra-vermelho próximo. Quatro mecanismos de ação primários descrevem variações nas propriedades de oxirredução dos componentes da cadeia respiratória seguindo a fotoexcitação de seus estados eletrônicos envolvendo a geração de oxigênio singleto, aquecimento transiente localizado de cromóforos absorventes e o aumento na produção de ânions superóxidos com subsequente aumento na concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Uma cascata de reações conectadas com a alteração nos parâmetros de homeostase celular, pH intracelular, cálcio intracelular, adenosina monofosfato (AMP) cíclico, energia (E), concentração de ATP [ATP] e alguns outros, são considerados como uma transdução do fotossinal e cadeia de amplificação na célula (mecanismo secundário) (KARU, 1999).

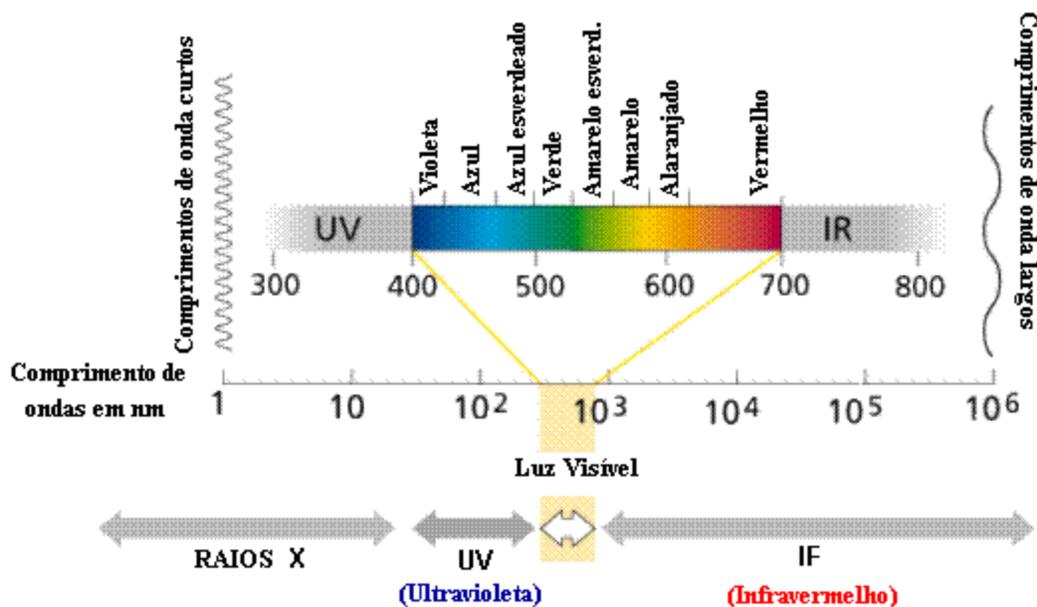


Figura 8 : diagrama mostrando o Espectro Eletromagnético. Disponível em : <http://fai.unne.edu.ar/biologia/images/espectro.gif> . Acesso em : 06 outubro 2004.

A TFD tem sido historicamente utilizada no tratamento de tumores cancerígenos, entretanto também tem recentemente sido utilizada para eliminar bactérias através do uso de fotossensibilizadores alvo. A porfirina e a clorina e6 mostraram “*in vitro*” um espectro

limitado contra bactérias, enquanto que clorina e6 conjugada a pentalisina mostrou atividade “*in vitro*” contra todos os microrganismos orais testados, incluindo, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteróides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum polymorphum* (ROVALDI et al., 2000). A ação da TFD e quimioterapia antimicrobiana (TFQA) na descontaminação de produtos sanguíneos, particularmente inativação viral, têm sido muito utilizadas, visando a inativação do envelope lipídico dos vírus e apoptose dose-luz dependente (MARBLE, 1996), o mesmo ocorrendo com o *Tripanossoma cruzi* (CLARK ; BOYLE , 1996). Contudo protocolos mais clínicos tem sido desenvolvidos no tratamento de infecções virais.

As variações físicas e/ou químicas induzidas pela luz em moléculas fotoceptoras são seguidas por uma cascata de reações bioquímicas na célula que não necessitam ativação e ocorrem no escuro (cadeia de transdução e amplificação do fotossinal). Estas reações são conectadas com variações nos parâmetros de homeostase celular. O passo crucial nestas condições é entretanto, uma alteração no estado de oxiredução celular, onde, uma variação na direção da oxidação é ligada a estimulação da vitalidade celular e a variação em direção a redução é ligada a inibição; experimentos demonstraram que células com pH intracelular menor que o normal, no qual o estado de oxiredução foi trocado na direção da redução, foram mais sensíveis para a estimulação da luz quando comparado com células nas quais os respectivos parâmetros foram ótimos ou próximos do ótimo. O proposto mecanismo de regulação da oxiredução pode oferecer uma explanação fundamental para alguns efeitos clínicos da radiação, por exemplo, os resultados positivos obtidos no tratamento de ferimentos, inflamação crônica, isquemia, todos caracterizados por acidose e hipóxia (KARU, 2000).

### **1.3 Fotossensibilizantes**

As duas famílias de fármacos fotossensíveis mais extensivamente estudadas em relação a TFD são a das Ftalocianinas e a das Porfirinas. Entre os membros destas duas famílias há diferenças tais como a tendência generalizada dos corantes lipofílicos, como 3THPP (tetrahidroxifenilporfirina), fotofrin II (P II), TPPS<sub>1</sub> (tetrafenilporfirina sulfonada) e

AIPcS<sub>1</sub> (ftalocianina cloroalumínio sulfonada), localizarem-se nas membranas celulares como a nuclear, plasmática e do retículo endoplasmático, enquanto os corantes mais hidrofílicos, tais como TTPS<sub>20</sub>, TTPS<sub>2a</sub>, TTPS<sub>4</sub>, AIPcS<sub>2a</sub>, AIPcS<sub>4</sub>, são localizados extensivamente nos lisossomos (FERREIRA, 2000).

Várias organelas celulares podem ser postuladas como alvo para a TFD com diferentes fotossensibilizantes, dentre estes a membrana plasmática, núcleo, mitocôndria, complexo de Golgi, lisossomos e citoesqueleto celular são mais susceptíveis ao processo oxidativo foto-induzido (FERREIRA et al., 2004).

A síntese e propriedades de um número de polissubstitutos da Zinco Ftalocianina (Zn Pc 4), são descritas como adequadas para a TFD. Propriedades de absorção espectroscópica no visível e eficiência na sensibilização de oxigênio singleto para a morte celular também são descritas. Em experimentos, as amostras são fototóxicas *in vitro* e mostram atividade antitumoral *in vivo* (GRIFFITHS et al., 1997).

Ftalocianinas constituem uma grande classe de compostos com alto coeficiente de excitação na região espectral do vermelho (630 a 750 nm), e têm sido conhecidas por apresentar excelentes propriedades de localização em tumores e alta eficiência fotossensibilizante (FERREIRA et al., 2004).

Os mecanismos pelo qual as Ftalocianinas exercem seus efeitos ainda não são conhecidos; o oxigênio é requerido e a toxicidade é produzida por espécies reativas de oxigênio e o oxigênio singleto, onde, por exemplo, a mitocôndria do parasita *Trypanosoma cruzi* é o maior alvo para a fotoinativação. Contudo, outro fotossensibilizante, a Merocianina 540 (Mc 540) parece ligar-se preferencialmente na membrana do vacúolo parasitífero do *Plasmodium falciparum* (CLARK ; BOYLE, 1996).

A Zinco Ftalocianina pertence a uma segunda geração de fotossensibilizantes para a TFD do câncer. Por ser altamente insolúvel na maioria dos solventes comuns, em sua aplicação clínica o material precisa ser incorporado à lipossomos. Como procedimento simples e alternativo pode-se formar um complexo não covalente ligando a Ftalocianina com a Albumina Bovina (ZnPc – BSA). Análises demonstraram que a ZnPc prontamente redistribuiu-se através da lipoproteína de alta densidade (HDL) e também demonstraram ausência de toxicidade hepática (LARROQUE et al, 1996).

Estudos realizados na fotossensibilização de fibroblastos 4R transformados, utilizando uma segunda geração de Zinco Ftalocianina, mostraram necrose associada ao dano precoce da integridade da membrana plasmática e completa depleção de ATP intracelular, representando o modo prevalente de morte para células 4R incubadas no escuro por 2 horas com a Zn II Ftalocianina e irradiadas, reduzindo sua viabilidade por 99,9%, em contraste com a irradiação ocorrendo 24 horas após, onde observou-se parcial inibição da atividade da membrana plasmática e a morte celular por apoptose. A ZnPc foi principalmente localizada no aparelho de Golgi após 2 a 24 horas de incubação e em todos os casos este compartimento representa o alvo primário para o fotodano (FABRIS et al., 2001).

A TFD com o fotossensibilizante Ftalocianina Pc4 induz rápida apoptose em células de linfomas de ratos, iniciando com a liberação de Citocromo c da mitocôndria. Tem sido proposto que a permeabilidade da membrana mitocondrial, resultante da dissipação do potencial de membrana desta, seja essencial para o escape de Citocromo c da mitocôndria dentro do citosol tão bem como para a morte celular apoptótica seguindo a TFD (CHIU, 2001).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são dependentes do íon metal que compõe sua estrutura molecular. Dentre estas metaloftalocianinas, complexos zinco (Zn II) e alumínio (Al III), formando zincoftalocianina (ZnPC) e cloroalumínioftalocianina (ALPHCl), apresentam as mais favoráveis propriedades fotofísicas para aplicação em TFD. Como exemplo de tais propriedades tem-se um relativo aumento da atividade dos estados excitados singletos e tripletos que são produzidos em alto rendimento quântico. Contudo, a ZnPC e ALPHCl são insolúveis em água ou solventes biologicamente compatíveis; assim, elas necessitam ser administradas *in vivo* por meio de sistemas de liberação. O transporte de porfirinas na corrente sanguínea via lipossomos tem levado a uma maior e mais seletiva acumulação das drogas em tecidos neoplásicos, um fato que é requerimento básico para a TFD (NUNES et al, 2004).

