



**Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas**

ALANNA RACHEL ANDRADE DOS SANTOS

**Avaliação da atividade lisossomal de células de
cérebro e fígado de gerbis (*Meriones unguiculatus*)
infectados “in vitro” com *Neospora caninum***

**Cruz das Almas
2010**

ALANNA RACHEL ANDRADE DOS SANTOS

**Avaliação da atividade lisossomal de células de
cérebro e fígado de gerbis (*Meriones unguiculatus*)
infectados “in vitro” com *Neospora caninum***

Monografia apresentada ao curso de graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por meio da disciplina Trabalho de conclusão de Curso II – CCA 335, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro

Cruz das Almas
2010

Avaliação da atividade lisossomal de células de cérebro e fígado de gerbis (*Meriones unguiculatus*) infectados “in vitro” com *Neospora caninum*

Alanna Rachel Andrade dos Santos

Monografia defendida e apresentada para a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Cruz das Almas, 14 de dezembro de 2010.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Moraes Pinheiro - UFRB

Profa. Dra. Veridiana Fernandes da Silveira

Prof. Dr. Raul Rio Ribeiro

Ficha Catalográfica

S237 Santos, Alanna Rachel Andrade dos.
Avaliação da atividade lisossomal de células de cérebro e fígado de gerbis (Meriones unguiculatus) infectados “in vitro” com Neospora caninum/ Alanna Rachel Andrade dos Santos_ Cruz das Almas - Ba, 2010.
40 f.; il.

Orientador: Alexandre Moraes Pinheiro

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.
Área de Concentração: Ciências Biológicas.

1. Protozoário - controle. 2. Parasitologia. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.
II. Título.

CDD: **579.4**

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

Bertrand Russell

Dedico este trabalho a Deus e a meus pais que me deram todo amor e apoio nesta caminhada para que eu pudesse realizar este grande sonho, sem vocês jamais chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Acima de todas as coisas, agradeço a DEUS, por permitir que eu chegasse ao fim dessa caminhada;

Aos meus pais, PAULO e EDINALVA, por me darem todo apoio, por acreditarem em mim;

À minha irmã MYLA e também à minhas irmãs de república BAGUI e BINHA pelos momentos alegres que dividimos, pelas besteiras que falamos, por me darem força nos momentos difíceis, enfim, por estarem sempre ao meu lado;

A ANY e LUNA, pelos momentos de alegria compartilhados;

A toda a MINHA FAMÍLIA, por estarem sempre torcendo por mim;

Às minhas eternas maninhas MAG e CAMILA, que apesar de toda a distância nunca deixaram nossa amizade estremecer, vocês moram no meu coração;

Ao meu namorado PABLO pela compreensão, companheirismo, carinho, por estar comigo em todos os momentos sejam, eles felizes ou não;

Ao meu orientador ALEXANDRE PINHEIRO, meus sinceros agradecimentos, por todos os ensinamentos que me transmitiu, pela paciência e boa vontade sempre, por ser tão atencioso e cuidadoso;

A minha colega de estágio LÍGIA LINS pelo companheirismo e por todo apoio e ajuda;

À professora e amiga ALESSANDRA CAIAFA por tudo que aprendi nas suas aulas e na época de monitoria, por estar sempre por perto nos apoiando e dedicando sua amizade;

Ao professor ROGÉRIO RIBAS, por todo conhecimento que me transmitiu nas aulas e na monitoria, apesar de não parecer... você é uma grande pessoa com um coração maior ainda;

Ao professor MARCOS LHANO pela orientação no primeiro projeto de pesquisa, por estar sempre tranquilo e de bom humor;

Ao professor FABIANO MARTINS por estar sempre apoiando e torcendo pela nossa formatura, sentirei saudades de seus esporros;

À professora MEYBE pela ajuda na estatística;

Às COLEGAS DE FACULDADE que conseguiram, juntamente comigo, ultrapassar todas as dificuldades até alcançar esse objetivo;

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA pela formação acadêmica;

À FUNDAÇÃO BAHIANA PARA O DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS que cedeu seu laboratório para a realização dos experimentos;

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA por disponibilizarem os animais de experimentação;

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Érico Veríssimo

RESUMO

Neospora caninum é um protozoário coccídeo agente causador da neosporose, uma parasitose de ocorrência mundial caracterizada por causar abortamento e alterações neonatais. Este parasito apresenta bovinos, caprinos e bubalinos como seus hospedeiros intermediários, enquanto cães e coiotes são descritos como seus hospedeiros definitivos. Considerando que *N. caninum* é um parasito intracelular obrigatório acredita-se que a infecção por este protozoário possa interferir na atividade das organelas das células infectadas, dentre essas organelas destacam-se os lisossomos, centro de degradação primária da célula. Devido a isso, o presente trabalho objetiva analisar o nível de enzimas catalíticas, as fosfatases ácidas, presentes no interior dos lisossomos do cérebro e fígado de 20 gerbis (*Meriones Unguiculatus*), sendo 10 infectados experimentalmente e 10 controles. Os animais foram infectados por via subcutânea com 5×10^5 taquizoítos da cepa NC-Bahia e eutanasiados por deslocamento cervical. A fração lisossomial foi obtida por meio de centrifugações fracionadas e refrigeradas. As fosfatases ácidas presentes no interior dos lisossomos de cérebro e fígado dos gerbis foram dosadas com o uso de kit comercial. Os animais controles apresentaram para cérebro uma atividade de fosfatase ácida de $34,3 \pm 5,7$ UI/mL; enquanto os animais infectados apresentaram taxas de $26,9 \pm 3,7$ UI/mL. Já a média da atividade fosfatásica ácida das células de fígado para os animais controles foi de $28,3 \pm 2,5$ UI/g de proteínas totais/mL e de $8,7 \pm 6,8$ UI/ μ g de proteínas totais/mL para os animais infectados. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a maior estabilidade lisossômica encontrada no grupo infectado, provavelmente corresponde a um mecanismo de defesa do parasito ao ataque das enzimas hidrolíticas ácidas contidas nos lisossomos primários.

Palavras-chave: Infecção, Neosporose, Protozoário.

ABSTRACT

Neospora caninum is a coccidial protozoan that cause agent of neosporosis, a disease of worldwide occurrence characterized by causing abortion and neonatal alterations. This parasite has cattle, goats and buffaloes as intermediate hosts, while dogs and coyotes are definitive hosts. Whereas *N. caninum* is an obligate intracellular parasite is believed that infection with this parasite can interfere with the activity of the celular organelles, these organelles among the highlights are the lysosomes, the center of primary degradation of the cell. The aim of this work was analyze the level of catalytic enzymes, Monoester-Ortofosforica fosfohidrolase – EC 3.1.3.2, present in lysosomes of the brain and liver of 20 gerbils (*Meriones Unguiculatus*), 10 were experimentally infected and 10 controls. Animals were infected subcutaneously with 5×10^5 tachyzoites of NC-Bahia strain and after three days were euthanized. Lysosomal fraction was obtained by fractionated centrifuge. The acid phosphatase present in the lysosomes of brain and liver of gerbils was measured using a commercial kit. Control animals had an activity of brain for acid phosphatase 34.3 ± 5.7 IU/ μ g total protein/mL, while the infected animals was of 26.9 ± 3.7 IU/ μ g total protein/mL. Since the average acid phosphatase activity of liver cells to the control animals was 28.3 ± 2.5 IU/ μ g total protein/mL and 8.7 ± 6.8 IU/ μ g total protein/mL in the infected animals. Based on these results, we can conclude that the lysosomal stability found in the infected group, probably represents a defense mechanism of the parasite against acidic hydrolytic enzymes contained in lysosomes primary.

Keywords: infection, neosporosis, Protozoan.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ELISA	Reação imunoenzimática
g	Gramas
xg	Força Gravitacional
IgG	Imunoglobulina classe G
LMPS	Proteínas integrais da membrana lisossomal
LROs	Organelas relacionadas aos lisossomos
M	Molar
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
min	Minutos
mL	Mililitros
<i>p</i>	Nível de significância
PCR	Reação de polimerização em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPM	Rotação por minuto
SNC	Sistema nervoso central
UI	Unidades internacionais
°C	Graus em escala celsius
µm	Micrômetros
µg	Microgramas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Comparação da espessura das paredes de cistos teciduais de *N. caninum* (A-C) com cistos teciduais de *T. gondii* (D). Ambos em cérebros de roedores Pág. 18
- Figura 2 - Ciclo de vida do *N. caninum* Pág. 20
- Figura 3 - Etapas da formação e atuação dos lisossomos Pág. 27
- Figura 4 - Esquema representativo da separação da fração rica em lisossomos Pág. 31
- Figura 5- Atividade lisossômial de células hepáticas de gerbis controle e infectados *in vitro* com *N. caninum* Pág. 34
- Figura 6 - Atividade lisossômial de células de cérebro de gerbis controle e infectados *in vitro* com *N. caninum* Pág. 34

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. AGENTE ETIOLÓGICO.....	15
2.2. CICLO BIOLÓGICO DE <i>N. CANINUM</i>	18
2.3. TRANSMISSÃO.....	20
2.4 NEOSPOROSE EM BOVINOS	21
2.5 NEOSPOROSE EM CANÍDEOS.....	22
2.6 DIAGNÓSTICO.....	23
2.7 COMPARTIMENTOS LISSOSSOMAIS	24
2.8 FOSFATASES ÁCIDAS	27
2.9 ATIVIDADE LISSOSSOMIAL EM DOENÇAS PARASITÁRIAS	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 ANIMAIS	30
4.2 CULTIVO CELULAR	30
4.3 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E INFECÇÃO DOS GERBIS	30
4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE LISSOSSOMIAL	31
4.4.1 Obtenção da fração lisossomial	31

4.4.2 Dosagem da atividade lisossomial	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS	35

1. INTRODUÇÃO

Neospora caninum é um protozoário intracelular obrigatório causador da neosporose, doença que foi identificada há aproximadamente duas décadas. Este parasito, que afeta principalmente bovinos e caninos, tem sido identificado desde sua primeira observação, isolamento e caracterização em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (BJERKÁS *et al.*, 1984; DUBEY, 1988; GONDIM *et al.*, 1999).

