

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

Cláudia de Mello Ribeiro <sup>1</sup>, Newton Soares da Silva <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Universidade do Vale do Paraíba – Av. Shishima Hifumi, 2911- 12244-000 - São José dos Campos e-mail: ctc3@uol.com.br

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Universidade do Vale do Paraíba – Av. Shishima Hifumi, 2911- 12244-000 - São José dos Campos e-mail: ctc3@uol.com.br

**Palavras-chave:** *Tritrichomonas foetus*, AIPcS<sub>4</sub>, laser, terapia fotodinâmica.

**Área do Conhecimento:** Biologia Celular.

**Resumo-** Os efeitos da terapia fotodinâmica com fotossensibilizador de segunda geração tem sido amplamente investigados em culturas de células neoplásicas, visando a aplicação clínica no tratamento de neoplasias. Porém, os efeitos da terapia fotodinâmica em culturas de protozoários são pouco estudados. Neste trabalho, culturas de *T. foetus* foram submetidas a tratamento com o fotossensibilizador de segunda geração alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>) e irradiadas com um laser semiconductor (InGaAIP), a uma densidade de energia de 0,5 J/cm<sup>2</sup>. O tratamento fotodinâmico com AIPcS<sub>4</sub> reduz o número destes protozoários *in vitro*.

## Introdução

A tricomoníase bovina é uma enfermidade infectocontagiosa, de transmissão venérea, cujo agente etiológico é o protozoário *Tritrichomonas foetus*, encontrado na superfície da mucosa do trato urogenital das fêmeas ou nas membranas prepucial e peniana de touros. Nas fêmeas, as manifestações clínicas incluem aborto, com repetição de cios a intervalos irregulares, vaginite, cervicite, endometrite e piometra. No touro, pode desenvolver-se um corrimento prepucial associado a pequenos nódulos na membrana prepucial. Depois disso, não existe qualquer sintomatologia clínica, tornando-se portador assintomático e podendo disseminar a infecção através da monta natural ou da inseminação artificial [1].

O tratamento é baseado no uso de derivados nitroimidazoles. Deve-se levar em consideração os efeitos colaterais de estase rumenal e anorexia com o uso do dimetridazole, além de serem medicações carcinogênicas [2].

A vacinação terapêutica ou preventiva tem produzido resultados inconsistentes. Após imunização com *T. foetus* inativado, há aumento de anticorpos, principalmente IgG1 e IgG2, em útero e muco cervico-vaginal de fêmeas. A vacinação pode diminuir a severidade e a duração da infecção, mas não protege contra novos desafios [3]. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de bovinos, mas a baixa eficiência reprodutiva compromete a competitividade da produção

nacional no mercado globalizado. Essa enfermidade é, provavelmente, a terceira causa de aborto em bovinos (depois da brucelose e da leptospirose). Apesar da importância econômica atribuída à tricomoníase bovina, poucos foram os estudos realizados nas últimas décadas, deixando assim de ser erradicada e muito menos submetida a um controle rigoroso. Desta forma, a doença continua a causar problemas para o rebanho brasileiro [2].

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade nova de terapia através do uso combinado de um corante (fotossensibilizador) e uma fonte de luz (geralmente o laser) [4].

Embora a TFD tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia do câncer, é evidente seu grande potencial terapêutico no que concerne a outras moléstias como a psoríase, micoses e destruição de infecções bacterianas resistentes a tratamentos com antibióticos. A terapia fotodinâmica, com derivados de ftalocianinas, tem sido eficiente na inativação de vírus, como o do herpes [5]. A utilização da TFD em protozoários tem sido pouco investigada. O objetivo deste trabalho é avaliar quantitativamente o efeito citotóxico da Terapia Fotodinâmica, empregando a alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>), em culturas de *Tritrichomonas foetus*.

## Materiais e métodos

**Protozoários:** *Tritrichomonas foetus* linhagem K, gentilmente cedidos pelo Dr. Fernando Costa e Silva Filho — Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho — UFRJ, estão sendo mantidos em meio TYM Diamond's [6] suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa (Forma Scientific) a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, e subcultivadas a cada 48 horas. O número de protozoários foi padronizado a 1x10<sup>6</sup> células.ml<sup>-1</sup>.

**Fotossensibilizador:** foi utilizada a alumínio ftalocianina tetrasulfonada (AIPcS<sub>4</sub>) (Porphyrin Products, INC.). A droga foi dissolvida em PBS a uma concentração de 1mM, estocada a 4° C. Para o experimento, o corante foi preparado a uma concentração de 10µM, a partir da solução-estoque e seus espectros de absorção traçados em espectrofotômetro (UV-VIS Varian Cary 50), sendo a leitura realizada em cubeta de quartzo tipo 111-QS 10mm (Hellma®, Sul Americana LTDA).