Lipossomos contém uma membrana lipídica com um espaço interno aquoso usado para aprisionar drogas quimioterapêuticas. Alternativamente, algumas drogas podem ser carregadas dentro da bicamada lipídica, favorecendo modificações da superfície objetivando

ligações covalentes como os fragmentos Fab' e com isso resultar em lipossomas que são especificamente endocitados por células cancerosas expressando um receptor para este ligante. Os lipossomas podem ser ainda com ou sem revestimento polimérico, que proporcionam estabilização; seu uso como carreador implica em significativa redução do volume de distribuição e a concentração da droga em tumores é aumentada. Sob condições ótimas a droga é carregada dentro do espaço lipossomal enquanto na circulação, mas escoam em suficiente razão que pode ser avaliável ao chegar no tumor. O lipossoma protege a droga do metabolismo e inativação no plasma, é próprio para limitações de tamanho no transporte de grandes moléculas ou carreadores através do endotélio sadio, além disso a droga é acumulada em pequena extensão em tecidos sadios (DRUMMOND et al., 1999).

Tais parâmetros dos lipossomas dependem dos seus atributos físico-químicos como o tamanho, a carga de superfície, envoltório da membrana lipídica, estabilização, bem como a dose administrada e via de administração. Lipossomas são retirados da circulação por macrófagos do Sistema Retículo Endotelial, em particular os do fígado e do baço. A opsonização por proteínas do soro como as do fragmento do complemento C3b,  $\beta_2$ -glicoproteína I e a porção Fc das IgG executam um papel crítico no reconhecimento e subsequente retirada pelos macrófagos. O tamanho relativamente grande dos carreadores lipossomais (45 – 150 nm) previne que estes atravessem poros de 2 nm nos vasos sanguíneos na maioria dos tecidos sadios ou igualmente os poros de 6 nm em vênulas pós-capilares (DRUMMOND et al., 1999).

Visto que a incorporação de fotossensibilizantes no interior de lipossomas resulta em um aumento da concentração da droga em locais específicos, informações relativas a conduta destas drogas neste meio são importantes para a compreensão da sua ação no meio biológico (NUNES et al, 2004).

Diferenças na permeabilidade vascular tem sido exploradas em dois diferentes caminhos para aumentar o acúmulo de lipossomas em tecidos doentes; o uso de hipertermia local causa aumento de permeabilidade da microvascularização do tecido doente e também aumenta a razão de liberação da droga de lipossomas termossensíveis especialmente desenvolvidos (DRUMMOND et al., 1999).

## 2 . JUSTIFICATIVA

A avaliação da ação da TFD sobre o protozoário poderá fornecer o conhecimento de como o *T. gondii* invade e sobrevive no interior da célula hospedeira, isto é, que estruturas da célula hospedeira são afetadas pelo tratamento e se as mesmas estão comprometidas na formação do vacúolo parasitóforo. O conhecimento das bases celulares da penetração e sobrevivência intracelular poderá contribuir para melhor compreensão das variações nos padrões da interação patógeno-célula hospedeira submetidos a terapia fotodinâmica (TFD) e o aperfeiçoamento de uma ferramenta que poderá vir a beneficiar o combate à toxoplasmose .

### 3 . OBJETIVOS

As metas centrais do projeto, como forma para atingir o desempenho idealizado obedecerá as atividades listadas abaixo.

1 – Analisar a ação do laser sobre o mecanismo de entrada, multiplicação e viabilidade do parasita durante a interação com a célula hospedeira avaliando os parâmetros dos seguintes ensaios:

- 1.1 – Somente laser nas células hospedeiras após a interação destas com os parasitos;
- 1.2 – Somente o fotossensibilizante nas células hospedeiras após a interação destas com os parasitos ;
- 1.3 – Emprego da TFD nas células hospedeiras após a interação destas com os parasitos;
- 1.4 – Manutenção de dois grupos controle onde um contenha apenas a monocamada de células hospedeiras e outro composto das referidas células parasitadas com o *T. Gondii* .

2 – Efetuar os mesmos ensaios após a realização de pré-tratamento dos parasitas com o fármaco fotossensível antes de serem inoculados nas monocamadas de células com os seguintes grupos:

- 2.1 – Somente laser nos parasitos antes de sua interação com o substrato celular;
- 2.2 – Tratamento dos parasitos com o fotossensibilizante antes de sua interação com as células hospedeiras;
- 2.3 – Emprego da TFD nos parasitos antes de sua interação com o substrato de células hospedeiras;
- 2.4 – Manutenção dos mesmos grupos controle descritos no item 1.4 .

3 – A fim de caracterizar os possíveis danos ocasionados nestes tratamentos foram efetuadas marcações fluorescentes para retículo endoplasmático, citoesqueleto e mitocôndrias.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do projeto confeccionou-se inicialmente o cultivo celular em garrafas de cultura apropriadas de 25 cm<sup>2</sup>, de polipropileno estéril e no interior de uma câmara de fluxo laminar. Após a formação de monocamada de células de linhagem Vero, efetuou-se sua tripsinização e passagem para outras garrafas, visando obter mais células em monocamada e permitir a inoculação em parte delas com os parasitos que serão utilizados em outras fases do projeto.

### 4.1 – Material de cultura (MEM, PBS e tripsina).

#### 4.1.1 - Meio mínimo essencial (MEM) GIBCO:

- Na composição deste meio de cultura líquido, são encontrados todos os aminoácidos fundamentais, D-glicose, indicador vermelho de fenol, vitaminas e vários outros sais orgânicos. Após sua preparação em 1000 ml de água ultra-pura, são suplementados com 10% de soro fetal bovino, testado em estufa de cultura para avaliar sua inocuidade (24 horas) e posteriormente armazenado para uso sob refrigeração. Este foi utilizado para a manutenção de todas as culturas (garrafas, placas e placas com 24 poços), sendo trocado a cada dois dias ou quando o indicador (vermelho de fenol) do meio tornasse necessária tal conduta.

#### Preparo do meio mínimo essencial (MEM):

- Lavar o medidor de pH em água ultra pura e efetuar calibração utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0 respectivamente.
- Em uma proveta, verter 1000 ml de água ultra-pura e em seguida passá-la para um Becker de igual volume sobre a mesa de um agitador acondicionando no interior deste, um bastão de agitação tipo “peixinho”.
- Pesar e adicionar a solução, 2,2 gramas de bicarbonato e 1 flaconete com o meio MEM em pó; ligar o agitador cuidadosamente, visando girar o bastão em seu interior com o intuito de misturar homogeneamente toda a solução.
- Durante o processo, aferir a solução obtida no medidor de pH devendo este ficar em torno de 7,2, corrigindo por gotejamento de NaOH ou HCl.

- Adicionar antibiótico , na proporção de 1%, . No desenvolvimento dos trabalhos utilizamos penicilina + estreptomicina + antimicótico (CULTILAB<sup>®</sup>) na proporção de 1% do MEM .
- Levar o Becker para a cabine de fluxo laminar e efetuar a filtragem em filtro estéril com membrana de papel filtro ; o filtrado é envazado em fiasco estéril com tampa de rosca dentro da referida cabine . Todos os frascos utilizados no processo deverão estar devidamente tampados e sofrer desinfecção por borrifação com álcool 70 GL , assim como o manipulador deverá estar criteriosamente paramentado com luvas , máscara avental , propé e touca .
- Após a manipulação , levar o frasco com o MEM já preparado para a estufa a 37<sup>0</sup> Celsius visando avaliar a qualidade de sua esterilização após 24 horas, podendo ser conservada sob refrigeração após este período de observação .

#### 4.1.2 - PBS :

- Solução A: 2,76 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O para 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
  - Solução B: 5,36 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ou 7,17 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12 H<sub>2</sub>O ou 2,84g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> para 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada.
- 33 ml de solução A + 67 ml de solução B = pH 7,1.

#### 4.1.3 - Soro fetal bovino (Gibco):

- Obtido em frascos congelados de 500 ml pronto para a manipulação.

#### 4.1.4 - Tripsina (Gibco):

- 0,1 % de tripsina; 0,05% de EDTA (SIGMA) para 100 ml de água destilada.

#### Preparo da tripsina :

- Utiliza-se como meio diluidor o PBS , este é vertido dentro de um Becker sobre o agitador e com o bastão misturador “peixinho” no seu interior .
- Para cada 100 ml de PBS , dissolver 0,1 grama de tripsina em pó em balança analítica .
- Adicionar 0,05 gramas de EDTA e acionar o agitador pelo tempo necessário até obter-se uma solução totalmente isenta de suspensão .
- Efetuar a filtragem no interior de cabine de fluxo laminar como para a confecção do MEM , devendo este ser acondicionado em tubos estéreis com

tampa de rosca e , após ter permanecido um período na estufa para verificar a possibilidade de contaminação, levam-se os tubos ao freezer.

- Para o uso, descongela-se o tubo com a tripsina, que é levado à cabine de fluxo laminar sob condições assépticas; após a retirada do meio MEM dos cultivos celulares e lavagem com PBS, alíquota-se 2 ml de tripsina sobre a monocamada celular , deixando o cultivo em repouso por 3 minutos. Sem agitar o material retira-se a tripsina e lava-se com meio MEM para soltar as células Vero.

#### 4.2 - Células Vero e Toxoplasma :

As Células Vero (linhagem celular ATCC nº CCL-81), assim como os protozoários *Toxoplasma gondii* (taquizoítos) cepa virulenta RH, ambos em ampolas criopreservadas em nitrogênio líquido, foram cedidos pelo prof. Renato Augusto da Mata, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual Norte Fluminense-RJ.

As células Vero foram inicialmente cultivadas nas garrafas de 25 cm<sup>2</sup>(para manter uma matriz produtora de células específicas para esta finalidade) e posteriormente em placas de 2,5 cm<sup>2</sup> para treinamento e em placas de 24 poços para o desenvolvimento dos trabalhos. Os parasitos foram inoculados também em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> , após o desenvolvimento da monocamada de células Vero que serviram de substrato para a manutenção dos parasitos durante o período do experimento.

A passagem das células para as placas de 2,5 cm<sup>2</sup> ou placas com 24 poços foi precedida da tripsinização da monocamada de células Vero obtidas nas garrafas de cultivo celular. A manipulação ocorreu em câmara de fluxo laminar, onde todo o material a ser utilizado foi borrifado com álcool 70 GL antes de ser levado ao interior da câmara para evitar a contaminação da cultura celular. Com o auxílio de pipetador automático retirou-se todo o meio MEM da garrafa, lavou-se com PBS para retirar os debris celulares existentes, retirou-se todo o PBS e adicionou-se cerca de 2 ml de tripsina, deixando a garrafa de cultivo celular em repouso por 3 minutos. Após este período, sem agitar a garrafa, retirou-se a tripsina com o pipetador automático,

adicionou-se 2 ml de meio MEM e lavou-se exaustivamente com o próprio meio por processo de aspiração e lavagem, possível com pipetador automático; desta forma desprende-se grande quantidade de células Vero.