Em bovinos, a neosporose caracteriza-se por ser uma importante causadora de abortamento e alterações neonatais, sendo considerada uma das principais causas desta patologia nesta espécie (DUBEY, 1999). Os cães e coiotes são identificados como hospedeiros definitivos, entretanto, podem apresentar alterações neuromusculares caracterizadas por uma paralisia ascendente, com os membros posteriores geralmente mais afetados (DUBEY, 2003; GONDIM, 2004; DEVENS e VILORIA, 2008).

Apesar do potencial zoonótico da neosporose, não existem evidências suficientes de que *N. caninum* seja um agente patológico em seres humanos. Embora já tenha ocorrido a detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* no homem, supõe-se que este seja resistente, entretanto, em casos de imunodepressão, a vulnerabilidade tende a ser aumentada (ANDREOTTI, 2001; INNES *et al.*, 2001).

Esse parasito apresenta multiplicação assexuada no interior das células do hospedeiro intermediário. Desta forma, a interação existente entre parasito - hospedeiro pode interferir na atividade da célula e das suas organelas. Entre essas organelas destacam-se os lisossomos que constituem os compartimentos de degradação primária da célula, podendo estar relacionados com processos de endocitose, fagocitose, apoptose ou autofagia (SAFTIG e KLUMPERMAN, 2009).

Essas organelas possuem aproximadamente, em seu interior, 50 hidrolases, cada uma com um substrato específico para degradação, a exemplo de lipases, nucleases, fosfatases, entre outras enzimas que para se manterem funcionais necessitam de um pH ácido que é fornecido pelos lisossomos (SAFTIG e KLUMPERMAN, 2009).

Desta forma, por meio deste estudo, buscou-se verificar a estabilidade das membranas dos lisossomos de fígado e cérebro de gerbils infectados experimentalmente por *N. caninum*. Essa análise poderá contribuir para uma maior compreensão da fisiopatologia da neosporose e

assim, futuramente, para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas que poderão minimizar os prejuízos causados por esta enfermidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Neospora caninum é um protozoário que foi descrito por Dubey *et al.* em 1988a. Neste mesmo ano, Dubey *et al.* (1988b) ao estudar cortes histológicos de cães com suspeita de toxoplasmose conseguiram isolar e classificar este protozoário como um parasito pertencente a um novo gênero e espécie, com as seguintes características taxonômicas: filo: Apicomplexa, classe: Sporozoasida, sub-classe: Coccidiasina, ordem: Eucoccidiorida, família: Sarcocystidae, sub-família: Toxoplasmatinae, gênero: Neospora, espécie: *Neospora caninum* (DEVENS e VILORIA, 2008).

O Filo Apicomplexa consiste em um grupo diversificado de protozoários parasitos que são chamados assim por possuir em seus estádios móveis um complexo apical anterior que se fixa ou penetra a célula hospedeira. Este complexo é geralmente constituído por organelas especializadas como: anéis polares, roptrias, micronemas, conóides e microtúbulos dispostos sobre a membrana celular (TORTORA *et al.*, 2005; RUPPERT *et al.*, 2005; MONTEIRO, 2006).

Neste filo, os indivíduos da classe Sporozoasida e sub-classe Coccidiasina são os mais numerosos. Esses organismos caracterizam-se pela produção de oocistos, que darão origem a formas infectantes chamadas esporozoítos, e por serem parasitos intracelulares homo ou heteroxenos (RUPPERT *et al.*, 2005; MONTEIRO, 2006).

A Família Sarcocystidae contém cerca de 200 espécies de coccídios heteroxenos, estes formam cistos teciduais em seus hospedeiros intermediários. Essa família é dividida em duas sub-famílias: Sarcocystinae e Toxoplasmatinae (MONTEIRO, 2006).

A sub-família Toxoplasmatinae possui apenas quatro gêneros, que totalizam 11 espécies distintas. Dentre essas espécies está o *Neospora caninum* que apresenta o cão (*Canis*

familiaris) e o coioote (*Canis latrans*) como hospedeiros definitivos (McALLISTER *et al.*, 1998; MONTEIRO, 2006).

Entretanto, os coiotes foram sugeridos como hospedeiros definitivos apenas em 2004 por Gondim *et al.* depois da realização de experimentos em que oocistos do parasita foram detectados em fezes de filhotes dessa espécie, após serem alimentados com tecidos de bovinos infectados. Acredita-se ainda que outros canídeos silvestres também possam ser considerados hospedeiros definitivos deste protozoário, eliminando oocistos deste parasito.

Os hospedeiros intermediários descritos para este parasito são os bovinos, caprinos, bubalinos, ovinos, equinos, camelos, dentre outras espécies, sendo os bovinos considerados os mais importantes hospedeiros intermediários parasitados por este protozoário, uma vez que esta espécie é alvo de grandes prejuízos reprodutivos causados pela neosporose (McALLISTER *et al.*, 1998; DUBEY, 1999; DUBEY, 2003).

N. caninum foi observado pela primeira vez por Bjerkås *et al.* (1984) em uma ninhada de labradores com encefalomielite na Noruega. Estes pesquisadores relataram a presença de um parasito fenotípicamente semelhante ao *Toxoplasma gondii*, porém, devido ao fato dos citados parasitos apresentarem diferenças ultra-estruturais e antigênicas, os animais infectados não possuíam anticorpos para este protozoário (DUBEY *et al.*, 1988).

Segundo Dubey *et al.* (2002), algumas características principais podem ser consideradas na distinção entre *N. caninum* e *T. gondii*:

- *N. caninum* possui os cães como hospedeiros definitivos e a neosporose é uma das principais doenças em bovinos. Enquanto o *T. gondii* possui os gatos como hospedeiros definitivos e a toxoplasmose é uma das principais doenças que acomete ovelhas;

- Apresentam sinais clínicos diferentes, pois a neosporose induz principalmente paralisia dos membros posteriores em cães, o que não acontece com frequência na toxoplasmose clínica canina;

- Os cistos teciduais produzidos pelo *N. caninum* apresentam, geralmente, paredes mais espessas, com até 4 µm, enquanto os de *T. gondii* possuem uma parede delgada, que não pode ser medida com precisão ao microscópio de luz independente da duração da infecção (Figura 1);

- *N. caninum* possui antígenos genética e imunologicamente distintos dos de *T. gondii*;

- Os parasitos em questão utilizam diferentes receptores de adesão para invadir as células hospedeiras (DUBEY *et al.*, 2002).

Morfologicamente, os taquizoítos de *N. caninum* apresentam entre seis e 16 roptrias, dois anéis apicais e um anel polar, podendo ter formato ovóide, de meia lua ou globular com dimensões de 3,0 a 7,0 μm de comprimento por 1,0 a 5,0 μm de largura, de acordo com o estágio de divisão (SPEER e DUBEY, 1989; DUBEY *et al.*, 2002; GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006).

Multiplicam-se por endodiogenia na fase assexuada, sendo encontrados em células do sistema nervoso, miócitos, macrófagos, células do endotélio vascular, células do epitélio dos túbulos renais, fibroblastos e hepatócitos dos animais infectados (HEMPHILL *et al.*, 1996).

Os taquizoítos penetram ativamente nas células hospedeiras em aproximadamente cinco minutos após o contato, multiplicando-se no citoplasma em vacúolos parasitóforos. Esses vacúolos são formados a partir da membrana plasmática do hospedeiro, desta forma, desencadeiam o rompimento da célula e levam a lesões nos tecidos (HEMPHILL *et al.*, 1996; BUXTON *et al.*, 2002).

Os bradizoítos de *N. caninum* são delgados e alongados com um núcleo subterminal, medindo de 6,0 a 8,0 μm de comprimento por 1,0 a 2,0 μm de largura. Estas estruturas secretam proteínas que formam espessos cistos teciduais, desta forma são capazes de impedir a ativação do sistema imunológico do hospedeiro, além de atuar como fonte de infecção para predadores, no caso de carnivorismo (McALLISTER *et al.*, 1998; DUBEY, 2002; MINEO, 2007).

Os cistos têm sido encontrados em células do sistema nervoso, como cérebro, nervos, medula espinhal e retina; além de músculo esquelético. São arredondados ou elípticos e podem ter até 107 μm de diâmetro, sua parede é lisa e bem espessa, medindo até quatro micra de espessura, dependendo do tempo de infecção (GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006).