**Incubação dos protozoários com AIPcS<sub>4</sub> :** diluições séricas de cultura de *T.foetus* (1x 10<sup>6</sup> células.ml<sup>-1</sup>) foram alicotadas (500µl) em 12 tubos Eppendorf. Em seguida, procedeu-se ao tratamento: 6 tubos sem tratamento e 6 tubos com AIPcS<sub>4</sub>. As células foram, então, incubadas por 60 minutos, no escuro, em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram centrifugadas a 3000rpm, por 10 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante e com ele, o fotossensibilizador não captado. 500µl de meio TYM suplementado com 10% de soro fetal bovino foram adicionados em cada tubo Eppendorf.

**Irradiação:** o conteúdo de cada Eppendorf foi transferido para cada poço (área = 1,8cm<sup>2</sup>) de uma placa de 24 poços: 3 poços para controle (sem tratamento); 3 poços para AIPcS<sub>4</sub>; 3 poços para laser; 3 poços para Terapia Fotodinâmica. A placa foi submetida a irradiação, no escuro, com um laser semiconductor (Thera Lase – DMC), com meio ativo de InGaAlP (λ= 685nm; P = 26mW; D.E = 0,5 J/cm<sup>2</sup>; t =35s). Após a irradiação, as células foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 e 48 horas.

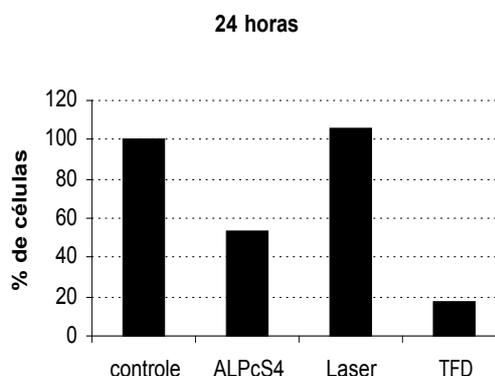
**Contagem dos protozoários após irradiação:** As células foram contadas em câmara de Neubauer 24 e 48 horas após irradiação.

## Resultados

**Contagem dos protozoários 24 horas após a incubação.**

O efeito citotóxico da terapia fotodinâmica foi investigado pelo tratamento de *T.foetus* com AIPcS<sub>4</sub>, seguido de irradiação com laser. O controle, protozoários não tratados, e aqueles que receberam somente AIPcS<sub>4</sub> ou laser e

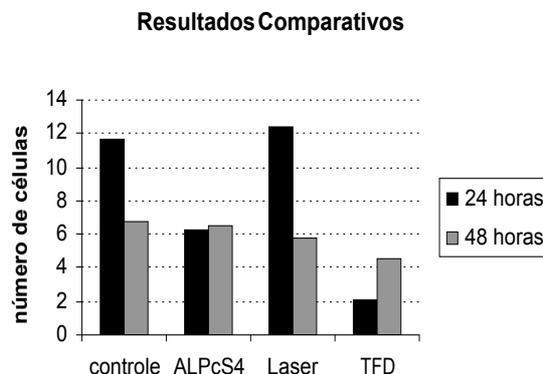
aqueles submetidos à TFD, foram contadas após 24 horas de incubação. Os resultados demonstram que houve queda no número de protozoários após administração da AIPcS<sub>4</sub> e após a TFD e aumento no número de protozoários após irradiação com o laser (gráfico 1).



**Gráfico 1:** Porcentagem de protozoários viáveis com a administração de AIPcS<sub>4</sub>, laser, TFD, após 24 horas de incubação.

**Contagem dos protozoários após 48 horas de incubação.**

O controle, protozoários não tratados, e aqueles que receberam somente AIPcS<sub>4</sub> ou laser e aqueles submetidos à TFD, foram contados após 48 horas de incubação. Os resultados demonstram que houve uma queda significativa do número de protozoários controle e daqueles irradiados com laser, um pequeno aumento no número de protozoários com AIPcS<sub>4</sub> e um aumento significativo no número de protozoários submetidos à TFD (gráfico 2).



**Gráfico 2:** Resultados comparativos do número de células (x 10<sup>6</sup>) com a administração de AIPcS<sub>4</sub>, laser, TFD, após 24 e 48 horas de incubação.

## Discussão

A ação citotóxica da terapia fotodinâmica em protozoários tem sido pouco estudada. Os resultados obtidos em nosso experimento demonstram uma acentuada diminuição do número de *T. foetus* (~ 82%) após TFD. Outros autores também relatam a ação citotóxica da TFD em protozoários.

A TFD, com o fotosensibilizador ftalocianina Pc4, inativa *Trypanosoma cruzi*, na forma tripomastigota, em culturas de células vermelhas (RBCC) e plasma sanguíneo [7].

Estudos demonstraram que *Leishmania amazonensis* transfectadas com genes que codificam enzimas catalizadoras da biossíntese do grupo heme, suplementadas com ácido delta-aminolevulínico (ALA), produzem uroporfirina I. A infecção, *in vitro*, de células tumorais monocíticas (J774) pelas *L. amazonensis* transgênicas, seguidas pela irradiação UV, resultou em lise destas células. O autor sugere o uso desses protozoários como fonte de porfirinas exógenas para terapia fotodinâmica, no tratamento de câncer e outras doenças malignas [8].

Espécies reativas de oxigênio têm um papel crucial no processo de morte celular [4].

Pesquisas demonstraram que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produz morte celular em *L. donovani*, com ativação de proteínas semelhantes às caspases e perda de volume celular [9].

Após tratamento, de culturas de *T. foetus* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> observou-se inibição da motilidade e aumento da incidência de morte celular, ambas dependentes da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sugerindo a importância do grau de estresse oxidativo para a sobrevivência da célula [10].

Em nosso experimento, observamos que após 48 horas da aplicação da TFD em *T. foetus*, houve um aumento do número destas células. Este fato pode ser explicado pelo ciclo de vida deste protozoário, que leva em torno de 4 horas. Considerando-se que 18% dos protozoários mostraram não serem afetados pela TFD após 24 horas, acredita-se que estas células dividiram-se contribuindo para o aumento de seu número. O mesmo foi observado após tratamento de *T. foetus* com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, seguido de teste imunocitoquímico, que marcou proteínas semelhantes às caspases-3, utilizando o anticorpo CM1. Após 8 horas do tratamento, houve um aumento do número de células negativas para esta marcação [10].

A incubação, no escuro, de *T. foetus* com a AIPcS<sub>4</sub>, na concentração de 10µM, resultou em diminuição do número destes protozoários (~46%). Em outro estudo, foi observado uma baixa toxicidade da AIPcS<sub>4</sub> em células HeLa e

CHO-K1 no escuro[11]. Fatores podem ter influenciado no resultado aqui obtido: o tipo celular e a forma como o fotossensibilizador liga-se à bicamada lipídica deste protozoário [12]. É necessário mais estudos sobre a toxicidade da AIPcS<sub>4</sub> em *T. foetus*, pois este fotossensibilizador pode ser usado como proposta de tratamento para a tricomoniase, com ou sem à exposição de luz.

A radiação laser pode estimular a proliferação celular e a diferenciação celular, mecanismo este dependente da densidade de energia aplicada [13]. Neste experimento, a densidade de energia usada (0,5J/cm<sup>2</sup>) apresentou um efeito bioestimulador, observado pelo aumento do número de *T. foetus* (~ 6%) em relação ao grupo-controle. Porém, um efeito bioinibidor foi observado em células CHO, após ação do laser He-Ne (632.8 nm) na região de 300 a 600 mJ/cm<sup>2</sup> [14].

## Conclusão

Os resultados sugerem que a terapia fotodinâmica é efetiva para a redução de *T. foetus*, *in vitro*. Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de elucidar os mecanismos de morte celular deste protozoários submetidos à TFD. A toxicidade e seletividade dos fotossensibilizadores e os parâmetros de laser empregados na terapia fotodinâmica aplicada em protozoários deverão também ser analisados.

## Referências

- [1] BONDURANT, R.H. Pathogenesis, diagnosis, and management of Trichomoniasis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. V. 13, n.2, 1997.
- [2] PELLEGRIN, O.A. A campilobacteriose e tricomonose são doenças emergentes? **Rev. Bras. Reprod. Anim.** V. 23, n. 4, p. 523-531, 1999.
- [3] VILLARROEL A; CARPENTER T. E; BONDURANT R.H. Development of a simulation model to evaluate the effect of vaccination against *Tritrichomonas foetus* on reproductive efficiency in beef herds. **Am. J. Vet. Res.** V. 65, n. 6, p. 770-775, 2004.
- [4] FERREIRA, S.R.M; TEDESCO, A.C; SOUSA, G.; ZÂNGARO,R.A; SILVA, N.S; PACHECO, M.T.T; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with AIPcS<sub>4</sub>. **Lasers in Medical Science**. N. 18, p. 207-212, 2004.

[5] MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**. V. 23, n. 2, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

[13] CARVALHO, D.C.L; ROSEM, G.C; GAMA, L.O.R; TAVARES, M.R; TRIBIOLI, R.A; SANTOS, I.R; CLIQUET JR, A. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev. Saúde Pública**. V. 36, n. 5, 2002.

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