Com as células em suspensão, mantendo o ambiente na cabine de fluxo laminar livre de contaminação, fez-se a exposição das placas de 2,5 cm<sup>2</sup> ou 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, cerca de 500  $\mu$ l para as placas e 200  $\mu$ l 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 em volume suficiente para cobrir a lamínula, 1 ml para cada placa e 500  $\mu$ l para cada poço.

Até que o desenvolvimento da monocamada de células Vero, tanto em placas quanto em poços não se concluísse, os parasitos foram mantidos em desenvolvimento no interior das garrafas de 25 cm<sup>2</sup>.

#### 4.3 - Laser :

Utilizou-se o equipamento laser Thera Lase-DMC de Fosfeto de Índio-Gálio-Alumínio (InGaAlP) acoplado a uma fibra óptica com diâmetro ( $\varnothing$ ) de 600  $\mu$ m emitindo luz no vermelho, com comprimento de onda de 685 nm, para irradiar uma área de 2,5 cm<sup>2</sup> para as placas de Petri descartáveis utilizadas inicialmente, e de 1cm<sup>2</sup> para as placas de 24 poços; potência de 35 mW . Os ensaios utilizaram a energia do laser em duas densidades (2 J/cm<sup>2</sup> e 4,5 J/cm<sup>2</sup>); a irradiação ocorreu em ambiente com ausência de luz.

Em tais placas e poços ocorreu inicialmente o cultivo de células Vero que, após a formação da monocamada de células, recebeu inóculo com os parasitos. Os ensaios iniciais ocorreram nas placas de Petri e os ensaios definitivos ocorreram nas placas com 24 poços.

Tanto placas de Petri individuais quanto as placas de 24 poços estavam fechados

durante o processo de irradiação e os poços foram irradiados com o auxílio de um anteparo de cor preta com um orifício para que os poços fossem irradiados de forma individual. A distância foi determinada pela área de abrangência do feixe do laser (spot) para as lamínulas nas placas ou poços; o tempo de exposição foi determinado pelo fornecimento de energia em cada poço ou placa ( $2 \text{ J/cm}^2$  ou  $4,5 \text{ J/cm}^2$ ), sendo por um período de 59 segundos para fornecer  $2 \text{ J/cm}^2$  e 2 min. e 9 segundos para  $4,5 \text{ J/cm}^2$ .

#### 4.4 - Ensaio efetuados :

##### 4.4.1 - Obtenção de monocamadas de células e parasitos:

Buscou-se inicialmente o desenvolvimento de monocamadas de células Vero em garrafas de cultura de  $25 \text{ cm}^2$ . Em separado desenvolveu-se uma população de parasitos, também em garrafas de cultura, em número significativo, para que as células pudessem ser infectadas em uma proporção que permitisse avaliações em curto espaço de tempo (aproximadamente 10 parasitos/célula). O crescimento da cultura ocorreu em estufa de cultura a  $37^\circ\text{C}$ , atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  e de umidade.

Após o desenvolvimento do cultivo celular permitir a multiplicação dos parasitos inoculados, retira-se o meio da garrafa com parasitos efetuando-se algumas lavagens com o próprio meio, centrifugou-se o lavado em tubo cônico por cinco minutos, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 1 ml de meio MEM com 10% de soro fetal bovino. Deste material alíquotou-se  $10 \mu\text{l}$  e diluiu-se em  $990 \mu\text{l}$  de paraformaldeído a 4% em PBS, aguardou-se aproximadamente cinco minutos, visando fixar os parasitos e, em câmara de Neubauer espelhada efetuou-se a contagem média por meio dos 4 quadrantes externos multiplicando-se pela diluição  $10^6$  obtendo-se assim o número de parasitos por ml de amostra. Ao mesmo tempo fez-se a contagem de células viáveis existentes nas lamínulas dos poços de cultivo celular, utilizando para tanto um microscópio invertido Olympus CK 40 e um contador manual de células; a contagem celular em é feita em três campos distintos, multiplicou-se pelo fator de

correção estabelecido pelo laboratório, sendo este 13256,7 para cultivo celular em placas de 2,5 cm<sup>2</sup> e 234,3 para os poços de 1 cm<sup>2</sup>. Desta forma foi possível obter uma população de 10 parasitos por célula quando do processo de inoculação.

#### 4.4.2 – Interação célula-parasita

Inicialmente, retirou-se o meio do interior de cada placa ou poço de cultivo, lavou-se com PBS e completou-se, com meio MEM + 10% de soro fetal bovino no volume de 990µl para as placas de Petri de 2,5 cm<sup>2</sup> e de 495 µl para os poços de 1 cm<sup>2</sup>. Do sedimento rico em protozoários/ml ressuspensos em 1 ml de MEM retirou-se uma alíquota de 10 µl para inocular em cada placa ou 5 µl para cada poço de cultura; incubou-se durante 12 a 24 horas para que as células fossem parasitadas iniciando o processo de replicação dos parasitos, a partir daí efetuou-se as inoculações do fármaco fotossensível e os ensaios de irradiação laser.

#### 4.4.3 - O fotossensibilizante:

O fotossensibilizante utilizado foi a Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal Cedida pelo Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco que a desenvolve no Depto. de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – USP, Ribeirão Preto-SP, na concentração final de 5 µM/ml em PBS. Este foi inoculado na cultura e incubado por 1 hora a 37<sup>0</sup>C no escuro. Após a incubação, retirou-se a ftalocianina através de lavagem com PBS e procedeu-se a irradiação com o laser. Retirou-se o PBS e completou-se com MEM, retornando o material para a estufa de cultivo celular, sempre abrigado da luz. Posteriormente, retirou-se os grupos de placas com os poços de cultivo em horários diferenciados (1, 12 e 24 horas pós irradiação), para avaliação a fresco e posterior fixação-marcação .

#### 4.4.4 - Marcadores Fluorescentes

4.4.4.1- JC-1 : marcador específico para mitocôndria. Consiste de uma sonda lipofílica que permite analisar o potencial de membrana devido a intensidade de fluorescência, bem como a atividade mitocondrial através de sua conformação morfológica. As mitocôndrias são sensíveis a radiações com vários comprimentos de onda de luz visíveis, sendo que a ativação do consumo do oxigênio acarreta

mudanças nas propriedades eletroquímicas, bioquímicas e ópticas de mitocôndrias isoladas (CARNEVALLI, 2001).

4.4.4.2- Rodamina – Faloidina : utilizada para marcação dos filamentos intermediários do citoesqueleto celular, observando-se a organização e dinâmica do citoesqueleto. A marcação fluorescente da actina é importante ferramenta para a investigação da dinâmica do citoesqueleto *in vitro*. Sondas moleculares fluorescentes, derivadas de falotoxinas marcam seletivamente filamentos de actina-F, tendo a vantagem de serem solúveis em água. As falotoxinas apresentam afinidade por filamentos grandes e pequenos apresentando vantagens sobre os anticorpos tais como: as propriedades de ligação não mudam com a variabilidade de espécies diferentes, inclusive plantas e animais ; sua marcação não específica é desprezível, assim o contraste entre áreas marcadas e não marcadas é altamente puro(CARNEVALLI, 2001).

4.4.4.3- DiOC<sub>6</sub>(3) : (3,3'- dihexiloxocarbocianina iodado) utilizado para marcação do retículo endoplasmático (RE). Ao contrário de outros corantes como a diacarbocianina ou a rodamina, o DiOC<sub>6</sub>(3) produz brilho muito intenso e é utilizado para visualizar o RE em células vivas e fixadas; sendo um marcador lipofílico, o DiOC<sub>6</sub>(3) permite marcar também outras membranas celulares (FERREIRA, 2000).

4.4.4.4 – Marcação: Para marcação dupla, com DiOC<sub>6</sub>(3) para retículo e Rodamina-Faloidina para citoesqueleto celular, marcou-se primeiro com DiOC<sub>6</sub>(3) (10 µg/ml, 15 minutos), fixou-se com paraformaldeído 4% em PBS e marcou-se em seguida com a Rodamina – Faloidina (1:100, 10 minutos); a marcação com JC-1 (0,1 µM, 20 minutos) também é feita antes de fixar o material; todo o procedimento ocorreu na ausência de qualquer fonte luminosa. As observações microscópicas e fotografias ocorreram utilizando um microscópio LEICA (DMLB) equipado com uma lâmpada de mercúrio HBO 100 W e o grupo de filtros correspondentes para microscopia de fluorescência: U.V., Azul e Verde.

4.4.5 - Ensaios:

Os vários ensaios efetuados ocorreram em duplicatas conforme o quadro de

atividades executadas descrito a seguir.

TABELA 1 : Séries de ensaios efetuados.

<b>Série Efetuada</b>	<b>Controle Só cels. Vero</b>	<b>Toxoplasma Em cels. Vero</b>	<b>Ftalocianina Vero + Toxo* *</b>	<b>2 J/cm<sup>2</sup> TFD*</b>	<b>4,5 J/cm<sup>2</sup> TFD*</b>	<b>laser 2J/cm<sup>2</sup></b>	<b>laser 4,5J/cm<sup>2</sup></b>
1-Ensaio em placas de 2,5 cm <sup>2</sup> avaliação direta a fresco.	2 (placas)	2 (placas)	2 (placas)	-- (placas)	2 (placas)	-- (placas)	2 (placas)
2- Ensaio em placas de 2,5 cm <sup>2</sup> um lote c/Giemsa e outro com DiOC <sub>6</sub> (3)	2	2	2	--	2	--	2
3- Ensaio em poços de 1 cm <sup>2</sup> DiOC <sub>6</sub> (3) e Rodamina - Faloidina, três períodos (1-12 e 24 horas)	6 (poços)	6 (poços)	6 (poços)	6 (poços)	-- (poços)	6 (poços)	-- (poços)
4- Ensaio em poços de 1 cm <sup>2</sup> DiOC <sub>6</sub> (3) e Rodamina- Faloidina, três períodos.	6	6	6	--	6	--	6
5- Ensaio em poços de 1 cm <sup>2</sup> JC-1, três períodos.	6	6	6	6	--	6	--
6- Ensaio em poços de 1 cm <sup>2</sup> JC-1, três períodos.	6	6	6	--	6	--	6
7- Ensaio em poços de 1 cm <sup>2</sup> e TFD no Toxoplasma antes da inoculação DiOC <sub>6</sub> (3),Rodamina e JC-1, três períodos.	6	6	6	6***	6***	--	--

\* TFD = Terapia fotodinâmica (células VERO parasitadas + Ftalocianina lipossomal + laser).