Outra forma infectante do *N. caninum* é o oocisto. Esses, não esporulados, medem de 10 a 11 μm de diâmetro. São formados pela replicação sexuada do agente no trato gastrintestinal dos seus hospedeiros definitivos, os quais são responsáveis pela contaminação ambiental e subsequente dispersão do agente (McALLISTER *et al.*, 1998; MINEO, 2007).

A parede dos oocistos é incolor e mede entre 0,6 e 0,8 μm de espessura. Quando esporulado, cada oocisto apresenta dois esporocistos que possuem de 6,1 a 8,4 μm de

comprimento por, aproximadamente, 1,37 μm de largura. Cada esporocisto possui quatro esporozoítos em seu interior, estes são alongados e medem entre 2,0 e 6,5 μm (DUBEY, 2002).

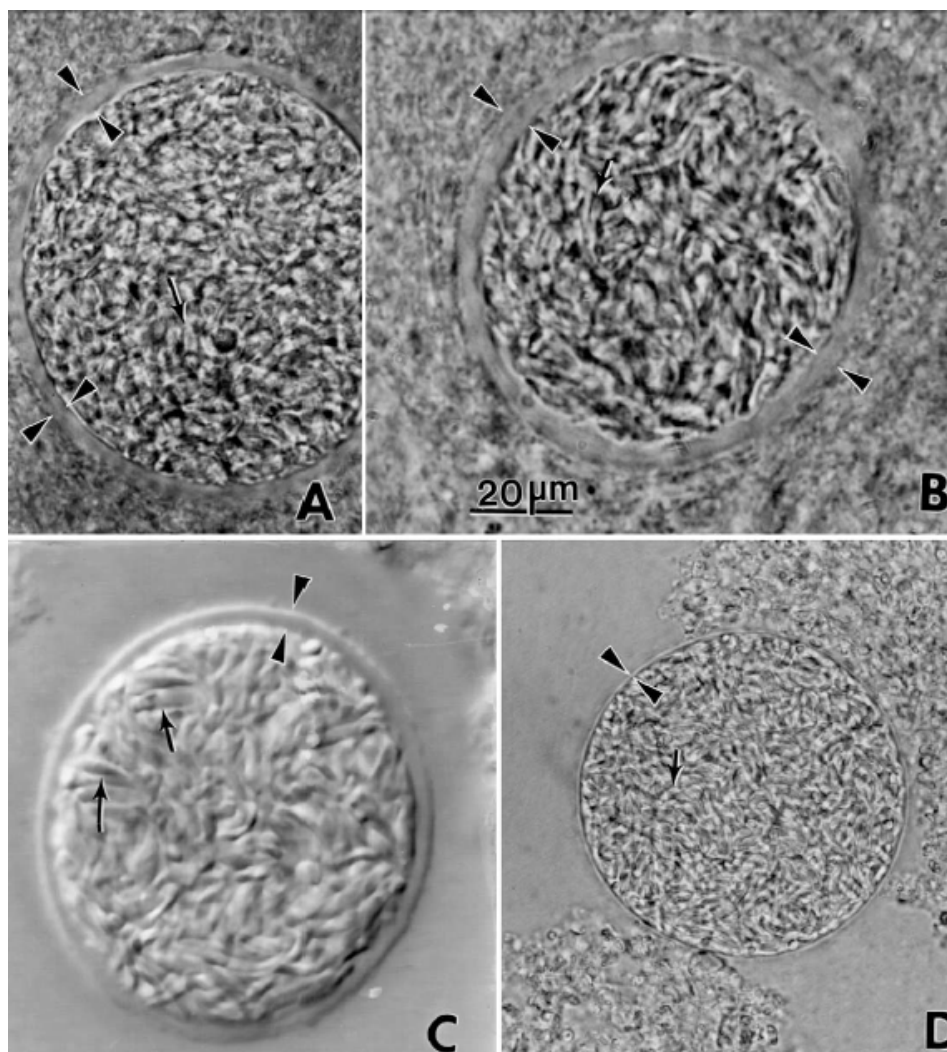


Figura 1 – Comparação da espessura das paredes de cistos teciduais de *N. caninum* (A-C) com cistos teciduais de *T. gondii* (D). Ambos em cérebros de roedores (DUBEY *et al.*, 2002).

2.2 CICLO BIOLÓGICO DE *N. CANINUM*

O ciclo biológico de *N. caninum* (Figura 2) foi descrito por McAllister *et al.* em 1998, se trata de um ciclo de vida heteroxeno, possuindo replicação sexuada e assexuada em hospedeiros definitivos e intermediários, respectivamente.

A replicação assexuada pode ocorrer em todos os animais homeotérmicos, enquanto a reprodução sexuada ocorre somente nos canídeos (GONDIM *et al.*, 2004), que também podem se comportar como hospedeiros intermediários do parasito (DUBEY, 2003).

Este ciclo apresenta três formas de vida infectantes: os taquizoítos, forma de multiplicação rápida presente na infecção ativa; os bradizoítos, forma de latência do parasito, possuem multiplicação lenta; e os esporozoítos. Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios encontrados no hospedeiro intermediário. Os esporozoítos são eliminados nas fezes pelo hospedeiro definitivo em forma de oocistos. Esses oocistos possuem dois esporocistos cada, que após esporulados formam quatro esporozoítos cada um (VOGEL *et al.*, 2006).

O hospedeiro intermediário ingere alimento e/ou água contaminados com oocistos esporulados, que sofrem digestão química e enzimática após passagem pelo estômago e duodeno, respectivamente, liberando os taquizoítos para a luz do intestino. Esses taquizoítos se dividem rapidamente por endodiogenia, e podem penetrar em células de diversos tecidos do hospedeiro, como macrófagos, neurônios, fibroblastos, entre outras; e causar severas lesões em diferentes órgãos (DUBEY *et al.*, 1999).

Quando o hospedeiro é capaz de ativar uma resposta imunológica eficiente, este parasito passa a alternar a expressão de genes específicos que desencadeiam uma cascata de eventos como a migração preferencial para o SNC, músculo esquelético ou retina, onde há a conversão em bradizoítos e a formação de cistos teciduais (SHIBAHARA *et al.*, 1999; BUXTON *et al.*, 2002).

O ciclo intestinal, que compreende a fase sexuada da evolução do *N. caninum*, inicia-se com uma fase assexuada de multiplicação dos bradizoítos nas células epiteliais do intestino do hospedeiro definitivo. Ocorre a multiplicação por endodiogenia e, logo, inicia-se o ciclo sexuado, com a formação de micro e macrogametas, após a fecundação dos macrogametas, formam-se os oocistos que serão eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos para iniciar um novo ciclo (SHIBAHARA *et al.*, 1999).

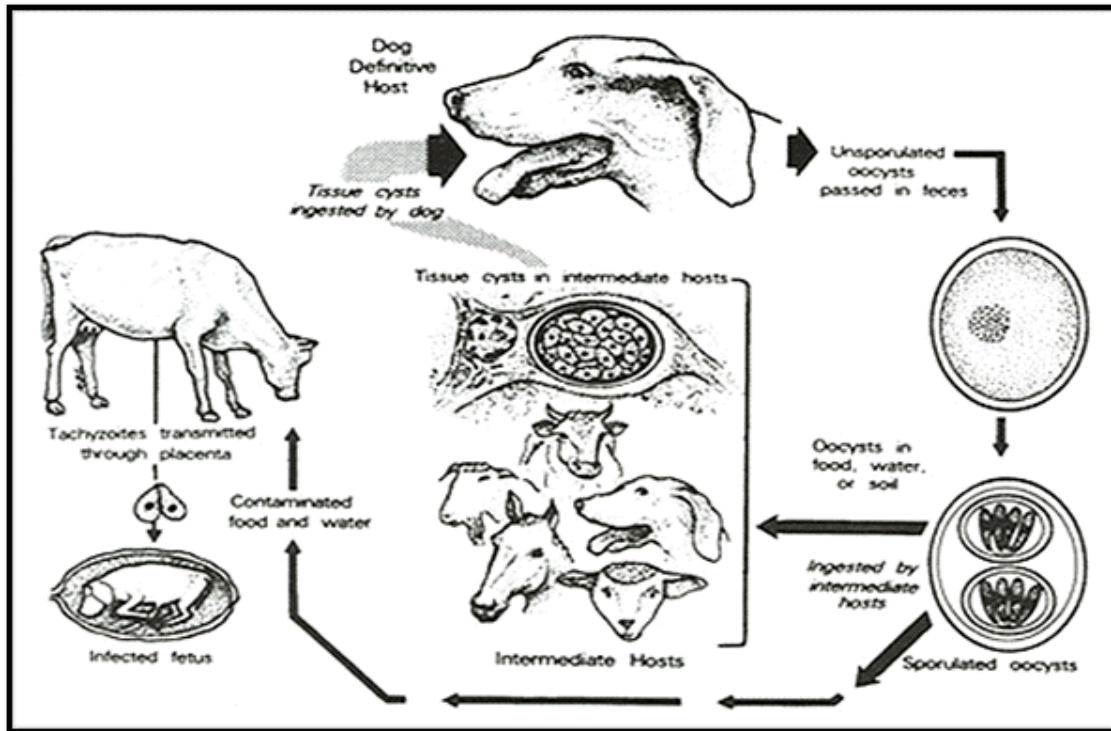


Figura 2 – Ciclo de vida do *N. caninum* (DUBEY, 2003).