\*\* Toxo = Toxoplasma.

\*\*\* A TFD ocorreu apenas nos parasitos antes da serem inoculados nas células hospedeiras.

## 5 . RESULTADOS E DISCUSSÃO

A biomodulação provocada pela ação do laser, em certos comprimentos de onda, podem alterar reações bioquímicas específicas e/ou o total metabolismo celular (KARU, 2000). Em nossos experimentos constatou-se um ligeiro aumento na reprodução dos parasitos irradiados tanto com  $2 \text{ J/cm}^2$  como  $4,5 \text{ J/cm}^2$  em relação aos controles que continham apenas protozoários inoculados sem a irradiação (figuras 9, 10 e 15).

O uso de substâncias fotossensibilizantes dão início a uma reação metabólica na célula que não é conectada com uma resposta luminosa. Após absorver a luz no comprimento de onda usado para a irradiação, estas moléculas assumem um estado eletronicamente excitado do qual os processos moleculares primários podem conduzir a um efeito biológico mensurável em determinadas circunstâncias seguintes ao final do estímulo luminoso (reações secundárias) (KARU,2000). A TFD com o fotossensibilizante Ftalocianina Pc4 induz rápida apoptose em células de linfomas de ratos, iniciando com a liberação de Citocromo c da mitocôndria. Tem sido proposto que a permeabilidade da membrana mitocondrial, resultante da dissipação do potencial da membrana mitocondrial é essencial para o escape da Citocromo c mitocondrial para o citosol tão bem como para a morte celular apoptótica (CHIU, 2001).

O uso de um carreador, como um lipossoma, implica em significativa redução do volume de distribuição e a concentração da droga em tumores é aumentada. O lipossoma protege a droga do metabolismo e inativação no plasma, é próprio para limitações de tamanho no transporte de grandes moléculas ou carreadores através do endotélio sadio (DRUMMOND et al., 1999). A droga utilizada nos experimentos , a Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal, ainda se encontra em fase de estudos, entretanto, sua eficácia pode ser comprovada nos vários ensaios, principalmente quando da aplicação da densidade de energia (D.E.) de  $4,5 \text{ J/cm}^2$  na TFD, onde:

- As células parasitadas e tratadas com a Cloroalúminio Ftalocianina Lipossomal, sem ação do laser mostraram certa inibição no desenvolvimento dos vacúolos com os parasitos, mostrando-os muitas vezes aos pares como verificado na figura 11.

- Na TFD com  $2 \text{ J/cm}^2$  observou-se a presença e o desenvolvimento de vacúolos normalmente, sem variações na celularidade da monocamada de células Vero como mostra a figura 12.

- Na TFD com  $4,5 \text{ J/cm}^2$  observou-se a ausência de vacúolos parasitóforos, redução da celularidade e sensível variação no contorno das células da monocamada de células Vero, que também apresentaram vários vacúolos em seu interior, como demonstrado na figura 16.

O DiOC<sub>6</sub>(3) (3,3'- dihexiloxocarbocianina iodado) utilizado para corar o retículo endoplasmático (RE) , organela de células animais e vegetais, produz brilho muito intenso e é utilizado para visualizar o RE em células vivas e fixadas; sendo um marcador lipofílico, o DiOC<sub>6</sub>(3) permite marcar também outras membranas celulares (FERREIRA, 2000). As amostras tratadas com DiOC<sub>6</sub>(3) mostraram maior concentração reticular ao redor dos vacúolos, principalmente em ensaios de fotomodulação (figura 09), quando comparados aos grupos controle (figura 14) . Outro marcador utilizado e que possibilitou observações foi a Rodamina – Faloidina, utilizada para marcação dos filamentos intermediários do citoesqueleto , observando-se a organização e dinâmica do citoesqueleto. A marcação fluorescente dos filamentos intermediários é importante ferramenta para a investigação da dinâmica do citoesqueleto *in vitro*; sua marcação não específica é desprezível, assim o contraste entre áreas marcadas e não marcadas é altamente puro (CARNEVALLI, 2001). Foi possível analisar que os filamentos intermediários das células parasitadas pelo *T. gondii* mostraram sensível variação no seu arranjo se comparadas com células não parasitadas (figura 13), ao contrário do que ocorre quando o parasito submetido ao tratamento pré-inoculação sofre destruição no interior da célula hospedeira(figura 22). Na marcação pela JC-1, sonda lipofílica que nos permite analisar o potencial de membrana devido a intensidade de fluorescência, verifica-se que as mitocôndrias são sensíveis a radiações com vários comprimentos de onda de luz visíveis, sendo que a ativação do consumo do oxigênio acarreta mudanças nas propriedades eletroquímicas, bioquímicas e ópticas de mitocôndrias isoladas (CARNEVALLI, 2001). Tal condição pode ser observada nas condições das figuras 20 e 21, onde a atividade mitocondrial emite fluorescência na faixa do amarelo quanto maior for a atividade mitocondrial.

Em condições naturais, após o parasita entrar no hospedeiro, este para de mover-se e o vacúolo fecha-se na sua porção final . O vacúolo recém formado imediatamente recruta mitocôndrias e porções do retículo endoplasmático do hospedeiro. Esta associação fechada entre organelas hospedeiras e o vacúolo parasitóforo é do tipo que desempenha um papel na aquisição de nutrientes essenciais (possivelmente lipídeos) para o crescimento intracelular (BLACK; BOOTHROYD, 2000). No ensaio final , onde realizou-se o tratamento dos protozoários antes da inoculação, foi possível verificar que nos parasitos tratados apenas com Ftalocianina Lipossomal não havia a movimentação normal observada nas populações controle e os vacúolos formados eram raros e pequenos, muitos com material irregular no seu interior. Na TFD com  $2 \text{ J/cm}^2$  também há comprometimento na mobilidade e progressão dos parasitos , os vacúolos existentes estão, em sua maioria, distantes do núcleo das células parasitadas e muitos são muito pequenos e irregulares, demonstrando a irregularidade do material interno como para a Ftalocianina. Com  $4,5 \text{ J/cm}^2$  , verificou-se parasitos imóveis, vacúolos totalmente irregulares e com material amorfo no interior, sugerindo que ocorreu a colonização pelos parasitos mas estes foram posteriormente digeridos. Na marcação com DiOC<sub>6</sub>(3) não há a mesma concentração de retículo verificada nos outros ensaios (figuras 17 e 18). Com JC-1 não se verificou atividade mitocondrial ou esta esteve muito discreta em relação ao grupo controle (figura 21) e com Rodamina-Faloidina os filamentos intermediários das células hospedeiras não apresentou as variações que freqüentemente ocorrem nos ensaios com os cultivos celulares submetidos ao tratamento ou ação direta do parasito (figura 22).

Figura 9: Células Vero incubadas com protozoários e irradiadas com Laser na densidade de energia de  $2 \text{ J/cm}^2$  . Após 12 horas realizou-se marcação com DiOC<sub>6</sub>(3). Observa-se grande vacúolo, intimamente ligado ao núcleo celular cercado por retículo (seta); 2500X.

Figura 10: Células Vero inoculadas com *T. Gondii* (controle). Após 24 horas realizou-se a marcação com DiOC<sub>6</sub>(3). Observa-se processo de ruptura celular ; 2500X.

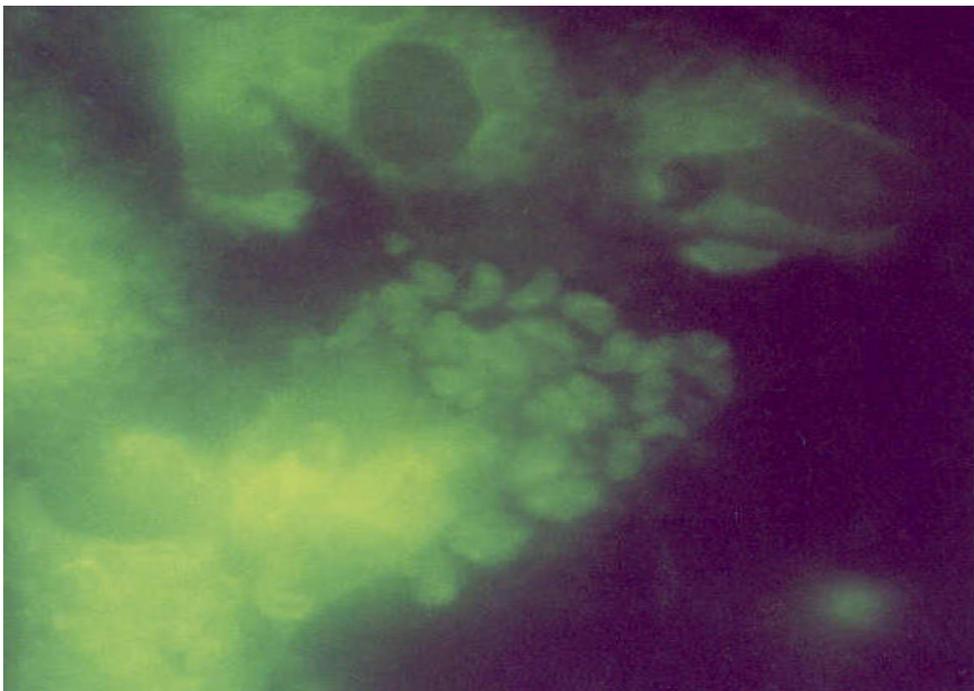
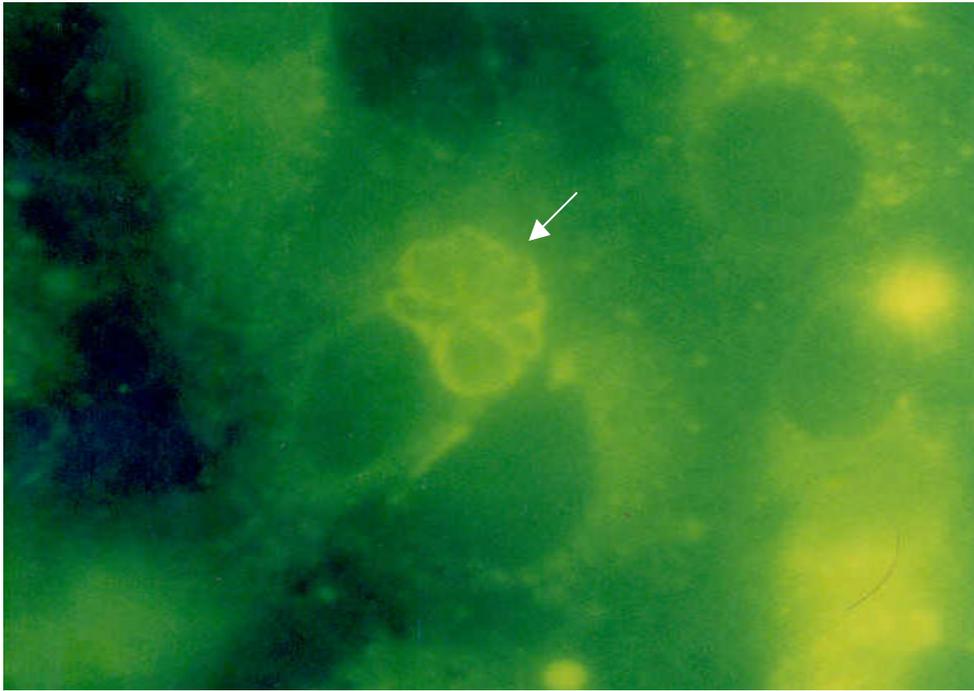


Figura 11 : Tratamento dos parasitos apenas com Ftalocianina lipossomal , marcado com DiOC<sub>6</sub>(3) mostrando pequeno vacúolo (central, próximo ao núcleo - seta), com menor concentração de retículo ao redor e um padrão muito constante, vacúolos com parasitos aos pares e com estrutura ligeiramente maior quando comparados aos parasitos sem tratamento; 2500X.

Figura 12 : Terapia fotodinâmica com DE. 2 J/cm<sup>2</sup> marcado com DiOC<sub>6</sub>(3), após 12 horas verificam-se vacúolos em desenvolvimento (seta); não há significativa alteração na estrutura celular. Contudo a velocidade da replicação dos parasitos e liberação para meio extracelular ocorre de forma reduzida quando comparado com as culturas de células Vero inoculadas com o parasito, submetidas ou não a irradiação Laser; 2500X.

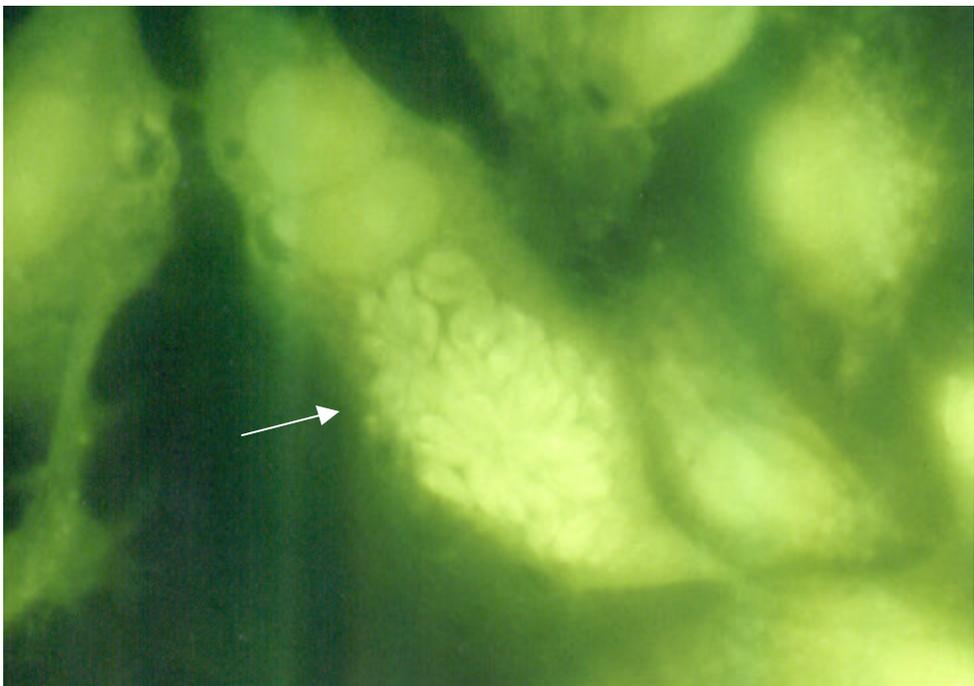
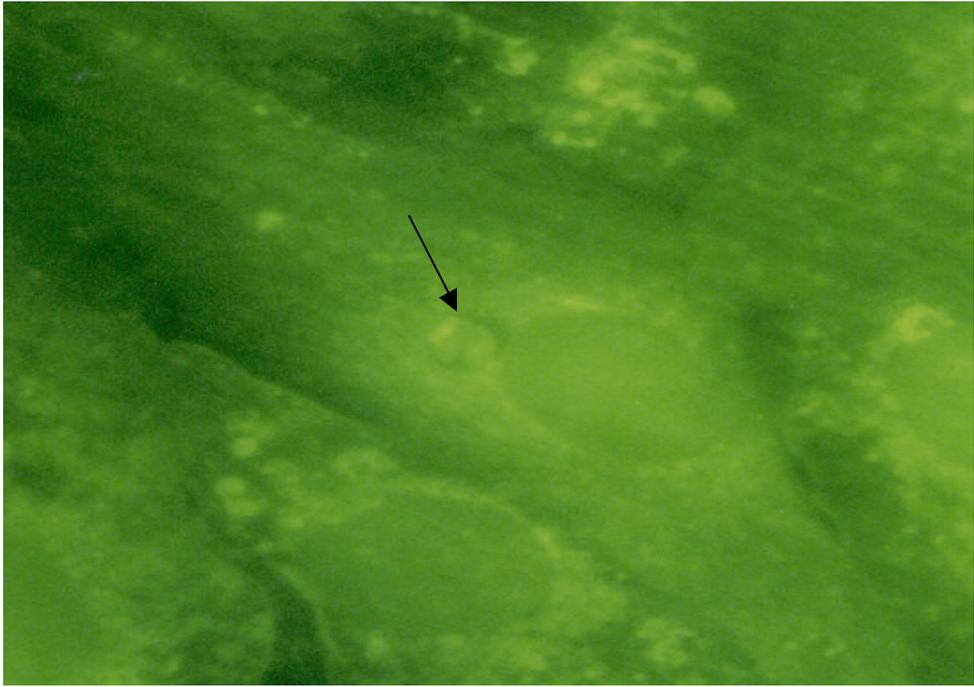


Figura 13 : Cultura celular em microscopia de fluorescência , marcada com Rodamina faloidina para citoesqueleto (filamentos intermediários das células hospedeiras), mostrando vacúolo com parasitos fixados 24 horas após inoculação sem o uso do laser como fotomodulação , ftalocianina ou PDT (seta) ; percebe-se como o vacúolo formado está próximo ao núcleo celular além da sugestiva variação no citoesqueleto se comparado com a célula adjacente (setas); 2500X.

Figura 14 : Mesma imagem em microscopia de fluorescência mostrando vacúolo com parasitos fixados 24 horas após inoculação nos grupos controle, sem o uso do laser como fotomodulação , ftalocianina ou TFD (seta); percebe-se como o vacúolo formado está próximo ao núcleo celular e este por sua vez mostra variação em seu contorno ; uso de DiOC<sub>6</sub>(3) para marcação de retículo; 2500X.

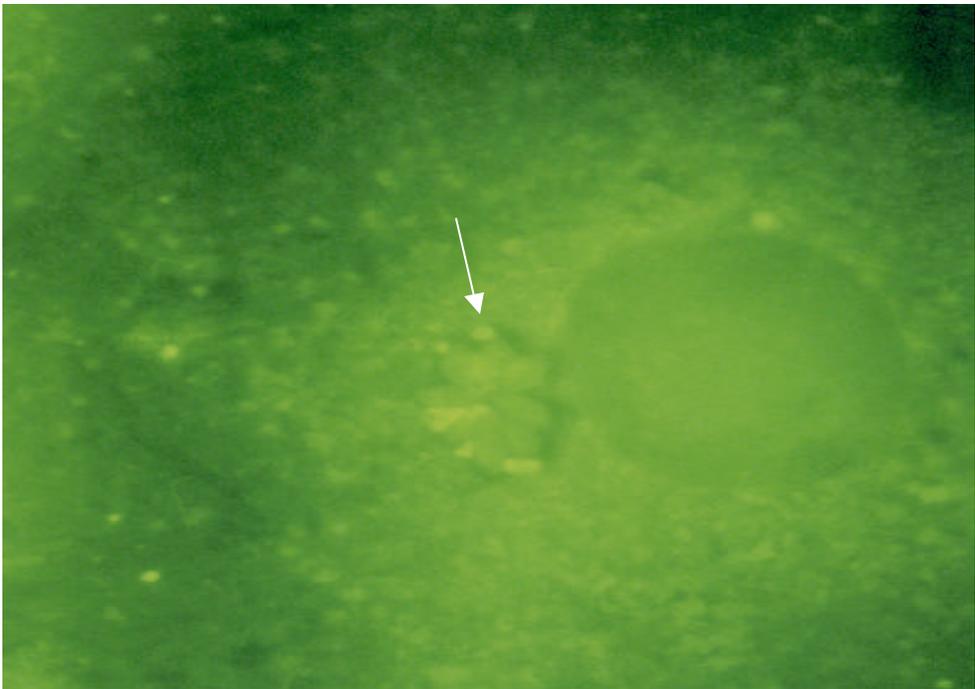
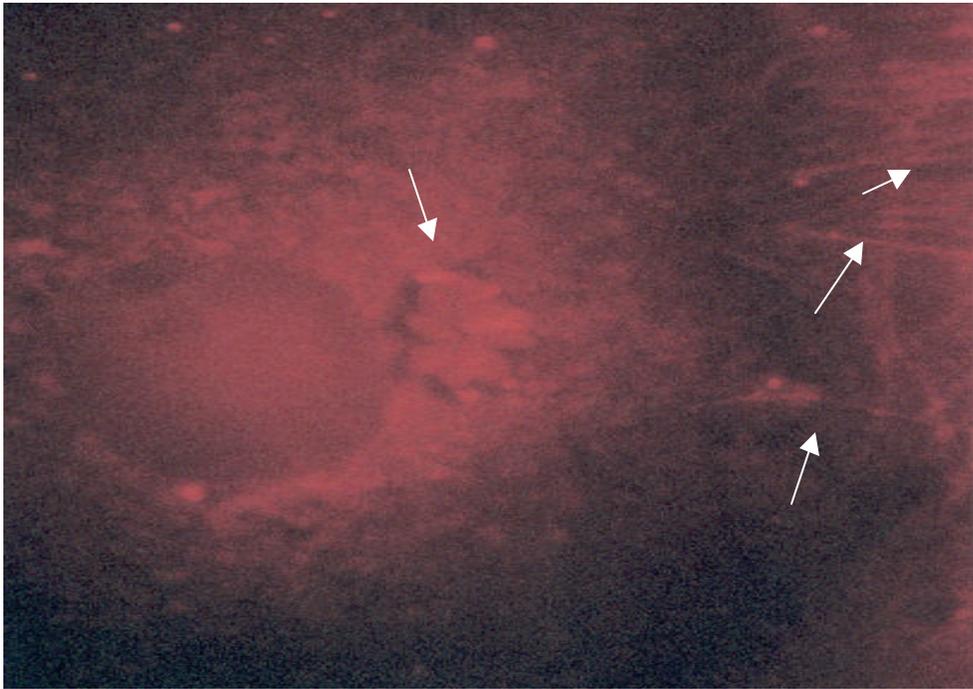