2.3 TRANSMISSÃO

A transmissão da neosporose pode ser vertical (transplacentária) ou horizontal (pós-natal). A transmissão horizontal apresenta-se como uma adaptação evolutiva de *N. caninum*. Ocorre pela ingestão de oocistos esporulados ou cistos teciduais presentes em água ou alimentos contaminados (DUBEY *et al.*, 1999).

A transmissão vertical ocorre por via transplacentária e constitui uma alternativa para a manutenção do parasito nas populações animais já infectadas, sendo a principal maneira de disseminação da neosporose em bovinos. Vários trabalhos demonstraram que, nesta espécie, a transmissão transplacentária do parasito é eficaz nos animais infectados naturalmente, oscilando entre 48 a 95% das infecções que ocorrem. Além disso, a doença pode ser transmitida desta maneira por várias gerações (DUBEY *et al.*, 1999; TREES e WILLIAMS, 2005; MOTA *et al.*, 2008).

Existem duas modalidades de infecção vertical, quando a fêmea prenhe se contamina com o oocisto, desta forma há a passagem de taquizoítos pela placenta, deixando o feto exposto ao parasito. A outra maneira é através da reativação de uma infecção latente, que ocorre devido a fatores como a diminuição da imunidade do animal e que, da mesma maneira, exporá o feto aos taquizoítos do protozoário (INNES *et al.*, 2001).

2.4 NEOSPOROSE EM BOVINOS

Anticorpos anti-*N. caninum* têm sido encontrados em rebanhos leiteiros e de corte em todo o mundo, independente do clima e da região geográfica. Em animais adultos o abortamento constitui o sinal clínico reprodutivo mais evidente e ocorre geralmente no quinto ou sexto mês de gestação (DUBEY, 2003).

Estudos mostram que este protozoário é considerado causa de aborto em bovinos em diversos países como Taiwan, República da Coreia, Vietnã, Turquia, Estados Unidos, Grã-Bretanha e Nova Zelândia (COSTA *et al.*, 2001).

Entretanto, essa patologia também pode causar lesões inflamatórias e degenerativas nos fetos de bovinos. Estas lesões ocorrem em vários tecidos, porém os mais comumente acometidos são SNC, coração, fígado e músculo esquelético. Como consequência, o feto pode morrer no útero, ser mumificado, autolisado, reabsorvido ou apresentar alterações neonatais (ANDERSON *et al.*, 1991; DUBEY, 2003).

Caso nenhuma dessas opções aconteça, o bezerro nasce infectado. Porém, a grande maioria dos animais infectados não apresenta sinais clínicos, apesar de ter a infecção latente e abrigar o parasito encistado em vários tecidos. Desta forma, esses animais possuem importante papel epidemiológico na manutenção da doença em um rebanho em diferentes regiões, pois transmitem a neosporose para os seus descendentes (DUBEY, 2003).

Devido às perdas reprodutivas que causa, a neosporose possui uma grande importância econômica, uma vez que provoca diminuição na produção de leite, descarte prematuro de animais soropositivos, nascimento de bezerros fracos e inviáveis, problemas com o retorno ao cio das vacas, além de aborto (DUBEY e LINDSAY, 1996).

Na Califórnia (EUA), os prejuízos causados por este protozoário na indústria leiteira foram estimados em torno de 35 milhões de dólares por ano. No Brasil existem relatos de animais soropositivos em rebanhos leiteiros e de corte em vários estados como Bahia, Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul entre outros (ANDREOTTI, 2001; INNES *et al.*, 2001).

2.5 NEOSPOROSE EM CANÍDEOS

Os casos mais graves da neosporose acontecem em cães jovens infectados pela via transplacentária, esses animais apresentam como sintomatologia clínica alterações neuromusculares severas como: paralisia ascendente, com os membros posteriores geralmente mais afetados, dificuldade de deglutição, paralisia da mandíbula, cegueira, convulsões, incontinência urinária e fecal, flacidez e atrofia muscular, além de falha cardíaca (DEVENS e VILORIA, 2008).

Em animais adultos os sintomas são mais variados, acredita-se que a doença seja desencadeada em função da reativação de uma infecção anterior, associada com imunossupressão. Nestes casos, além do quadro neuromuscular, podem ocorrer dermatite piogranulomatosa, miocardite fatal e pneumonia. Os cães podem sobreviver durante meses com esses sintomas, precisando ser, muitas vezes, eutanasiados (DEVENS e VILORIA, 2008).

O parasito pode ser encontrado em vários órgãos durante a fase aguda, entretanto, restringe-se ao SNC na fase crônica. Apesar de predisposição a sexo e raça não serem conhecidos, a maioria dos casos descritos tem ocorrido com cães das raças Labrador, Boxer, Greyhound e Golden Retrievers (GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006).

Casos de neosporose em cães têm sido relatados na América do Norte, Europa, África do Sul, Japão, Austrália e Costa Rica (BENETTI *et al.*, 2008). No Brasil, estudos observaram uma alta prevalência de cães soropositivos para *N. caninum* em diversos estados, dentre eles a Amazônia, Minas Gerais, Maranhão, São Paulo e na Bahia, onde foi isolada pela primeira vez a cepa NC-Ba de cérebro de cães naturalmente infectados (GONDIM *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2006).

Esses estudos apontam que alguns fatores com papel importante na epidemiologia do *N. caninum* como o tipo de alimentação, o ambiente no qual o animal vive, o acesso às ruas, a idade dos cães, dentre outros, são fundamentais para o estudo da doença (GENNARI *et al.*, 2002; CAÑÓN-FRANCO *et al.*, 2003; FERNANDES *et al.*, 2004; BENETTI *et al.*, 2008).

2.6 DIAGNÓSTICO

Desde a descoberta do *N. caninum* e de seu isolamento, uma série de possibilidades diagnósticas vêm sendo descritas, o primeiro teste para a identificação de anticorpos IgG anti-*N. caninum* foi a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (DUBEY *et al.*, 1988b; MOTA *et al.*, 2008).

Esta reação é considerada inespecífica para taquizoítos, visto que há a possibilidade de acontecer reações cruzadas com protozoários da mesma família (MOTA *et al.*, 2008). Contudo, a RIFI destaca-se entre as demais análises sorológicas no diagnóstico da neosporose, uma vez que anticorpos de superfície são considerados os mais específicos para o filo Apicomplexa.

Apesar das diversas discussões existentes, estudos sugerem para esta reação que títulos de 200 é um ponto de corte apropriado para a detecção de *N. caninum* em bovinos através dessa técnica, entretanto, em casos de abortamento recomenda-se títulos maiores (DUBEY *et al.*; 1996; GUIMARÃES JUNIOR e ROMANELLI, 2006; MOTA *et al.*, 2008).

A falta de manifestações clínicas em bovinos cronicamente infectados juntamente com o escasso número de parasitos encontrados nos fetos abortados dificulta consideravelmente o diagnóstico clínico da neosporose bovina. Desta forma, outros exames sorológicos como imunoadsorção enzimática (ELISA), dot-ELISA e soroaglutinação, tornaram-se também ferramentas úteis na detecção de anticorpos específicos frente à infecção por *N. caninum* (COSTA *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2005).

Em função da dificuldade de isolamento deste agente, foram desenvolvidas outras técnicas para diagnosticar este protozoário, além dos exames sorológicos, como o teste imunistoquímico desenvolvido por Lindsay e Dubey (1989). Esse teste facilitou o diagnóstico do parasito e sua diferenciação de outros gêneros a partir de lesões típicas da neosporose.

Outra prova realizada é a reação de polimerização em cadeia (PCR), técnica que amplifica o material genômico do parasito, mesmo que este se encontre em pequenas quantidades, resultando em um diagnóstico bastante sensível e específico (MOTA *et al.*, 2008).

2.7 COMPARTIMENTOS LISSOSSOMAIS

O termo lisossomo vem do grego (*lise* = quebra, *soma* = corpo) e se refere a pequenas bolsas repletas de enzimas digestivas revestidas por uma membrana lipoprotéica. Foi isolado pela primeira vez pelo pesquisador belga Christian de Duve em 1955 ao estudar a organização estrutural e funcional da célula (SOARES, 1997; AMABIS e MARTHO, 1998).

Estas organelas estão presentes no citoplasma da maioria das células eucarióticas e representam o maior componente do sistema vacuolar citoplasmático, ao lado do complexo de golgi e dos retículos endoplasmáticos (ADAMEK, 2001).

Os lisossomos são originados no complexo de golgi, entretanto, suas enzimas são produzidas no retículo endoplasmático rugoso. Estas, depois de sintetizadas, migram para os dictiossomos e em seguida para outra região específica do complexo de golgi onde são envolvidas pela membrana lipoprotéica e liberadas no citoplasma como lisossomos primários (Figura 3) (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991; SOARES, 1997; AMABIS e MARTHO, 1998).