Figura 15 : Imagem de cultura celular mostrando a grande quantidade de parasitos e vacúolos após 24 horas da biomodulação com Laser , D.E 4,5 J/cm<sup>2</sup>, marcada com DiOC<sub>6</sub>(3); 2500X.

Figura 16 : Cultura celular marcada com DiOC<sub>6</sub>(3) mostrando redução da celularidade, alteração no contorno da maioria das células e a formação de inúmeros vacúolos após 24 horas da TFD com 4,5 J/cm<sup>2</sup>; 1000X.

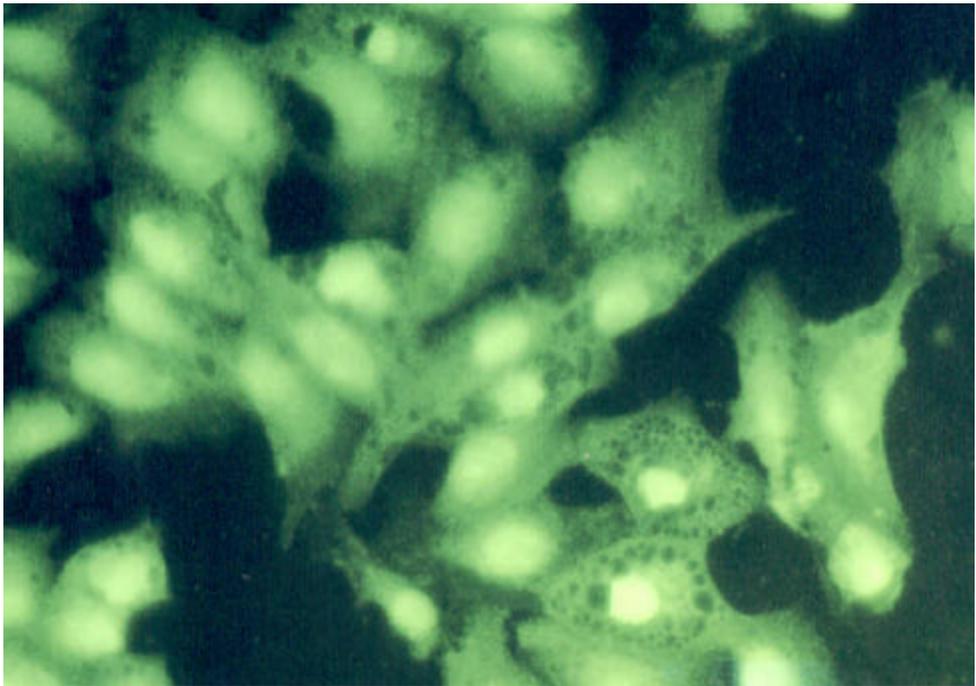
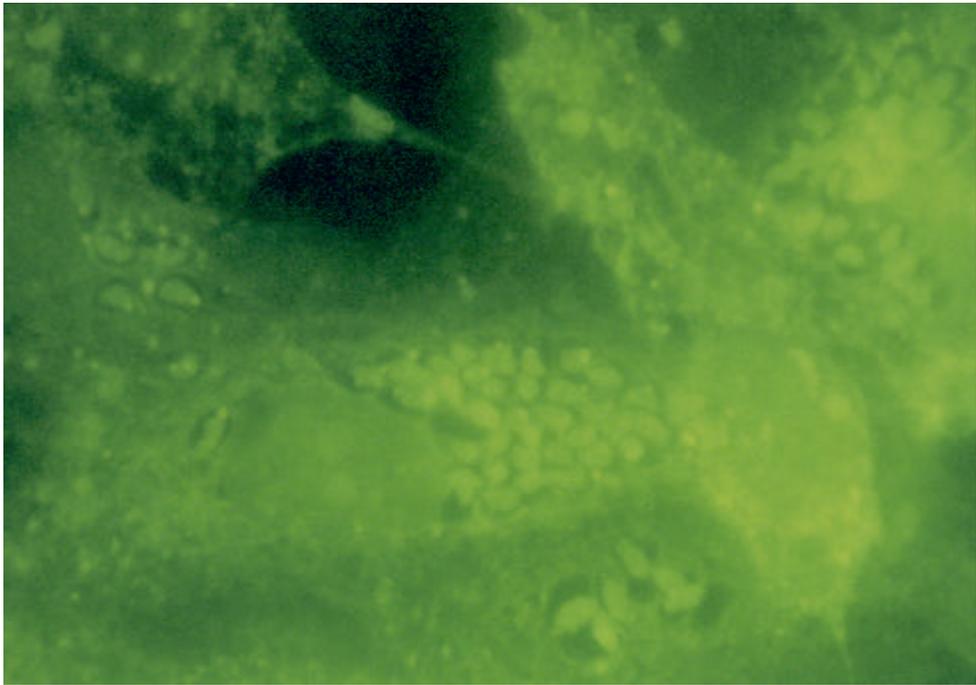


Figura 17 : Cultura celular marcada com JC-1 , 12 horas após inoculação dos parasitos pré-tratados com TFD  $4,5 \text{ J/cm}^2$  (seta); 2500X.

Figura 18 : Cultura celular marcada com DiOC<sub>6</sub>(3) , 24 horas após inoculação dos parasitos pré-tratados com TFD  $2 \text{ J/cm}^2$  (seta); 2500X.

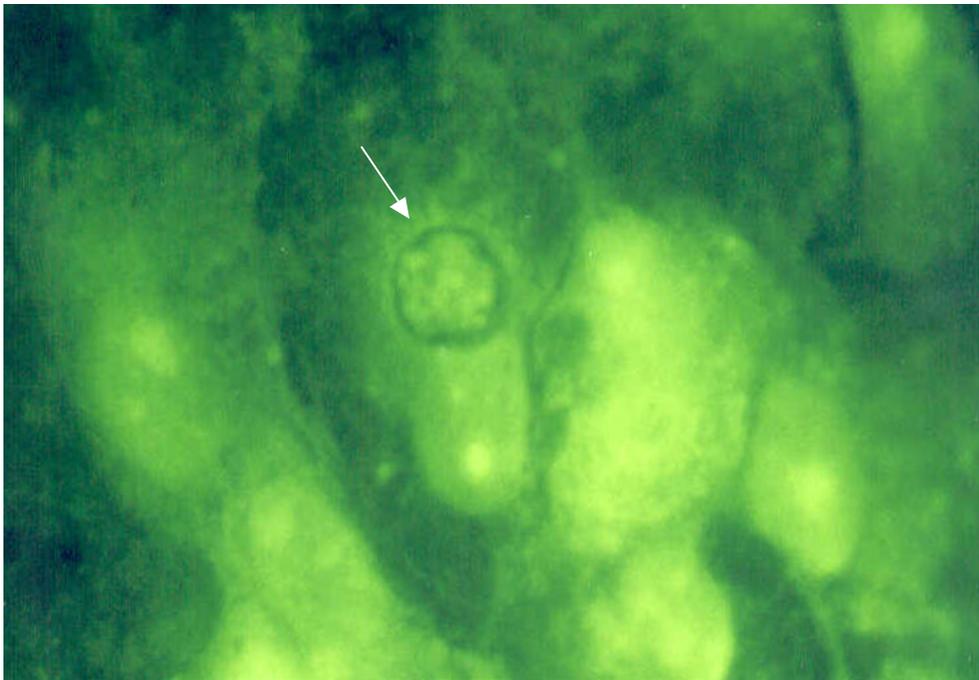


Figura 19 : Imagem de cultura celular marcada com JC-1, 12 horas pós inoculação dos parasitos pré-tratados com ftalocianina lipossomal (setas), mostra alteração na estrutura dos vacúolos com material digerido no seu interior; 2500X.

Figura 20 : Células marcadas com JC-1, 24 horas pós inoculação dos parasitos sem qualquer pré-tratamento (setas), mostra alteração na atividade mitocondrial dos parasitos e agrupamento das mitocôndrias da célula hospedeira próximo ao vacúolo entretanto sem atividade mitocondrial detectável; 2500X.

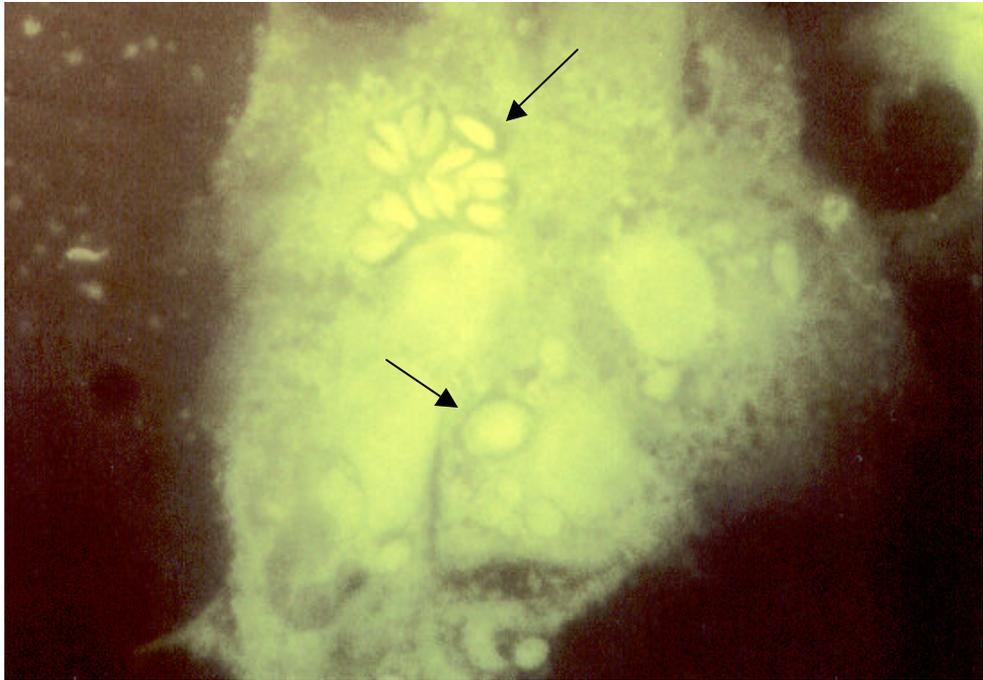
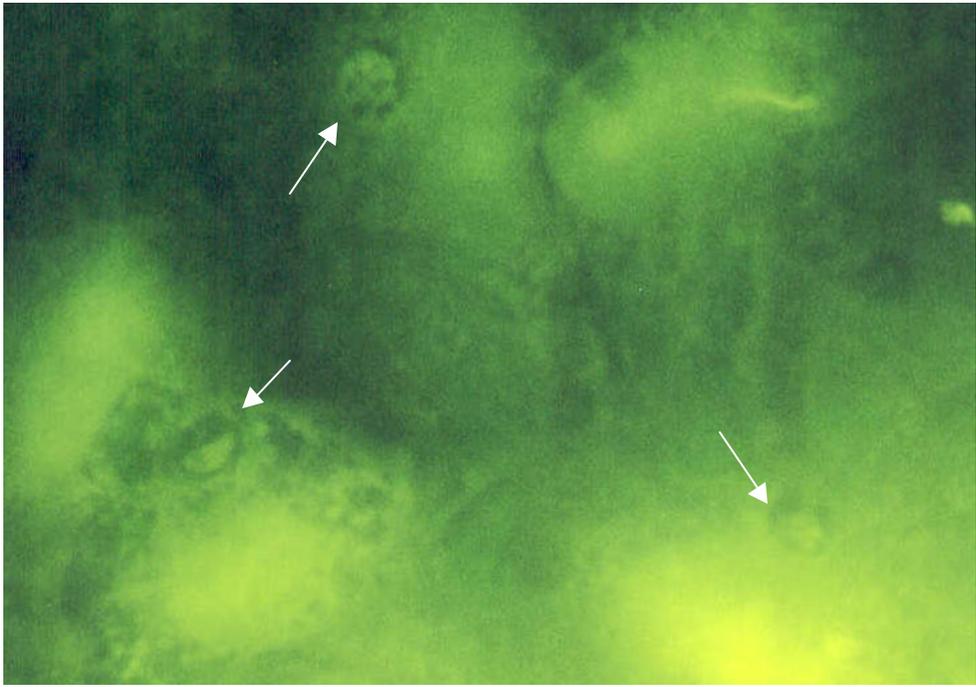
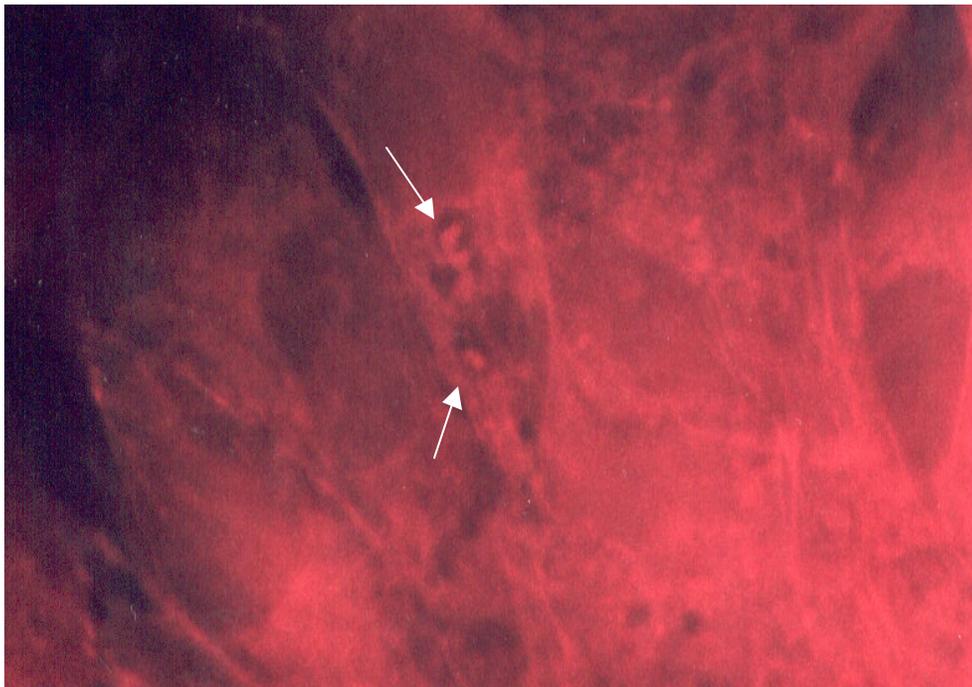
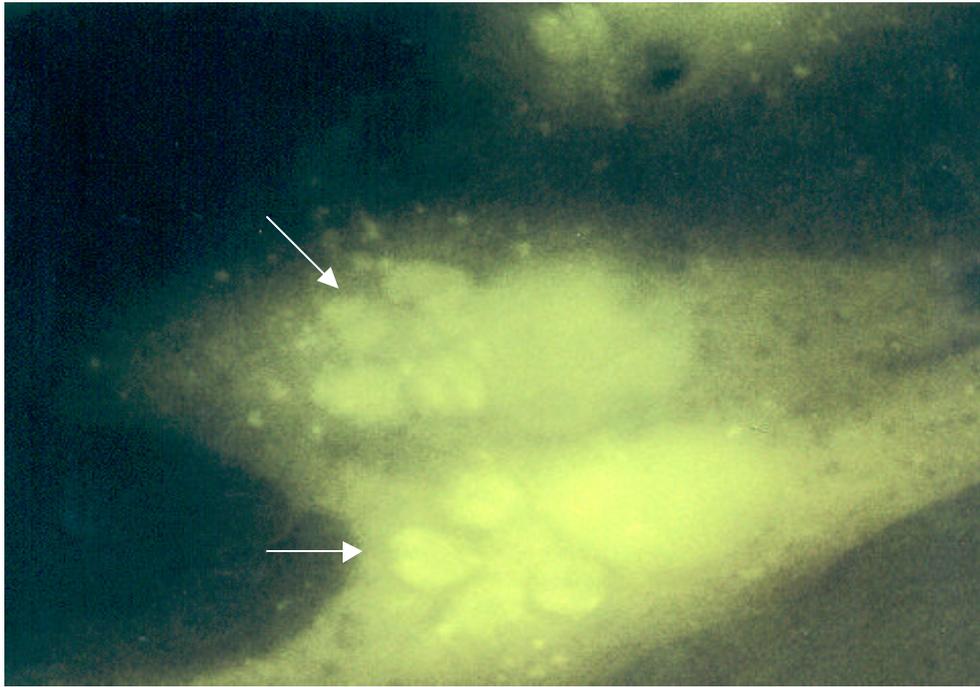


Figura 21 : Cultura celular marcada com JC-1, 12 horas pós inoculação dos parasitos com pré-tratamento por Ftalocianina Lipossomal(setas), mostra discreta alteração na atividade mitocondrial dos parasitos e da célula hospedeira; agrupamento das mitocôndrias da célula hospedeira próximo ao vacúolo além da presença de parasitos aos pares e com sua estrutura maior que a dos parasitos sem o pré-tratamento; 2500X.

Figura 22 : Cultura celular marcada com Rodamina-faloidina, 12 horas pós inoculação dos parasitos com pré-tratamento por Ftalocianina Lipossomal, não mostra variação nos filamentos intermediários das células parasitadas, além de evidenciar alteração na estrutura do parasito encerrado em vacúolo provavelmente lisossomal (setas); 2500X.



## 6 . CONCLUSÃO

Após a confecção do substrato celular constituído de monocamada de células da linhagem VERO, inoculação com os protozoários, tratamento com o fármaco fotossensível Cloroalumínio Ftalocianina Lipossomal [ 5  $\mu$ M/ml ] e irradiação com o diodo laser InGaAlP 685 nm com 2 densidades de energia, 2 J/cm<sup>2</sup> e 4,5 J/cm<sup>2</sup> pode-se concluir que:

- A irradiação laser nos grupos celulares inoculados com *T. gondii* e que não receberam o tratamento com o fotossensibilizante mostrou o efeito primário da irradiação, com aumento no número de células hospedeiras e no desenvolvimento dos parasitas inoculados, demonstrando a biomodulação, (figura 15).
- O uso da Cloroalumínio Ftalocianina Lipossomal na concentração de 5  $\mu$ M/ml, com um período de incubação de 1 hora no escuro em estufa de cultivo celular, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> seguida da irradiação laser InGaAlP 685 nm mostrou-se eficiente tanto no tratamento das monocamadas celulares após 24 horas de inoculação dos parasitos, quanto nos ensaios onde o parasita foi tratado com o fármaco fotossensível antes da inoculação destes no substrato celular. A eficiência é clara quando da irradiação com 4,5 J/cm<sup>2</sup>, produzindo grandes danos celulares e nos parasitas em seu interior no primeiro caso (figura 16) e a penetração do parasita com a formação de vacúolos digestivos quando do segundo caso ( figuras 17 e 18), demonstrando a inviabilidade do parasita causado pelo efeito secundário da ação do laser via fotoestímulo da Ftalocianina empregada que por sua vez levou aos danos celulares observados.
- Análises efetuadas após o uso de fluorocromos marcadores de estruturas celulares específicas, possibilitou verificar o aumento da concentração reticular marcado com DiOC<sub>6</sub>(3) ao redor de vacúolos onde a dinâmica de desenvolvimento e multiplicação do parasita é preservada, indicando a importância desta estrutura para a vitalidade e reprodução do *Toxoplasma* (figura 09). Observações efetuadas com o marcador Rodamina – Faloidina

demonstraram a alteração no padrão dos filamentos intermediários celulares (citoesqueleto) entre células parasitadas e não parasitadas (figura 13), não observadas quando da formação de vacúolo com o parasito em provável processo de digestão lisossomal (figura 22). O marcador JC-1, possibilitou verificar a migração de mitocôndrias das células hospedeiras quando da formação dos vacúolos e a sensível atividade mitocondrial por parte dos parasitos quando em franco processo de desenvolvimento e multiplicação (figura 20), diferente dos casos de tratamento dos parasitos com a ftalocianina antes da inoculação, onde a atividade mitocondrial do parasita e das células hospedeiras é muito discreta (figura 21).