Os lisossomos primários constituem os compartimentos de degradação primária da célula. Essa organelas podem estar relacionados com processos de endocitose, digestão de substâncias internalizadas pela célula; apoptose, morte celular programada; ou autofagia, digestão de organelas celulares debilitadas (SAFTIG e KLUMPERMAN, 2009).

Quando um material extracelular que está sendo internalizado por endocitose ou pinocitose forma-se o vacúolo alimentar ou fagossomo. Um ou mais lisossomos se fundem a esta vesícula, formando o lisossomo secundário e liberando para o interior deste, suas enzimas digestivas (Figura 3) (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991).

Desta forma, o material proveniente de fora da célula é degradado em aminoácidos, ácidos graxos, álcool, monossacarídeos, entre outras moléculas. Todas essas biomoléculas atravessam a membrana lipoprotéica em direção ao citoplasma onde serão reaproveitadas. Os resíduos desse processo digestivo permanecem no vacúolo, que passa a ser chamado vacúolo residual (Figura 3) (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991; SOARES, 1997; AMABIS e MARTHO, 1998).

Os lisossomos são responsáveis também pela digestão de componentes intracelulares que estão danificados, por meio de um processo de renovação dos componentes da célula, a

autofagia. Em situações em que o organismo se encontra privado de alimento e suas reservas já se esgotaram, a autofagia figura como uma estratégia de sobrevivência (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991; SOARES, 1997; AMABIS e MARTHO, 1998).

Duas classes de proteínas são essenciais para o funcionamento dos lisossomos: hidrolases lisossômicas solúveis e proteínas integrais da membrana lisossomial (LMPS). São conhecidas, aproximadamente, 50 hidrolases lisossômicas, cada uma com um substrato específico para degradação. Além da função específica, essas hidrolases podem agir de forma coletiva, sendo desta forma, responsáveis por atividades como: processamento do antígeno, a degradação da matriz extracelular e início da apoptose (SAFTIG e KLUMPERMAN, 2009).

As LMPS residem principalmente na membrana que delimita os lisossomos e tem diversas funções, incluindo acidificação do lúmen lisossomial, importação de proteínas provenientes do citosol, fusão de membranas e transporte de produtos degradados para o citoplasma (SAFTIG e KLUMPERMAN, 2009).

A função catabólica dos lisossomos é complementada pelas organelas relacionadas aos lisossomos (LROs), que são os melanossomos, grânulos líticos, complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II e grânulos densos. Ambos estão envolvidos em vários processos fisiológicos como: homeostase do colesterol, reparação da membrana plasmática, remodelação de ossos e tecidos, defesa contra patógenos, morte celular e sinalização celular. Entretanto os LROs estão relacionados com reconhecimento específico célula-célula e podem necessitar da ativação de outros mecanismos celulares específicos (SAFTIG E KLUMPERMAN, 2009).

Inicialmente, a literatura científica mencionava os lisossomos apenas como importantes organelas envolvidas na morte celular autofágica e necrótica. Entretanto, estudos científicos têm comprovado um importante papel desempenhado pelos lisossomos também no processo de morte celular programada (SMITH, 2006).

O rompimento ou permeabilização da membrana lisossomial, mesmo que parcial, acarreta a liberação de enzimas proteolíticas para o citoplasma, esse processo tem uma ativa contribuição para a iniciação e execução do programa apoptótico. Acredita-se que a determinação do tipo de morte celular está diretamente relacionada com a permeabilidade das membranas lisossomais e, conseqüentemente, com a quantidade de enzimas proteolíticas lançadas para o citosol (SMITH, 2006).

Se os lisossomos se rompem completamente, será liberada uma alta concentração de 26 enzimas lisossomais, o que implicará em um processo necrótico. Porém, se as membranas se tornarem parcialmente permeáveis a estas enzimas, uma menor quantidade será liberada para o citoplasma, o que pode levar a apoptose (SMITH, 2006).

A ação dos lisossomos pode ser observada no desenvolvimento de alguns animais, como por exemplo, na metamorfose do girino para o sapo. Durante esse processo, a cauda do girino regride simultaneamente ao crescimento das patas, devido ao rompimento das membranas lisossomais e liberação das enzimas hidrolíticas. Desta maneira, as células são autodigeridas e a cauda do animal é perdida. O material produzido por essa autodestruição é reaproveitado em outras partes do corpo (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991).

Estudos revelam o envolvimento do rompimento da membrana dos lisossomos com a ocorrência de algumas doenças, as lisossomopatias, como a silicose, que é uma doença pulmonar causada pela inalação do pó de sílica presente no amianto. Os cristais de sílica ao se acumular nos pulmões são internalizados pelas células dos alvéolos, porém os lisossomos são incapazes de digerir-las. Desta forma as partículas silicosas se acumulam no interior dos lisossomos causando o seu rompimento e conseqüente derramamento de enzimas, levando à destruição das células pulmonares característica da silicose (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991; AMABIS e MARTHO, 1998).

Existem ainda doenças causadas pela ausência genética de enzimas lisossomiais, a falta dessas enzimas acarreta o acúmulo de substâncias não digeridas no interior dos lisossomos, o que interfere no seu metabolismo. Um exemplo desse tipo de distúrbio é a doença de Tay-Sachs, decorrente da deficiência da hexosaminidase A, essa patologia se manifesta principalmente nas células cerebrais de recém-nascidos de 3 a 4 meses e geralmente leva a uma regressão psicomotora e, posteriormente, à morte (SILVA JUNIOR e SASSON, 1991; AMABIS e MARTHO, 1998; SILVA e VALENÇA, 2003).

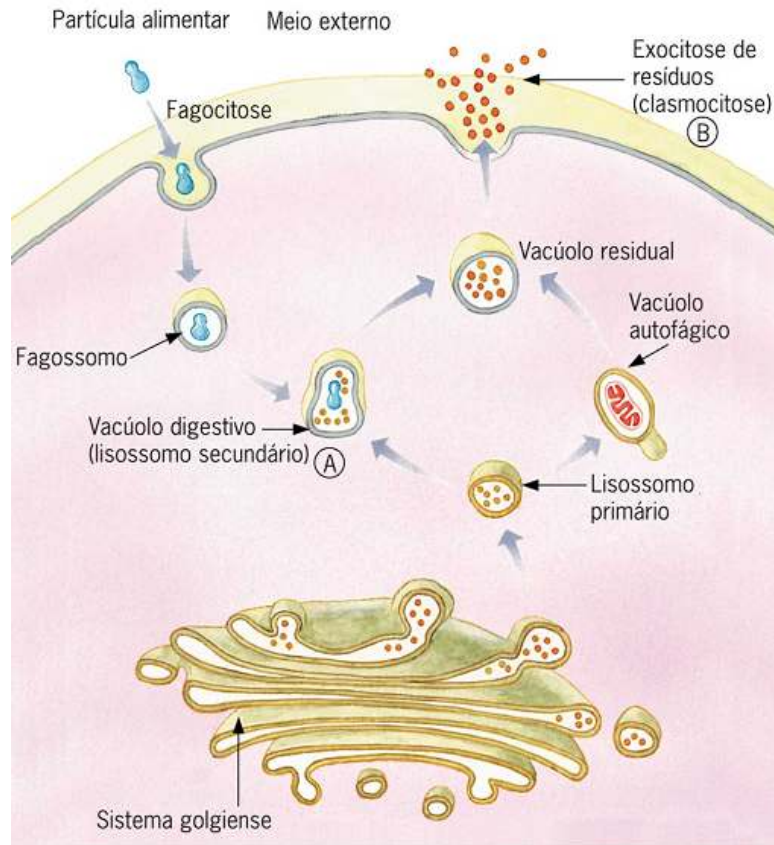


Figura 3 – Etapas da formação e atuação dos lisossomos.

2.8 FOSFATASES ÁCIDAS

Fosfatases ácidas (Monoester-Ortofosforica fosfohidrolase – EC 3.1.3.2) são hidrolases que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em animais, microorganismos e vegetais. Caracterizam-se por atuar em baixos valores de pH removendo grupos fosfatos de ésteres orgânicos (FERREIRA, 1999, GRANJEIRO, 2001).

As fosfatases ácidas foram observadas pela primeira vez em eritrócitos e diferem das fosfatases alcalinas por, entre outros motivos, apresentarem um pH ótimo para catálise em torno de 5,0, enquanto que as outras apresentam o pH ótimo ao redor de 9,0 (FERREIRA, 1999, GRANJEIRO, 2001).

Em animais, as fosfatases ácidas podem ocorrer em variados tecidos e órgãos como: placenta, testículos, próstata, cérebro, fígado, coração, baço, ossos, nervos e ainda em secreções, a exemplo da saliva, leite e do sêmem (FERREIRA, 1999; GONÇALVES, 2000).

Na célula, estudos citoquímicos revelaram, uma ampla distribuição das fosfatases ácidas em locais como: complexo de golgi, membranas, núcleo, lisossomos, mitocôndrias e

retículo endoplasmático. Estas enzimas ainda podem ser encontradas no sangue, além dos eritrócitos, em leucócitos, plaquetas e no plasma, em que as fosfatases podem ser utilizadas no diagnóstico de doenças como cânceres de próstata e ovário (FERREIRA, 1999; GONÇALVES, 2000).

Essa hidrolase lisossomial tem seus níveis aumentados em diversos estados patológicos, mudanças anormais na sua atividade contribuem para o desenvolvimento de diversas patologias, como diabetes, neoplasias e doenças autoimunes. Esta enzima desempenha um papel fundamental na autólise de tecidos e é considerada uma enzima lisossomial biomarcadora, alguns estudos a consideram ainda como um marcador para a atividade lítica na histólise celular (CAMARGO, 2007).

Vários autores têm relacionado lisossomos e atividade fosfatásica ácida à ocorrência de morte celular programada. Estas hidrolases estão freqüentemente ligadas ao aumento da freqüência de lisossomos, e subseqüentes processos degenerativos (CAMARGO, 2007).

As fosfatases ácidas podem agir também como agente inibidor da produção de substâncias como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, além disso, contribui para a diminuição do consumo de oxigênio por neutrófilos humanos. Acredita-se ainda que estas enzimas possuam a capacidade de fosforilar um mensageiro intracelular envolvido na ativação do sistema fagocitário, o que pode causar comprometimentos à resposta imune do hospedeiro à infecção (GRANJEIRO, 1994).

2.9 ATIVIDADE LISSOSSOMIAL EM DOENÇAS PARASITÁRIAS

A atividade dos lisossomos está envolvida em diversos processos de defesa da célula, desta forma, estes desempenham um importante papel no combate a diversas doenças parasitárias. Segundo Santos e Rodrigues (2006) na infecção pelo platelminto trematódeo *Schistosoma mansoni* a quantidade das enzimas lisossomais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, seu hospedeiro intermediário, podem estar diretamente relacionadas com uma maior resistência ou sensibilidade do citado caramujo à infecção, ou seja, cepas de *B. glabrata* com maiores taxas de fosfatases ácidas em sua hemolinfa apresentaram maior resistência frente à infecção por *S. mansoni*.

Entretanto, Andrade e Andrews (2004) ao estudar a infecção por *Trypanosoma cruzi* chegaram a conclusões inesperadas de que a fusão das formas infectantes deste parasito,

tripomastigotas, com os lisossomos primários é fundamental para mantê-las no interior das células do hospedeiro.

A fusão das formas tripomastigotas com os lisossomos constitui uma etapa crítica e essencial para que a invasão da célula hospedeira pelo parasito seja produtiva. Os parasitos penetram na célula por meio da invaginação da membrana plasmática, formando um vacúolo reversível que podem liberar os parasitas de volta para o meio extracelular. Contudo, esse processo se torna irreversível após a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos, uma vez que estes neutralizam a saída dos protozoários (ANDRADE e ANDREWS, 2004).

Devido à essa resistência desenvolvida pelos tripomastigotas, praticamente 100% dos protozoários internalizados pela célula conseguem sobreviver no seu interior por aproximadamente 24 horas, tempo necessário para que estejam prontos para saírem do vacúolo e se multiplicarem no citosol (ANDRADE e ANDREWS, 2004). Esse processo ocorre de forma semelhante para outros protozoários tripanossomatídeos como *Leishmania spp.* (DA SILVA, 2010)

No entanto, para protozoários de outras famílias, como a Sarcocystidae, a ação dos lisossomos pode ser letal. Por não conseguir viver no interior destas organelas, estes parasitos utilizam o vacúolo parasitóforo como um mecanismo para evitar a sua erradicação. Estes vacúolos são formados durante a invasão da célula hospedeira e sua membrana é modificada posteriormente pelo parasito que exclui muitas proteínas do hospedeiro e insere proteínas de sua origem (MAGNO *et al.*, 2005; SUBAUSTE 2009).

Sendo assim, o parasito utiliza o seu vacúolo parasitóforo como uma barreira, impedindo a sua fusão com os lisossomos das células hospedeiras que certamente iriam destruí-los (MAGNO *et al.*, 2005; CARVALHO e MELO, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a estabilidade das membranas lisossomiais de gerbis infectados com *Neospora caninum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Quantificar a atividade lisossomial de células de cérebros de gerbis controle e infectados com *N. caninum*;
- ii. Quantificar a atividade lisossomial de células de fígados de gerbis controle e infectados com *N. caninum*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 gerbis (*Meriones unguiculatus*) adultos e de ambos os sexos. Esses animais foram adquiridos no biotério da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências), localizado na cidade de Salvador (Ba). Foram utilizados para cada grupo experimental 10 gerbis infectados e 10 controle. Após 03 dias de infecção os mesmos foram eutanasiados e procedeu-se a coleta do cérebro e fígado para análise.

4.2 CULTIVO CELULAR

Foi realizado o cultivo de células Vero, com trocas regulares de meio RPMI, enriquecido com 10% de soro fetal equino, a cada 48 horas. As células foram mantidas em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂. Quando o tapete celular apresentou uma confluência superior a 80% a garrafa foi utilizada para a produção de antígeno.

4.3 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO E INFECÇÃO DOS GERBIS

Utilizou-se taquizoítos de *N. caninum* da cepa NC-Bahia (GONDIM *et al.*, 2001) para infectar as células Vero cultivadas. Quando a monocamada apresentou um efeito citopático de

80% procedeu-se o preparo do antígeno. Os parasitos foram purificados utilizando-se filtros de 5,0 μm .

Os gerbis foram infectados com 5×10^5 taquizoítos de *N. caninum*, por via subcutânea.

4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE LISSOSSOMIAL

4.4.1 Obtenção da fração lisossomial

Cada animal de experimentação foi eutanasiado por trauma cervical, e, imediatamente, foram retirados os seus cérebro e fígado. Cada amostra foi separada, identificada, colocada em um becher contendo solução de sacarose $25 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7,4 e resfriada a 4°C . As amostras foram lavadas duas vezes com sacarose $25 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7,4. Em seguida, ressuspendeu-se os fragmentos do tecido na proporção de 1/10 (1g do tecido para 10 mL da solução) em uma solução tamponada (fosfato dissódico 0,1 M; fosfato monopotássico 0,1 M; TRIS 1 M; EDTA 0,2 M; KCl 1 M; sacarose 0,5M; e água destilada qsp), pH 7,4, refrigerada a 4°C e homogeneizados em aparelho de Potter-Elvehjem a 250 rpm, por dois minutos, num banho de gelo fundente.

As frações ricas em lisossomos foram separadas por centrifugação fracionada a 4°C , nos sedimentos de 30.000 xg durante 20 minutos, como apresentado na figura 4 (Rodrigues - 1988).

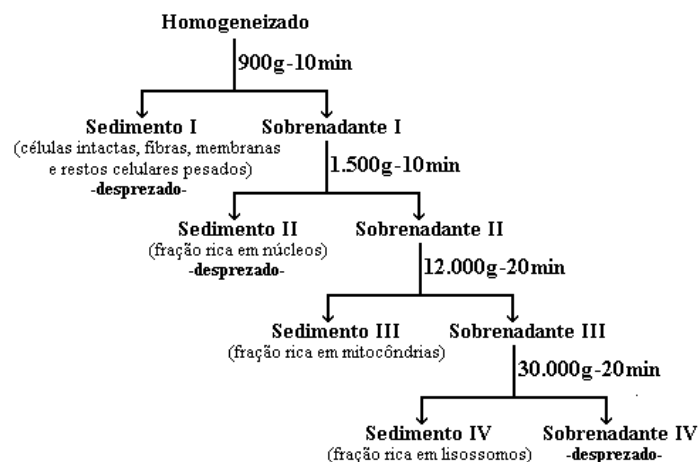


Figura 4 – Esquema representativo da separação da fração rica em lisossomos.

4.4.2 Dosagem da atividade lisossomial

Cada sedimento de 30.000 xg, rico em lisossomos, foi ressuspensão no mesmo volume do homogeneizado inicial, usando a solução tamponada (fosfato dissódico 0,1 M; fosfato monopotássico 0,1 M; TRIS 1 M; EDTA 0,2 M; KCl 1 M; sacarose 0,5M; e água destilada qsp), pH 7.4 e refrigerada a 2°C. A atividade lisossomial, das frações isoladas do tecido hepático e cerebral, correspondentes aos grupos controle e experimental, foi dosada pela atividade das fosfatase ácida (Monoester-Ortofosforico fosfohidrolase – EC 3.1.3.2) segundo técnica descrita por YANG *et al* 1996.

As proteínas totais de cada amostra foram dosadas pela técnica do Folin-biureto, modificada por Komsa-Penkova *et al.*, 1996.

Os resultados das atividades lisossomiais, expressos pelas suas médias e respectivos desvios padrões foram comparados, estatisticamente, através do teste-*t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises demonstram que a média da atividade de fosfatases ácidas no cérebro dos animais controle foi de $34,3 \pm 5,7$ UI/ μ g de proteínas totais/mL e de $26,9 \pm 3,7$ UI/ μ g de proteínas totais/mL nos animais infectados com *N. caninum*. Já a média da atividade de fosfatases ácidas das células de fígado para os animais controle foi de $28,3 \pm 2,5$ UI/ μ g de proteínas totais/mL e de $8,7 \pm 6,8$ UI/ μ g de proteínas totais/mL para os animais infectados (Figura 5 e Figura 6). Esses resultados demonstram que os animais infectados apresentaram níveis de fosfatases ácidas inferiores aos animais controle nos dois órgãos estudados, ambos com valores significativos de $p < 0,05$.

Entretanto, essa diferença foi mais acentuada no fígado em relação aos valores encontrados para cérebro, provavelmente isso se deve ao fato do fígado ser um órgão central no metabolismo do organismo e por apresentar um importante papel na desintoxicação do mesmo (COUTO *et al.*, 2008).

Segundo Roitt *et al.* (2003) as células fagocíticas do fígado desempenham importante papel na remoção de tripanossomos e parasitos da malária que penetram no sangue. Na

infecção por *Trypanosoma rhodesiense* macrófagos presentes no fígado fagocitam estes patógenos, com a ajuda da ação de anticorpos e outros componentes do sistema imunológico.

Além disso, de acordo com a biologia no *N. caninum*, o tecido cerebral só é atingido após a ativação do sistema imunológico do hospedeiro como forma de burlá-lo. Neste caso, a ação de genes específicos do protozoário em questão define a sua migração preferencial para o SNC, músculo esquelético ou retina (SHIBAHARA *et al.*, 1999; BUXTON *et al.*, 2002). Isso também poderia justificar a maior redução nos níveis de fosfatases ácidas nas células hepáticas em relação às células do SNC, uma vez que o tempo de infecção estudado pode não ter sido suficiente para que a grande quantidade do parasito tenha atingido o SNC.

Ao estudar as alterações lisossômicas presentes em fígado de camundongos infectados por *S. mansoni*, Rodrigues (1988) detectou a diminuição da quantidade de lipídios nas membranas lisossomiais dos animais infectados por este platelminto e relacionou essa redução a um possível aumento da instabilidade destas membranas.

Este autor supôs que essa fragilidade pudesse se dever a ação do próprio parasito que, ao secretar substâncias catabólicas, degrada os lipídios de membrana acarretando a liberação do material presente no interior dos lisossomos o que seria prejudicial para o parasito, uma vez que, segundo Smith (2006), alterações que diminuam a integridade das membranas lisossomiais acabam resultando no seu rompimento ou permeabilização parcial, e conseqüente liberação de enzimas hidrolíticas com o objetivo de combater alguma disfunção que possa estar ocorrendo no interior da célula.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho divergem dos encontrados por Rodrigues (1988), visto que a diminuição nos níveis de fosfatases ácidas é sugestiva de um aumento da estabilidade dos diversos componentes do compartimento lisossômico no cérebro e no fígado dos animais infectados pelo *N. caninum*.

Provavelmente, esse parasito intracelular provoca aumento da estabilidade dessas membranas como um artifício, evitando, assim, que os compartimentos lisossomiais se rompam ou se fundam com os vacúolos parasitóforos. Desta maneira, impedem a ação de enzimas hidrolíticas, hidrolases neutras e proteínas catiônicas as quais, provavelmente destruiriam o *N. caninum* dentro do seu vacúolo heterofagocítico.

Talvez, estejam nesses resultados obtidos experimentalmente, uma das explicações para o equilíbrio da relação hospedeiro/parasito existente na infecção pelo *N. caninum*, em

que se observa a capacidade deste protozoário em se manter de forma crônica no organismo do hospedeiro durante toda sua vida.

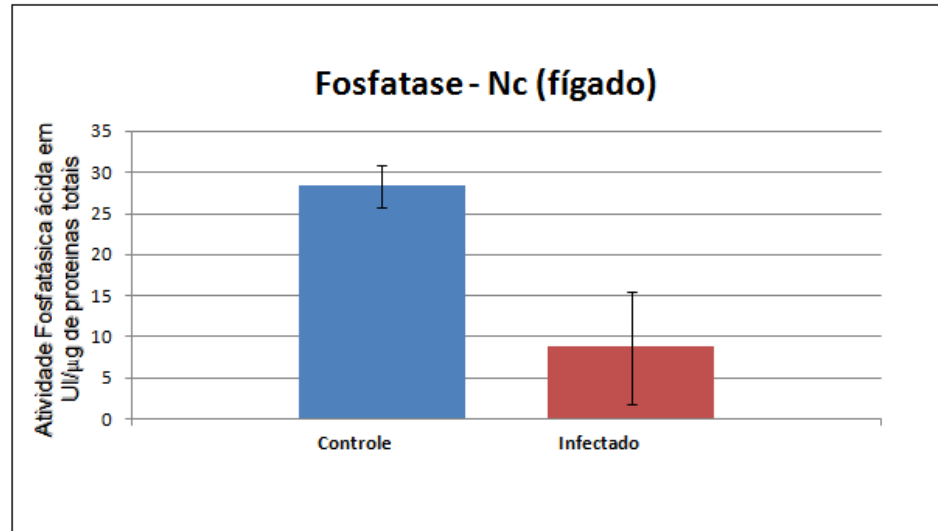


Figura 5 - Atividade lisossômial de células hepáticas de gerbis controle e infectados *in vitro* com *N. caninum*.

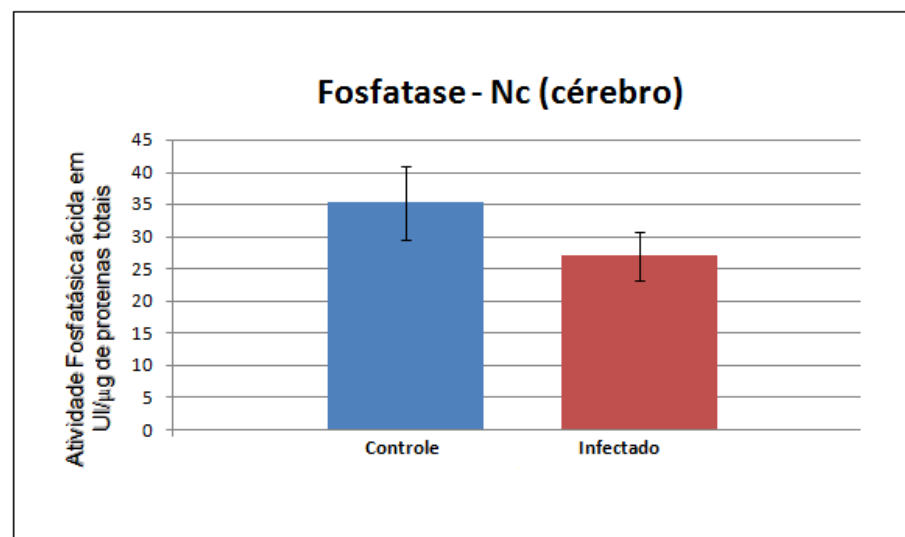


Figura 6 - Atividade lisossômial de células de cérebro de gerbis controle e infectados *in vitro* com *N. caninum*.

6.0 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que, nas condições estudadas, as membranas lisossomiais das células de cérebro e fígado de gerbis são mais estáveis nos animais infectados quando comparadas com o grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMEK, E. V. V. **Avaliação quantitativa dos lisossomos no epitélio glandular da cápsula do endometrioma e no epitélio do endométrio de pacientes com e sem endometriose.** São Paulo, 2001.

AMABIS, J.M.; MARTHO, G. R. *Biologia das células: origem da vida, citologia, histologia e embriologia.* 1ª ed., v. 1. São Paulo: Moderna, 1998. p. 142 -147.

ANDERSON, M. L.; BLANCHARD, P. C.; BARR, B. C.; DUBEY, J. P.; HOFFMAN, R. L.; CONRAD, P. A. *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 198, n. 2, p. 241-244. 1991.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Lysosomal Fusion Is Essential for the Retention of *Trypanosoma cruzi* Inside Host Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 200, n. 9, p. 1135–1143. 2004.

ANDREOTTI, R. Neosporose: um possível problema reprodutivo para o rebanho bovino. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, doc. 104. 2001.

BENETTI, A. H.; TONIOLLO, G. H.; SANTOS, T. R.; GENNARI, S. M.; COSTA, A. J.; DIAS, R. A. Ocorrência de anticorpos anti-*neospora caninum* em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 1, p. 177-180. 2008.

BJERKÁS, I; MOHN, S.F.; PRESTHUS, J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift Parasitenkund*, Berlin, v. 70, p. 271-274. 1984.

BUXTON, D.; MCALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitology*, v. 18, p. 546–552. 2002.

CAMARGO, C. A. Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos. Campinas, 2007.

CAÑÓN-FRANCO, W. A.; BERGAMASCHI, D. P.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L.M.A.; SOUZA, S.L.P.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; DUBEY, J.P.; GENNARI, S.M. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.115, p.71-74. 2003.

CARVALHO, C. S.; MELO, E. J.T. Acidification of the parasitophorous vacuole containing *Toxoplasma gondii* in the presence of hydroxyurea. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, n. 3, p. 475-484. 2006.

COSTA, G. H. N.; CABRAL, D. D.; VARANDAS, N. P.; SOBRAL, E. A.; BORGES, F. A.; CASTAGNOLLI, K. C.. Frequência de anticorpos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii* em soros de bovinos pertencentes aos estados de São Paulo e de Minas Gerais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 22, n. 1, p. 61-66. 2001.

COUTO, J.L.A.; VIEIRA, R.C.S.; BARBOSA, J.M.; MACHADO, S.S.; FERREIRA, H. S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni* Liver function abnormalities in undernourished and *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 41, n. 4, p. 390-393. 2008.

DA SILVA, M. F. L. Relação entra a localização celular da enzima arginase de *Leishimania (Leishimania) amazonensis* e seu papel na infecção de macrófagos murinos. São Paulo, 2010.

DEVENS, B.A.; M.I.V. VILORIA. Utilização de taquizoítos do *Neospora caninum* na produção de lâminas para imunofluorescência indireta. *PUBVET*, v. 2, n. 10. 2008.

DUBEY, J. P.; CARPENTER, J. L.; SPEER, C. A.; TOPPER, M. J.; UGGLA, A.. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.192, n. 9, p. 1269-1285. 1988a.

DUBEY, J. P.; HATTEL, A. L.; LINDSAY, D. S.; TOPPER, M. J. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and the experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.193, n. 10, p. 1259-1263. 1988b.
DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 67, n. 1-2, p. 1–59. 1996.

DUBEY, J. P., LINDSAY, D. S.; ADAMS, D. S.; GAY, J. M.; BASZLER, T. V.; BLAGBURN, B. L.; THULLIEZ, P. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 57, p. 329–336.1996.

DUBEY, J.P. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, v. 84, p. 49-367.1999.

DUBEY, J. P.; BARR, B.C.; BARTA, J.R.; BJERKA, I.; BJÖRKMAN, C.; BLAGBURN, B.L.; BOWMAN, D.D.; BUXTON, D.; ELLIS, J.T.; GOTTSTEIN, B.; HEMPHILL, A.; HILL, D.E.; HOWE, D.K.; JENKINS, M.C.; KOBAYASHI, Y.; KOUDELA, B.; MARSH, J.G.; MATTSSON, M.M.; MCALLISTER, D.; MODRY, Y.; OMATA, L.D.; SIBLEY, A.E.; SPEER, C.A.; TREES, A.J.; UGGLA, A.; UPTON, S.J.; WILLIAM, D.J.L.; LINDSAY, D.S. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *International Journal for Parasitology*, v. 32, p. 929–946. 2002.

DUBEY, J. P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, v. 41, n. 1, p. 1-16.2003.

DUBEY, J.P. Neosporosis in Cattle. *Journal of Parasitology*, v. 89, p. 42-56.2005.

FERNANDES, B.C.T.M.; GENNARI, S.M.; SOUZA, S.L.P.; CARVALHO, J.M.; OLIVEIRA, W.G.; CURY, M.C. Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.123, p.33-40, 2004.

FERREIRA, C. V. **Caracterização cinética e físico-química de fosfatases ácidas purificadas de semente de soja**. Campinas, 1999.

GENNARI, S.M.; YAI, L.E.O; D'ÁURIA, S.N.R.; CARDOSO, S.M.S.; KWOK, O.C.H.; JENKINS, M.C.; DUBEY, J.P. Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.106, p.177-179. 2002.

GONÇALVES, M. A. **Purificação parcial e caracterização de fosfatases ácidas de fígado de cação (*Rizoprionodon lalandei*)**. Campinas, 2000.

GONDIM, L. F.; SARTOR, I. F.; MONTEIRO, L. A. JR; HARITANI, M.. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. *New Zealand Veterinary Journal*, v. 47, n. 1, p. 35. 1999.

GONDIM, L. F. P.; SARTOR, I. F.; HASEGAWA, M.; YAMANE, I. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 86, p. 71–75. 1999.

GONDIM, L.F.P.; PINHEIRO, A.M.; SANTOS, P.O.M.; JESUS, E.E.V.; RIBEIRO, M.B.; FERNANDES, H.S.; ALMEIDA, M.A.O.; FREIRE, S.M.; MEYER, R.; MCALLISTER, M.M. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils. *Veterinary Parasitology*, v. 101, p. 1–7. 2001.

GONDIM, L. F.; McALLISTER, M. M.; PITT, W. C; ZEMLICKA, D. E. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 34, n. 2, p. 159-161.2004.

GRANJEIRO, J. M. **Purificação e caracterização da fosfatase ácida de rim bovino.** Campinas,1994.

GRANJEIRO, P. A. **Estudos cinéticos, físico-químicos e conservacional das fosfatases ácidas de sementes de mamona (*Ricinus communis*).** Campinas, 2001.

GUIMARÃES JUNIOR, J. S.; ROMANELLI, P. R. **Neosporose em animais domésticos.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 27, n. 4, p. 665-678. 2006.

HEMPHILL, A.; GOTTSTEIN, B.; KAUFMANN, H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*, Cambridge, v. 112, n. 2, p. 183-197.1996.

INNES, E. A.; WRIGHT, S. E.; MALEY, S. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, v. 31, n. 13, p. 1523-1534. 2001.

KOMSA-PENKOVA, R; SPIROVA, R.; BECHEV, B. Modifications of Lowry's method for collagen concentration measurement. *J Biochem. and Biophys. Meth*, v. 32, p. 33-43. 1996.

LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*, v. 50, n. 11, p. 1981-1983. 1989.

MAGNO, R. C.; STRAKER, L. C.; SOUZA, W.; ATTIAS, M. Interrelations between the Parasitophorous Vacuole of *Toxoplasma gondii* and Host Cell Organelles. *Microscopy and Microanalysis*. v. 11, p. 166–174. 2005.

McALLISTER, M. M.; DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; JOLLEY, W. R.; WILLIS, R. A.; McGUIRE, A. M.. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, v. 28, n. 9, p. 1473-1478.1998.

MINEO, T. W. P. **Estudo da resposta imune celular e humoral de cães frente à infecção oral por *Neospora caninum***. Jaboticabal, 2007.

MONTEIRO, R. M. **Caracterização de protozoários pertencentes à sub-família Toxoplasmatinae pela análise molecular do gene codificador de proteína do choque térmico (HSP70) e do espaçador interno transcrito 1 (ITS-1)**. São Paulo, 2006.

MOTA R. A.; FERRE, I.; FARIA, E. B. Situação da neosporose bovina no Brasil e métodos de diagnóstico. *Medicina Veterinária*, v. 2, n.1, p. 38-48. 2008.

PINHEIRO, A.M.; COSTA, M.F.; PAULE, B.; VALE, V.; RIBEIRO, M.; NASCIMENTO, I.; SCHAER, R.E.; ALMEIDA, M.A.O.; MEYER, R.; FREIRE, S.M. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Veterinary Parasitology*, v. 130, p. 73–79. 2005.

RODRIGUES, L.E.A. Bioquímica da esquistossomose mansônica. VII – Alterações lipídicas das membranas lisossômicas durante a fase inicial da agressão hepática. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 83, n. 1, p. 47 – 52. 1988.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 6ª ed. Tamboré: Manole, 2003.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. *Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva*. São Paulo: Rocca, 2005.

SAFTIG, P.; KLUMPERMAN, J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews*, v. 10, p. 623 – 635. 2009.

SANTOS, M. A. V.; RODRIGUES, I. R. C. Estudo in vitro da ação letal da hemolinfa de *biomphalaria glabrata* sobre os miracídios de *Schistosoma mansoni*. *Revista Paraense de Medicina*, v. 20, n. 2, p. 13-16. 2006.

SMITH, M. C. M. **Alterações lisossomais e indução de morte celular programa em células leucêmicas tratadas com paladaciclo**. Campinas, 2006.

SPEER, C. A.; DUBEY, J. P.. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *The Journal of Protozoology*, Lawrence, v. 36, p. 458-463. 1989.

SHIBAHARA, T.; KOKUHO, T.; ETO, M.; HARITANI, M.; HAMAOKA, T.; SHIMURA, K.; NAKAMURA, K.; YOKOMIZO, Y.; YAMANE, I. Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Pathology*, v. 36, n. 4, p. 321-327.1999.

SILVA, G. E. G.; VALENÇA, M. O. S. *Nurologia Clínica*. Recife: Editora Universitária da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2003. p. 181 – 182.

SILVA JUNIOR, C. S.; SASSON, S. *Biologia 1: citologia e histologia*. 6^a ed. v. 1. São Paulo: Atual, 1991. p. 94-96.

SOARES, J. L. *Biologia*. 7^a ed. São Paulo: Scipione, 1997 p. 54-56.

SUBAUSTE, C. S. CD40, autophagy and *Toxoplasma gondii*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n. 2, 2009.

TEIXEIRA, W.C.; SILVA, M.I.S.; PEREIRA, J.G.; PINHEIRO, A.M.; ALMEIDA, M.A.O.; GONDIM. Frequência de cães reagentes para *Neospora caninum* em São Luís, Maranhão. *Arquiv, L.F.P. o Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 685-687. 2006.

TORTORA, G. G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TREES, A. J.; WILLIAMS, D. J. L.. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, v. 21, n. 12, p. 558-561. 2005.

VOGEL, F. S. F.; ARENHART, S.; BAUERMAN, F. V. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6. 2006.

YANG, T.T.; SINAI, P.; KAIN, S.R. An acid phosphatase assay for quantifying the growth of adherent and nonadherent cells. *Analytical Biochemistr*, v. 241, p. 103-8. 1996.