## 7 . PERSPECTIVAS FUTURAS

Torna-se necessário, em ensaios futuros, dentre outras avaliações que possam se mostrar necessárias no que diz respeito a ensaios com maior especificidade e detalhamento, alguns estudos possíveis dentro da realidade das atividades executadas, tais como:

- Efetuar amostragens mais significativas, com um maior número de repetições e grupamentos de cultivo, visando oferecer maior confiabilidade e compor um perfil estatístico dos resultados obtidos.
- Acompanhar o recrutamento de lisossomos utilizando albumina complexada com ouro coloidal como marcador de lisossomos secundários, associado ao uso de vídeo microscopia.
- Isolar o vacúolo parasitóforo para análise bioquímica de sua membrana, após os momentos iniciais da interação das células hospedeiras com os parasitas de diversos grupos ( controle, pré-tratados apenas com Ftalocianina, TFD com  $2 \text{ J/cm}^2$  e  $4,5 \text{ J/cm}^2$  e/ou outras densidades de energia que possam ser mais apropriadas ) com a finalidade de encontrar indícios de natureza química dos componentes envolvidos no processo de interação.
- Avaliar a possibilidade de reproduzir tais ensaios com outros protozoários de interesse clínico, tais como *Leishmania* sp. e *Tripanossoma* sp .

## BIBLIOGRAFIA

BLACK, M.W.; BOOTHROYD, J. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n. 3, p. 607-623. Sep. 2000,

BUTCHER B.A .; DENKERS E. Y. Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production . *Infection and Immunity* , v.70, n. 9 , p. 5216-5224. Sep. 2002 .

CARNEVALLI, C.M.M. **Efeito da radiação do Diodo LASER ( $\lambda=830\text{nm}$ ) em Cultura de fibroblastos CHO-K1** . 2001 . 52f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) - Instituto de Pesquisa e desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

CARVALHO , L. de ; SOUZA , W de . Citochemical localization of plasma Membrane enzyme markers during interiorization of tachyzoites of *Toxoplasma gondii* by macrophages . *J.Protozool.* v. 36, n.2, p.164 - 170 .1989.

CARVALHO , L. , de; SOUZA, W de . Internalization of surface anionic sites and phagosome – lysosome function during interaction *Toxoplasma gondii* with macrophages . *Euro . J.Cell Biol.*, v. 51,p.211- 219 . 1990.

CHIU, S.M.; OLEINICK, N.L. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. **British Journal of Cancer**, v. 84 , Issue 8 , p. 1099 . 2001. Disponível em: <http://search.epnet.com/direct.asp?an=8876897&db=afh> . Acesso em: 14 out.2003..

CLARK, C.; BOYLES, S. **Phthalocyanine May Eliminate Parasites From Blood Cells.** **Blood Weekly.** Academic Search Elite. 07/29/96 , 3p. Disponível em : <http://search.epnet.com/direct.asp?na=9608070087&db=afh>. Acesso em: 10 fev.2003.

COPPENS, I.; JOINER, K.A. Host but Not Parasite Cholesterol Controls Toxoplasma Cell Entry by Modulating Organelle Discharge. **Molecular Biology of the Cell**, v. 14, p.3804-3820, Sep. 2003.

DRUMMOND, D.C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological reviews**. v. 51, n.4, p. 692-743. 1999.

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,

FABRIS, C. et al. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. **Cancer Research** v.61, p. 7495-7500, October 15, 2001. Disponível em: <http://cancerres.cacrjournals.org/cgi/content/full/61/20/7495>. Acesso em: 10 fev. 2003.

FERREIRA, S.D.R.M. **Estudo da citotoxicidade de ftalocianina cloroalúminio Tetrasulfonada (AlPcS<sub>4</sub>) em cultura de células normais e neoplásicas após irradiação com luz coerente**. 2000. 58f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.

FERREIRA, S.D.R.M. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AlPcS<sub>4</sub>. **Lasers in Medical Science**. 2004. 18: 207-212.

FRASER, C.M. **Manual MERCK de Veterinária**. São Paulo : Ed . Roca, 1991.1803p.

GRIFFITHS, J. et al. Some Observations on the Synthesis of Polysubstituted Zinc Phthalocyanine Sensitizers for Photodynamic Therapy. **Dyes and Pigments**, v. 33, Issue 1, January 1997, p. 65-78.

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

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ALDELBERG, EA. **Microbiologia Médica**. 20.ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000. 611p.

JONES , T . C . ; YEH , S . ; HIRSCH , J. G. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells . **J Exp Med** , v.136,p. 136 :1157 – 1171.1972.

KARU, T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.49 , p. 1-17.1999.

KARU, T . **Mechanisms of low power laser light action on cellular level. Lasers in Medicine and Dentistry**. Rijeka: Ed. Vitgraf, 2000. p 97-125. cap.4.

LARROQUE,C.; PELEGRIN,A.; VAN LIER, J.E. Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumor models. **Br. J. Cancer**, 1996.Dec.;74(12):1886-90.

LECORDIER, L. et al. Transmembrane Insertion of the *Toxoplasma gondii* GRA5 Protein Occurs after Soluble Secretion into the Host Cell. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10,p. 1277-1287, April 1999.

LUFT , B.J.; REMINGTON, J.S. Toxoplasmic encephalitis in AIDS . **Clin. Infect. Dis.** v.15, p.:211-212 .1992.

MAÑES, S. ; DEL REAL, G; MARTINEZ, C. Pathogens: Raft Hijackers. **Nature Reviews Immunology**, n.3 , p.557-568 2003..

- MARBLE, M. Blood Safety (Virus Inactivation). **AIDS Weekly Plus**, 05 jun. 1996, p.24.
- MELLO, J.B.; MELLO, G.P.S. **Laser em Odontologia**. São Paulo:Santos, 2001. p.3-85, cap. 1 - 7.
- MELO , E.T. de ; CARVALHO , L de. ; SOUZA , W de . **Penetration of *Toxoplasma gondii* into host cells induces changes in the distribution of the mitochondria and endoplasmic reticulum** . Cell Struct. And Funct. 1992 . 17:311-17 .
- MELO, E.J. ; ATTIAS , M. ; DE SOUZA , W. The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. **J Struct Biol**. v.130, n.1,p.27-33. May2000.
- MERCIER, C. et al. Biogenesis of Nanotubular Network in *Toxoplasma* Parasitophorous Vacuole Induced by Parasite Proteins. **Molecular Biology of the cell**. v. 13, p. 2397–2409, July 2002.
- MÉRESSE,S. et al. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. E183- E188. Nov. 1999,
- MORISAKI , J . H . ; HEUSER , J . E . ; SIBLEY , L . D . Invasion of *Toxoplasma gondii* occurs by active penetration of the host cell. **J. cell science**. v. 108,p. 2457-2464 .1995.
- MORISSETE, N.S.; SIBLEY, L.D. Cytoesqueleton of Apicomplexan Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n 1, Mar. 2002, p. 21-38.
- NUNES, S.M.T.; SGUILLA, F.S.; TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives . **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.37, n.2, p. 273-284. 2004.

PACHECO-SOARES, C; SOUZA, W.de. **Detection of sugars in formation of parasitophorous vacuole membrane in the interaction Vero cells** . Memórias do Instituto Oswaldo Cruz , v.91. , suppl , novembro , 1996 . Disponível em : <http://memorias.ioc.fiocruz.br/96caxambu/pro2.html>. Acesso em : 27 out.2003.

PACHECO-SOARES, C; SOUZA, W.de. **Redistribution of Parasite and Host Cell Membrane Components during *Toxoplasma gondii* Invasion**. CELL STRUCTURE AND FUNCTION, 23: 159-168. 1998.

PACHECO-SOARES, C; SOUZA, W.de. Labeled probes inserted in the macrophage membrane are transferred to the parasite surface and internalized during cell invasion by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol Res.** 86: 11-17. 2000.

REMYINGTON, J.S. ; DESMONTS, G . **Infectious diseases of the fetus and newborn infants**. 1983. Philadelphia : W. B . Saunders, s.d. p. 143-263 .

RYNING, F.W. ; REMINGTON , J. S. Effect of cytochalasin D on *Toxoplasma* cell entry . **Infect. Immun.** v. 20, p. 739-743 .1978.

ROVALDI , C.R. et al . **Antimicrob. Agents Chemother** . Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens“in vitro”. 44(12):3364-7. 2000.

SCHWARTZMAN, J.D.; PEFEFFERKRON, E.R. Immunofluorescent localization of myosin at the anterior pole of the coccidian *Toxoplasma gondii* . **J. Protozool.** v.30, n.4, p.657-661, 1983.

SIBLEY, L.D. Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii* . **Trends in cell Biol.** v.5,p.129-132 .1995.

SIBLEY, L.D. et al. Invasion and intracellular survival by *Toxoplasma gondii*. 1994. **Baillière's Clinical Infectious Diseases**. v.1, n.2,1994.

SIBLEY, L.D. ; KRAHENBUHL, J.L. Modification of host cell phagosomes by *Toxoplasma gondii* involves redistribution of surface proteins and secretion of a 32 kDa protein. **Euro JCell Biology**. v.47, p. 81-87. 1989.

SIBLEY, L.D. et al. *Toxoplasma* modifies macrophage phagosomes by secretion of a vesicular network rich in surface proteins. **J Cell Biology**. v.103, p.:867-874.1986.

SIBLEY, L.D.; KRAHENBUHL, J.L. ; WEIDNER, E. Lymphokine activation of J774G8 cells and mouse peritoneal macrophages challenged with *Toxoplasma gondii*. **Infect. Immun.** v. 49,p. 760-764.1985.

SILVA, J.C. **Avaliação do Uso do Laser de Baixa Potência e Droga Fotossensibilizadora no Processo de Cicatrização**. 2003. 100f. Dissertação ( Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba.