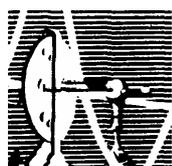


CLAUDIA MAIA SOUZA

METABOLISMO DE LIPÍDEOS E DE POLIAMINAS
COMO POSSÍVEIS ALVOS QUIMIOTERÁPICOS
EM Giardia lamblia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2006**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Dissertação de mestrado

Metabolismo de Lipídeos e de Poliaminas como possíveis

Quimioterápicos em

Aluna:

Claudia Maia Souza

Orientador:

Wanderley de Souza

Rio de Janeiro, RJ

2006

Souza, Claudia Maia

Metabolismo de Lipídeos e de Poliaminas como Possíveis Quimioterápicos em

Dissertação de tese: Mestre em Ciências Biológicas – Biofísica

- | | |
|---------------------------|--|
| 1. | 2. Quimioterapia |
| 3. Microscopia Eletrônica | 4. Poliamina |
| 5. Esterol | 6. ²⁴⁽²⁵⁾ -esterol metiltransferase |
| 7. Esqualeno Sintetase | 8. Encistamento |

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Título

Este trabalho foi realizado sob a orientação do Dr. Wanderley de Souza, no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Colaboradores:

Dr. Eric Oldfield, na síntese do bisfosfonado inibidor da isoprenilação de proteínas.

Dr. Ian Gilbert e Julio A. Urbina, na síntese de drogas inibidoras do metabolismo de esteróis.

Dr. Marcos André Vannier dos Santos, na pesquisa sobre o metabolismo de poliaminas em .

Apoio financeiro: CAPES, CNPq, PRONEX, FAPERJ e European Commission (contrato ERB IC18-CT98-0371).

Dedicatória

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a quaisquer outras forças positivas que me auxiliaram nessa longa estrada e que não me deixaram desistir de meus objetivos, por mais árduos que tenham sido os caminhos.

À minha mamãe: tudo o que sou devo a ela!

Ao meu orientador Wanderley de Souza, que me aceitou como aluna de mestrado em seu laboratório. Obrigada pelas chances e pelas idéias.

A todos os meus “helmintos” favoritos (em ordem alfabética para não ter ciúmes e problemas de exclusão): À Alek, que se tornou a minha mãe adotiva e soube me ensinar muito, não só na minha tese, mas também na minha vida; À Débora, pelos seus conselhos experientes que me ajudaram a tomar decisões não menos importantes. Sem contar toda a tinta da impressora dela que eu usufruí. Um dia ainda pago seus cartuchos, amiga!; À Mel, que sempre me ajudou a ter força durante os momentos de dúvida. À “Maloma” (vulgo Paloma), Iani, Jairinho e Dudu pelo apoio e amizade; à Lucila, Luciana, Vanessa, Vivi, Isabela e Fernando, pelas muitas conversas divertidas no almoço e festinhas compartilhadas com alegria.

À Rey, a quem eu nem sei como agradecer! Caí de pára-quadras em seu laboratório e me aceitou de braços abertos como “aluna agregada”. Obrigada por ter me transformado em uma endossimbionte em meio a tantos helmintos parasitos.

À Déia, que me ensinou como trabalhar bem em um laboratório; à Giani e Camila, por terem me ajudado no início do meu trabalho e por dividirem comigo bons e maus momentos; ao Marcos André, por ter aberto para mim as portas do mundo científico.

À Adriana Lanfredi, que me apresentou às lindas e felizes Giardias; às não menos amantes da , Loraine, Letícia e Joana, por me doarem um pouco de suas experiências e opiniões.

Ao meu amigo “falcatrua” Thiago Manchester, por ter me ajudado a processar grande parte do meu material de microscopia eletrônica. Juntos ainda conseguiremos identificar a “falcatruína” dentro dos “falcatruossomos” na .

A TODOS os meus amigos e companheiros de trabalho do laboratório Hertha Meyer, por tornarem o subsolo um ambiente mais agradável e descontraído de se trabalhar. Obrigada pelo carinho e pela ajuda de vocês todos, mesmo nas mínimas coisas.

Ao Bosco e à Nete, por serem responsáveis pela ordem do laboratório. “Nete, vai almoçar?” Ela sempre se esquece e tem que ser constantemente lembrada... Ao Deda, à Ana Cristina, à Noêmia e à Cazuza, pelo apoio técnico, principalmente quando se tem urgência.

À todas as professoras do Hertha Meyer, que sempre que podem colaboram na resolução de dos problemas com sugestões fundamentais.

Ao Dr. Jose Morgado e equipe e ao Dr. Fernando Mello, por permitir que usufrísse dos equipamentos e do espaço físico de seus laboratórios.

Aos amigos fora do trabalho: são vocês que me ajudam na hora de abstrair os problemas!

A Estrada

)

RESUMO

A giardíase é uma doença intestinal que atinge especialmente crianças, causando sintomas como diarreia, náuseas, dores abdominais, entre outros. Recentemente, sua relevância tem sido exaltada sobretudo em países desenvolvidos, inclusive nos Estados Unidos e Canadá. A droga comumente usada no tratamento dessa doença é o metronidazol (Flagyl®), a qual causa o aparecimento de inúmeros efeitos colaterais, como gosto metálico na boca, dores de cabeça, náusea, vômitos, etc. Apesar de ser a droga de escolha no tratamento das doenças causadas pelos protozoários anaeróbicos, até hoje o uso do metronidazol não foi aprovado pela FDA (US Food and Drug Administration). Metronidazol foi ainda apontado como responsável por efeitos mutagênicos em bactérias e carcinogênicos em humanos. Por este motivo, a busca de fármacos alternativos para o tratamento de infecções causadas por patógenos com metabolismo anaeróbico, inclusive *Giardia lamblia*, é imprescindível. Foi visto em trabalhos anteriores que alguns inibidores da produção de esteróis bloquearam a proliferação de parasitos, inclusive em formas que não os sintetiza ou que não os possui em suas membranas. É sabido que *Giardia lamblia* capta colesterol do hospedeiro ou do meio de cultura quando *in vitro*. Quando inibidores da enzima esqualeno sintetase (SQS), uma enzima atuante na produção de esteróis, foram adicionados às culturas de *Giardia lamblia* nenhum efeito proliferativo foi observado. Entretanto, ao adicionar às culturas inibidores da enzima ²⁴⁽²⁵⁾-esterol metiltransferase (24-SMT), específica somente na produção de ergosterol, efeitos antiproliferativos e ultraestruturais foram observados. Os valores de IC₅₀ variaram entre 0,17µM e 7µM, para as drogas 22,26-azasterol e epiminolanosterol. As principais mudanças observadas por microscopia eletrônica de transmissão foram: aumento nas vesículas periféricas, aparecimento de estruturas de autofagia e indução do processo de encistamento. Um outro composto que atua na isoprenilação de proteínas foi testado, que é o bisfosfonado risedronato. O IC₅₀ foi 12,11µM, e alterações morfológicas como extração do conteúdo celular, liberação de vesículas, indução do encistamento e aparecimento de estruturas autofágicas foram observadas. Outra droga utilizada nos testes foi o análogo da poliamina putrescina. As poliaminas são polications que estão presentes nas células e são responsáveis pela estabilização de estruturas negativamente carregadas e de natureza ácida, tais como membranas e ácidos nucleicos, por exemplo. Quando o análogo 1,4-diamino-2-butanona foi adicionado às culturas efeitos inibitórios puderam ser observados, além de ultraestruturais. O processo de diferenciação foi induzido; além disso, foi visto que *Giardia lamblia* não incorpora o fármaco através de transportadores para putrescina, já que não houve incorporação desta poliamina durante ensaios radioativos. O co-tratamento de DAB com metronidazol reduziu o crescimento das culturas sinergicamente. De acordo com os resultados vistos neste trabalho, o estudo das poliaminas e a utilização de alguns compostos, como os que alteram o metabolismo de esteróis e os bisfosfonados, poderiam ser úteis para desvendar o complexo e desconhecido metabolismo de *Giardia lamblia*.

ABSTRACT

Giardiasis is an intestinal disease that infects essentially children, causing symptoms as diarrhea, nausea, abdominal pain, among others. Recently its relevance has been raised mainly in developed countries, including United States and Canada. The common drug used during the treatment of this disease is metronidazole (Flagyl®), which causes a lot of side effects, as metallic taste in mouth, headache, nausea, vomiting, etc. Although being the drug of choice in treatments of diseases caused by anaerobic protozoa, so far the utilization of metronidazole has not been approved by FDA (US Food and Drug Administration). Metronidazole has been appointed as responsible by mutagenic effects in bacteria and carcinogenic in humans. For this reason, the search for alternative drugs for the treatment of infections caused by anaerobic pathogens, as well as *Giardia lamblia*, is required. Previous works showed that some sterols production inhibitors blocked parasite proliferation, including some kinds that do not synthesize or do not have sterols in their membranes. It is known that *Giardia lamblia* catches cholesterol from host or from culture medium *in vitro*. When squalene synthase (SQS, an enzyme that acts in sterol production) inhibitors have been added in *Giardia lamblia* cultures no antiproliferative effect was seen. Nevertheless, addition of ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase (24-SMT, an specific enzyme related in ergosterol production) inhibitors triggered antiproliferative and ultrastructural effects. IC₅₀ values were about 0,17µM and 7µM. The most important changes observed under transmission electron microscopy were alterations in peripheral vesicles, appearance of autophagic structures, and induction of encystation process. Another compound that acts in protein isoprenylation (bisphosphonate risedronate) was tested. Its IC₅₀ value was 12,11µM, and morphologic alterations, as cell content extraction, release of vesicles, induction of encystment, and formation of autophagic structures were observed. Another drug utilized in tests was the polyamine analogue. Polyamines are polycations present in cells and are responsible by stabilization of negative charged and acidic components, like membranes and nucleic acids, for example. When the analogue 1,4-diamino-2-butanona was added in cultures inhibitory and ultrastructural effects could be seen. The differentiation process was induced; furthermore, we saw that *Giardia lamblia* do not capture the drug using any putrescine transporter, as long as there was no incorporation of this polyamine after radiolabeled assays. DAB and metronidazole cotreatment reduced cell growth synergistically. In according to results seen in this work, the study of polyamines and the utilization of compounds that alter sterol and lipid metabolism could be useful to elucidate the complex and unknown *Giardia lamblia* metabolism, as well as they could become chemotherapeutic drugs to treat giardiasis in the future.

Lista de Siglas

24-SMT – ²⁴⁽²⁵⁾-esterol metiltransferase

ADC – Arginina Descarboxilase

AZ – Ácido Zaragózico

AZA – 22,26-azasterol

BF – Bisfosfonado

BPQ-OH - 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina

DAB – 1,4-diamino-2-butanona

DFMO – DL- -difluorometilorninina

EPI – ^{24(R,S)25}-epiminolanosterol

FDA – U. S. Food and Drug Administration

FP – Farnesil Pirofosfato

GP – Geranil Pirofosfato

IBEs – Inibidores da Biossíntese de esteróis

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ODC – Ornitina Descarboxilase

PA – Poliamina

RE – Retículo Endoplasmático

RIS – Risedronato

SQS – Esqualeno Sintetase

VE – Vesículas de Encistamento

Índice

Resumo	8
Abstract	9
Lista de siglas	10
I - Introdução	
1. Um pouco sobre a	14
1.1. Histórico	14
1.2. Nomenclatura	14
2. Biologia da : a doença e o ciclo de vida	17
3. Morfologia do parasito	19
4. Posição filogenética de spp.: uma controvérsia	27
5. Encistamento de	28
6. Quimioterapia antiparasitária: no alvo das drogas	30
6.1. Metronidazol (Flagyl[®]): a droga de escolha	31
6.2. Fármacos alternativos para o tratamento da giardíase	34
6.2.1. Outros da classe dos nitroimidazóis	34
6.2.2. Quinacrina (Atabrina)	34
6.2.3. Furazolidona (Furoxona)	35
6.2.4 Benzimidazóis	36
6.2.5. Paromomicina (Humatina)	36
6.2.6. Bacitracina complexada a sais de zinco	37
6.3. Drogas emergentes em	37
6.3.1. Compostos sintéticos	37
6.3.2. Fitoterápicos	38
7. Drogas emergentes e promissoras na quimioterapia de protozoários parasitos	38
8. Metabolismo lipídico de	42
9. Poliaminas	45
9.1. Via de produção de poliaminas	48
9.2. Poliaminas e o ciclo celular	52
9.3. Poliaminas em protozoários	54

II – Justificativa	56
III – Objetivos	57
IV – Materiais e Métodos	58
1. Reagentes	58
2. Cultura de células	58
3. Curvas de crescimento	59
4. Drogas	60
5. Análises estatística e cálculo da IC ₅₀	61
6. Coloração das células	65
7. Ensaio de incorporação de putrescina tritiada ([³ H]-putrescina)	65
8. Atividade da ornitina descarboxilase.....	65
9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	66
V – Resultados	67
1. Efeitos das drogas na proliferação de culturas e na biologia celular de	67
1.1. Azasteróis	67
1.2. Ácidos Zaragóxicos.....	70
1.3. Bisfosfonado	72
1.4. Análogo da poliamina putrescina	73
1.4.1. Conteúdo intracelular de putrescina	74
1.4.2. Atividade da ornitina descarboxilase (ODC)	75
1.4.3. Co-tratamento: DAB e metronidazol	76
2. Alterações na Estrutura Celular	77
2.1. 22, 26-azasterol (AZA)	77
2.2. Epiminolanosterol (EPI)	89
2.3. Bisfosfonado (RIS)	98
2.4. 1,4-diamino-2-butanona (DAB)	107

VI – Discussão	112
1. Efeitos no metabolismo lipídico de	115
1.1. Efeitos proliferativos em culturas de	115
1.2. Alterações morfológicas em	118
2. Efeitos no metabolismo de poliaminas de	125
2.1. Efeitos proliferativos nas culturas e na biologia celular de	125
2.2. Alterações morfológicas em	128
VI – Conclusões	131
Referências	133

I - Introdução

1. Um pouco sobre a *Giardia*...

1.1. Histórico

Em 1681, um holandês chamado Antony van Leeuwenhoek observava suas próprias fezes diarréicas em um microscópio arcaico construído por ele mesmo. O jogo de lentes não permitia aumentos muito grandes e com boas definições, mas possibilitou que narrasse a presença de inúmeros organismos que se moviam ativamente de maneira característica. Ele não sabia, mas neste momento passou a ser aquele que descrevia o primeiro protozoário intestinal humano: a *Giardia lamblia*. Provavelmente Leeuwenhoek jamais associou seu desconforto abdominal a qualquer doença causada por microorganismos. No entanto, em 1932, o cientista inglês Clifford Dobell traduziu inúmeras cartas do holandês e chegou à conclusão de que suas observações eram realmente referentes ao protozoário *Giardia lamblia*, e que sua diarreia era causada pelo protozoário (Meyer, 1994).

1.2. Nomenclatura

A nomenclatura das diferentes espécies do gênero *Giardia* foi muito controversa até o final do século XIX, mais precisamente em 1884, quando foi definido este nome para o gênero que até então consistia de duas designações para o mesmo organismo. Até a metade do século XX ainda era comum nomear a espécie em relação ao hospedeiro em que foi encontrada. Devido a isso, chegou-se a ter aproximadamente quarenta espécies diferentes de *Giardia*. Contudo, em sua tese de doutorado, em 1952, Francis Filice da Universidade de Califórnia propôs uma nova nomenclatura baseada nos seguintes critérios (Meyer, 1994):

1. Relação espécie/hospedeiro, mantendo parte das descrições anteriores;
2. Formato dos corpos medianos da célula;
3. Tamanho e formato celular.

Com esse novo critério o número de espécies do gênero foi reduzido para apenas os três seguintes (figura 1):

- : trofozoíto com o corpo alongado e estreito (20 x 4,5 μm); corpo mediano longo e em formato de gota. Descrita apenas para hospedeiros anfíbios.
- : dois corpos medianos pequenos e arredondados no centro do corpo celular (10 x 7 μm), sendo este em forma de pêra. É encontrada em roedores, principalmente, mas também pode infectar aves e répteis.
- (syn. s e): geralmente com dois corpos medianos em formato de garra, podendo apresentar apenas um; este último está disposto transversalmente em relação ao eixo longitudinal da célula; formato piriforme e, dependendo do hospedeiro, pode medir entre 11-16 μm de comprimento e 5-9 μm de largura. Pode ser vista não só em várias espécies de mamíferos (incluindo humanos e roedores), mas também em répteis e pássaros.

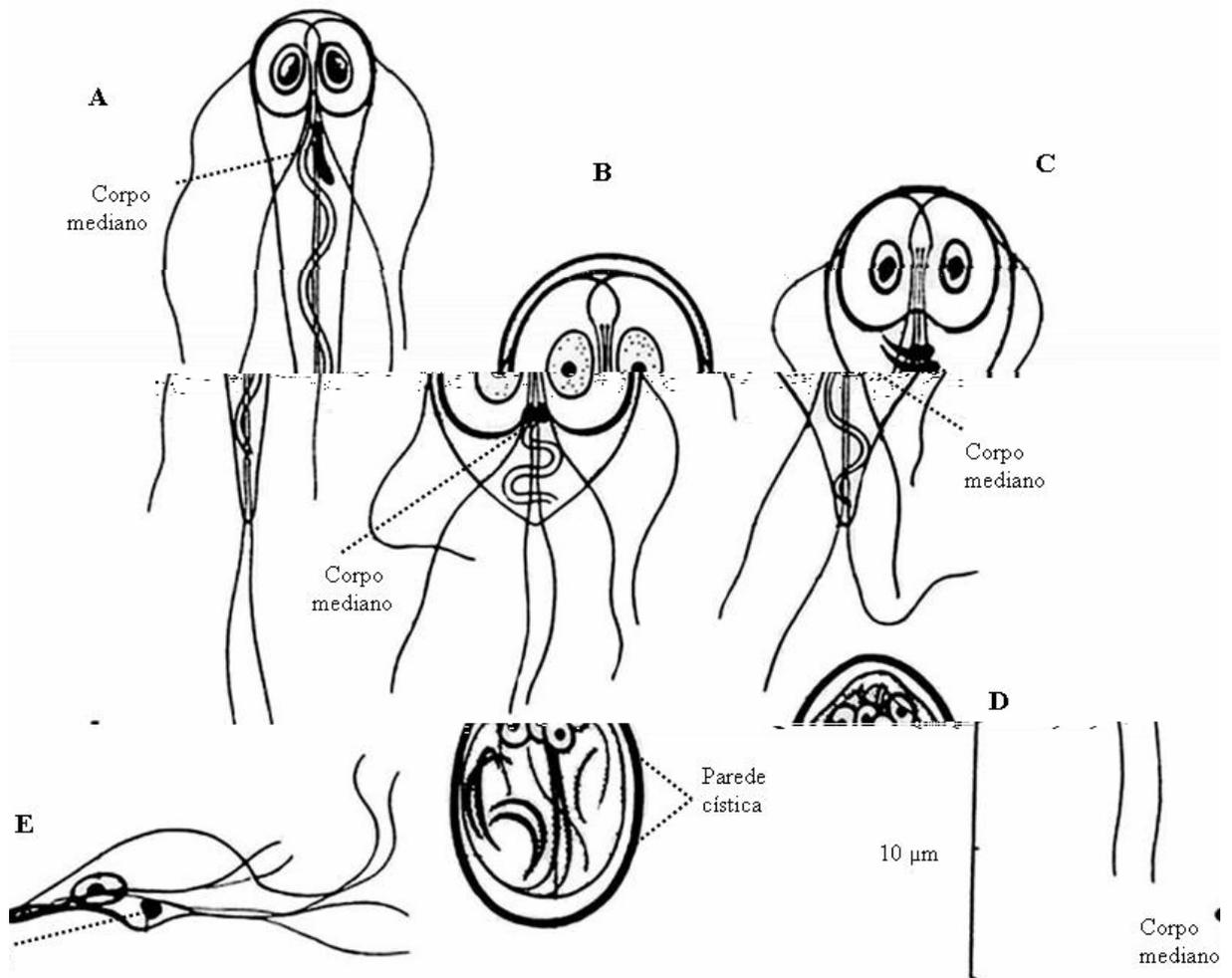


Figura 1: Esquemas representativos de algumas das diferentes espécies de *Paramecium*. **A** – *Paramecium* spp., **B** – *Paramecium* spp., **C** – *Paramecium* spp. (syn. *Paramecium* spp.), **D** – *Paramecium* spp., **E** – vista lateral de um trofozoíto de *Paramecium* spp. aderido.

2. Biologia da *Giardia lamblia*: a doença e o ciclo de vida

Giardíase é uma doença causada pelo protozoário parasito (syn. *Giardia lamblia*), caracterizada por sintomas como diarréia, náusea, vômito, má absorção, perda de peso, anemia, entre outros. Ou pode simplesmente ocorrer ausência de sintomas, quando o indivíduo infectado torna-se apenas o portador da doença, disseminando-a. É muito comum que pessoas que viajam para locais em que a taxa da parasitose é elevada retornem infectadas por este protozoário. Por isso, a giardíase é conhecida como a “doença dos viajantes”. Ambientes como creches e escolas (grandes aglomerações de crianças) também são ideais para a dispersão da doença porque a transmissão do parasito é oral-fecal e de pessoa para pessoa. Geralmente nesses locais as condições higiênicas criam condições propícias à sua propagação porque não são totalmente controladas (Center for Disease Control - <http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/healthywater/factsheets/giardia.htm>).

pode ser adquirida através da ingestão de água ou de alimentos contaminados pelos **cistos** do parasito, que são sua forma de resistência no ambiente (figura 2). Medidas profiláticas simples, como a lavagem dos alimentos crus em água corrente e fervura da água antes de bebê-la, são eficazes no combate à doença. Além disso, higiene pessoal é fundamental para que o contágio oral/fecal tenha sua taxa reduzida. A medicação precoce do indivíduo infectado é importante para evitar o aumento da transmissão, principalmente em se tratando de locais de grandes aglomerações (Adam, 2001; Sogayar, 1995).

Após os cistos de *Giardia lamblia* terem sido ingeridos pelo hospedeiro, eles são sensibilizados pelo pH ácido estomacal e começam a sofrer um processo denominado **desencistamento**. Quando atinge as primeiras porções do intestino delgado, o parasito já se

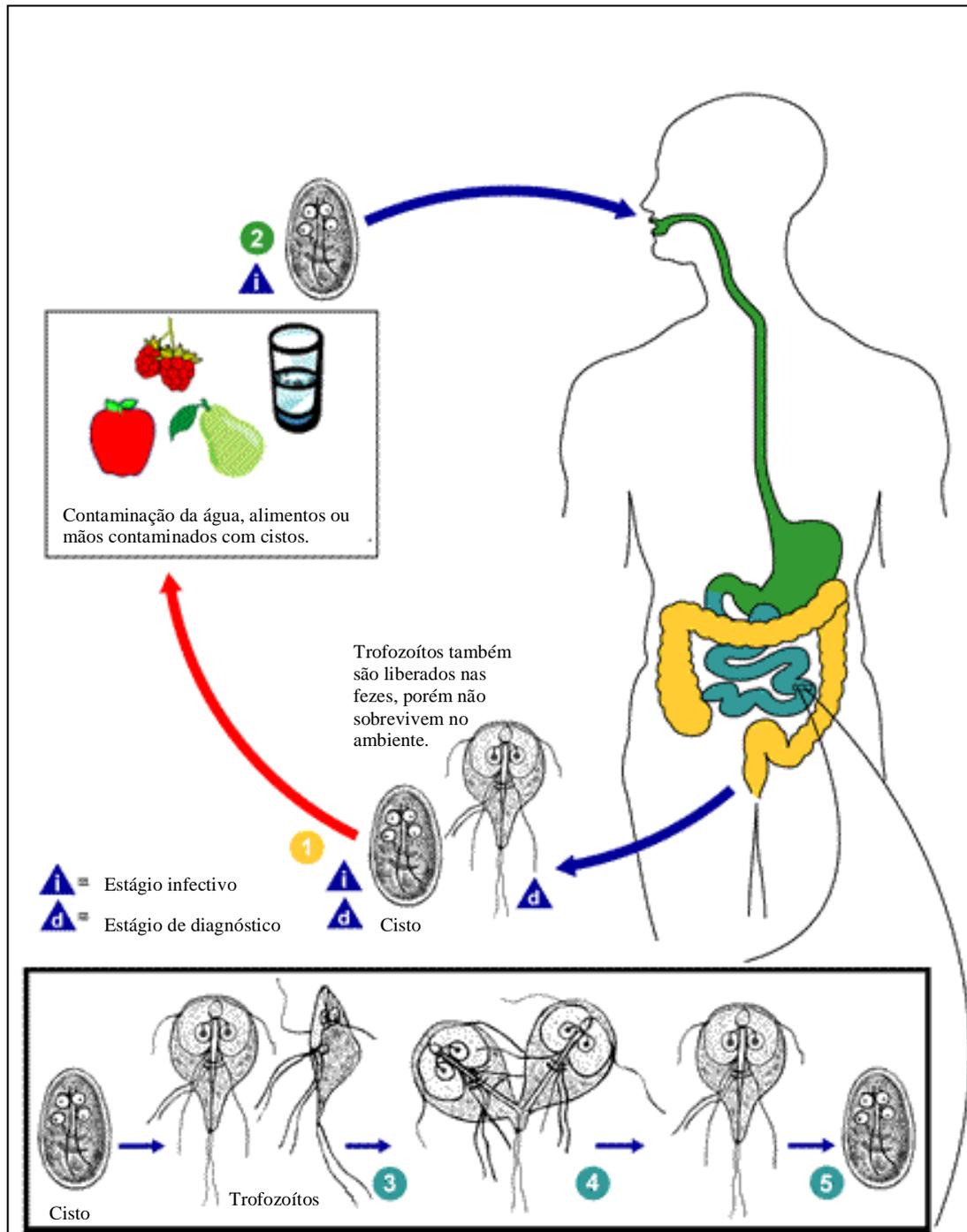


Figura 2: Ciclo de vida de *Giardia lamblia*. Fonte: CDC (Center for Disease Control) www.dpd.cdc.gov/dpdx. 1: contaminação dos alimentos e água pelos cistos liberados pelo hospedeiro; 2: ingestão dos cistos; 3: divisão binária dos trofozoítos (ocorre no intestino delgado); 4: trofozoíto após a divisão; 5: cisto formado após o processo de diferenciação celular.

encontra sob a forma de **trofozoíto**, que é a forma flagelada natante. Os trofozoítos têm a capacidade de se dividir por bipartição, não havendo troca de material genético entre eles (jamais foi evidenciada a presença de reprodução sexuada em). A proliferação destes promove um verdadeiro atapetamento da mucosa intestinal devido à adesão da aos enterócitos. A destruição das microvilosidades e das vilosidades prejudica o processo de absorção do hospedeiro, dando origem a alguns dos sintomas previamente citados (Gillin ., 1987; Luján ., 1996 b).

No entanto, alguns dos trofozoítos se desprendem do epitélio e seguem o fluxo intestinal. Ao chegar às porções finais do intestino delgado, deparam-se com uma redução drástica dos níveis de água e de nutrientes disponíveis à sobrevivência, além do aumento do pH, o qual fica em torno de 7,8. As condições desfavoráveis à proliferação sinalizam aos trofozoítos que serão novamente liberados no ambiente

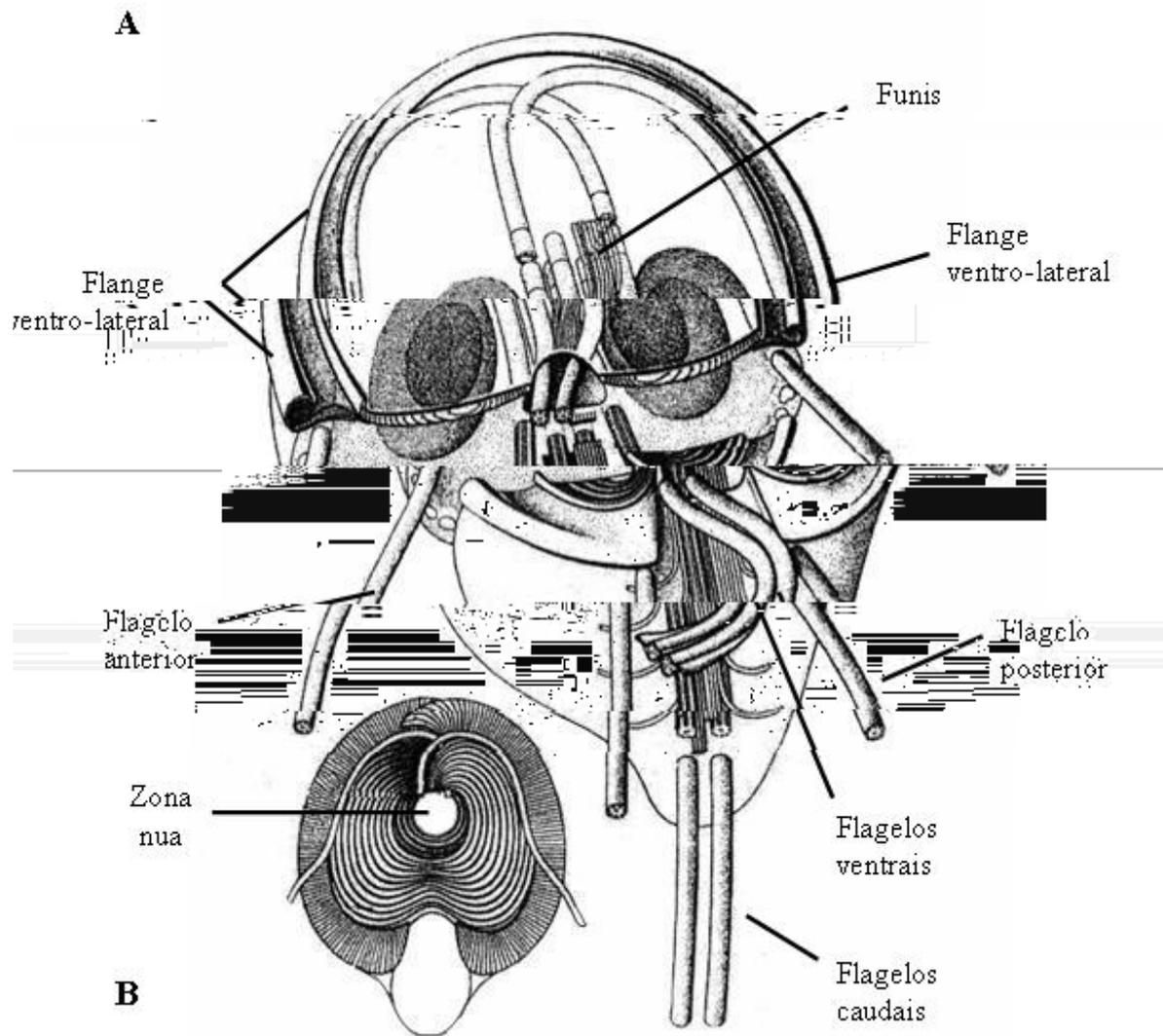


Figura 3: Ultraestrutura de *Trichomonas vaginalis* spp. Notar a presença de dois núcleos em simetria bilateral. **A** - Trofozoíto em sua vista ventral. **B** - Detalhe do disco adesivo. Modificado de Kulda & Nohynkova, 1978.

O **retículo endoplasmático** de *Leishmania* era descrito como “anormal” em relação aos outros eucariotos, apresentando-se sob a forma de pequenas cisternas e em pequenas quantidades (revisto por Gillin *et al.*, 1996). Nestes últimos eucariotos, considerados superiores, o retículo é constituído por um conjunto de membranas arrançadas em cisternas, formando um extenso sistema tubular que é composto por vários subcompartimentos com funções específicas. Posteriormente, foi demonstrada a presença de um extenso sistema reticular em *Leishmania*, sugerindo uma associação entre as vesículas periféricas e as cisternas (Lanfredi-Rangel *et al.* 1998).

Leishmania spp. é desprovida de **Aparelho de Golgi** em sua fase de trofozoíto. Porém, vesículas dispostas em cisternas, similares a esta organela, podem ser visíveis em trofozoítos que estão em processo de encistamento (DeSouza *et al.*, 2004; Marti & Hehl, 2003; Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999, Becker & Melkonian, 1996; Luján *et al.*, 1995a).

Peroxisomos, que são organelas citoplasmáticas especializadas na execução das reações oxidativas, não estão presentes em *Leishmania*. Este protozoário, que é um microaerófilo (ou seja, tolera certas quantidades de oxigênio) e eventualmente um anaeróbico completo, também é desprovido de **mitocôndria**, organela responsável pelo metabolismo energético nos eucariotos aeróbicos. Entretanto, há evidências de organelas envoltas em dupla membrana e que apresentam certa similaridade com a mitocôndria, os chamados **mitossomos**. Este assunto será discutido mais a frente na seção 5 devido à sua importância na evolução dos protozoários amitocondriados.

Leishmania possui também um sistema ímpar de vesículas em seu estado de trofozoíto, que são as chamadas **vesículas periféricas**. Estas são distribuídas ao longo de toda a região dorsal e parte da ventral, mais especificamente na zona nua do disco adesivo. Essas vesículas são ovaladas e/ou alongadas, com tamanho variando entre 100 e 400 nm, e seu lúmen

apresenta material de baixa densidade (Lanfredi-Rangel et al., 1998; Owen, 1980; Friend, 1966).

Desde 1968, em um estudo feito por Bockman e Winborn (Bockman & Winborn, 1968), acreditava-se que essas vesículas estivessem relacionadas ao sistema endocítico. Em 1980, Lindmark (Lindmark, 1980) demonstrou através de ensaios bioquímicos e microscopia eletrônica, que as vesículas periféricas seriam lisossomos. Elas contêm uma variedade de hidrolases, como a fosfatase ácida, proteinases, indicando sua natureza lisossomal (Feely & Dyer, 1987; Lindmark, 1988). Cisteíno-proteinases também foram encontradas e estas proteínas possuem diferentes pesos moleculares, de 40 a 150 kDa (Hare et al., 1989) ou 35 a 95 kDa (Werries et al., 1991). Essas características foram revistas por Lanfredi-Rangel e colaboradores (Lanfredi-Rangel et al., 1997), demonstrando a marcação das vesículas periféricas com um revelador de compartimentos ácidos. Foi ainda identificado que essas vesículas correspondem à parte do retículo endoplasmático. Portanto, foi sugerida a presença de um sistema endossomal-lisossomal concentrado no mesmo compartimento.

Touz et al. (2002) demonstraram que haveria um processamento da proteína específica de encistamento, localizada nas vesículas específicas de encistamento, antes da sua maturação. A cisteíno-proteinase, localizada nas vesículas periféricas, seria a responsável por esse processo. Posteriormente, foi evidenciado que a quantidade de vesículas periféricas é reduzida conforme o avanço do processo de diferenciação, e uma fusão destas com as vesículas de encistamento para o devido processamento foi sugerido (Lanfredi-Rangel et al., 1998). Além disso, Slavin et al. (2002) propuseram que estas vesículas também teriam um papel no processo de desencistamento, defosforilando as proteínas de parede cística.

Em células muito bem preservadas durante a fixação, um novo perfil de vesículas pode ser detectado, as denominadas **vesículas internas (VIs)** (Benchimol, 2002). Elas

podem ser encontradas em grandes quantidades e são de aparência esférica ou às vezes alongadas. As IVs são encontradas próximas ao disco adesivo, aos axonemas flagelares, em meio às vesículas periféricas e justapostas ao núcleo, principalmente, e possuem aproximadamente metade do tamanho de uma vesícula periférica. A função dessas vesículas ainda permanece incerta, porém existem várias especulações. Elas poderiam ser fontes de novas membranas, necessárias para o crescimento celular; vesículas secretórias; porções de retículo especializadas, desempenhando funções do Golgi; vesículas que contenham enzimas mitocondriais, já que *Plasmodium falciparum* não possui estruturas típicas dessa organela; ou ainda poderiam ser uma vesícula periférica inicial ou terminal, já que é comum estarem distribuídas nos mesmos locais no parasito.

Para se fixarem ao epitélio intestinal, os trofozoítos utilizam-se do **disco adesivo** ou **ventral**, o qual tem aspecto de ventosas (figura 3B) e exerce uma pressão negativa na monocamada para a adesão. Essa estrutura é sustentada pelo citoesqueleto, que se arranja em forma de espiral. No disco estão presentes proteínas que compõem o citoesqueleto, como tubulina, actinina, α -actinina, miosina e tropomiosina (Feely et al., 1982). Também foi identificado um grupo de proteínas específicas de *Plasmodium falciparum* e que estão presentes no disco adesivo, as quais foram chamadas de giardinas por Crossley & Holberton (1983). As giardinas são proteínas que possuem peso molecular entre 29-39 kDa e estão envolvidas na manutenção da estrutura do disco adesivo através da interação direta com outras proteínas do citoesqueleto (Peattie, 1990). Além disso, devido ao fato de o disco se desintegrar durante o encistamento, acredita-se que as giardinas também estejam envolvidas na regulação da dinâmica do citoesqueleto, o que caracteriza a transição do trofozoíto para o cisto (Gillin et al., 1996). Baseado em padrões de géis bidimensionais, as giardinas foram divididas em giardinas *1*, *2* e *3*, sendo que as do grupo *1* apresentam alta similaridade com as anexinas, as

quais são proteínas que se ligam a fosfolipídeos e que são Ca^{2+} dependentes, estando presentes entre os eucariotos (Bauer et al., 1999; Fiedler & Simons, 1995).

Na região central do disco adesivo há uma porção sem microtúbulos, denominada **zona nua** (figura 3B). Além da utilização do citoesqueleto do disco na adesão aos enterócitos, também já foi evidenciada a participação de receptores, tanto do parasito quanto do hospedeiro, na interação com as células intestinais (Farthing et al., 1986). Entretanto, não há registros de invasão celular ocasionada pela infecção por *Plasmodium*, somente há relatos da utilização do citoesqueleto do disco. Nas margens do disco adesivo pode-se observar a **crista lateral** em seu redor, e ainda uma **flange (ou franja) ventro-lateral** mais flexível (figura 3A). Uma proposta feita por Friend (Friend, 1966) foi a de que a flange seria a principal responsável pela adesão, entretanto até hoje sua função é controversa. Já Holberton (Holberton, 1974) postulou que apenas a crista lateral seria a responsável pela adesão. Entretanto, Campanati e colaboradores (Campanati et al., 2002) evidenciaram que o principal responsável pela adesão seria realmente o disco adesivo, e que os flagelos teriam um papel apenas na manutenção da adesão ao substrato.

A **protrusão ventral** é uma estrutura que aparece na zona nua do disco adesivo de, aproximadamente, 30% da população de trofozoítos, consistindo em uma estrutura que pode variar de forma e de tamanho. Nela pode ser vista uma fileira de microtúbulos, posicionados paralela e ventralmente em relação ao disco adesivo (Lanfredi-Rangel et al., 1999), cisternas de retículo endoplasmático, vesículas periféricas e ainda grandes quantidades de glicogênio (carboidrato presente em grandes quantidades na *Plasmodium*).

O **funis** é uma estrutura composta de duas folhas de microtúbulos que, por formar um complexo com os axonemas dos flagelos caudais, é responsável pelos movimentos de flexão lateral da porção caudal do parasito (Benchimol et al., 2004). Somente após a descrição de

Filice, em 1952, é que o funis deixou de ser confundido com o axóstilo, presente em outros protozoários (Filice, 1952).

O **corpo mediano** é um componente do citoesqueleto que está localizado na região central da célula, logo acima dos flagelos caudais, e consiste em um agregado de microtúbulos dispostos em feixe (figura 1). É uma estrutura eletrondensa que, em geral, pode ser encontrada mais próxima da região posterior da . É exclusivo de spp., e sua morfologia ajuda a identificar as diferenças entre espécies desse gênero.

tem tipicamente dois corpos medianos em formato de garra, e especula-se que sejam locais de acúmulo de microtúbulos que serão incorporados ao disco adesivo. Também é possível que seja uma fonte de microtúbulos durante a divisão celular. Ao contrário do que se acreditava, o corpo mediano também se apresenta não sob a forma de uma ou duas estruturas, mas sim em número, formato e localização na célula variados. Além disso, ao contrário do que se acreditava anteriormente, estão presentes não em 50%, mas sim em aproximadamente 80% das células, tanto no período mitótico como na intérfase, podendo estar conectados à membrana plasmática, ao disco adesivo e ao flagelo caudal (Piva & Benchimol, 2004).

Os **proteasomos**, que são grandes complexos degradadores de proteínas com dobramento incorreto, estão presentes em , porém são similares aos de Archaea e de eucariotos, concomitantemente. As proteínas a serem enviadas aos proteasomos também são marcadas com ubiquitina, a qual parece estar em um gene de cópia única, ao contrário de gene de múltiplas cópias em eucariotos.

Nos trofozoítos de spp. estão presentes dois **núcleos** sem nucléolos, localizados anteriormente, os quais são simétricos ao longo de um eixo (figuras 1 e 3). Os núcleos são quase idênticos, replicam ao mesmo tempo e ambos são transcricionalmente ativos (Benchimol, 2004 b). Possuem ainda os mesmos genes e cromossomos. Estas são características únicas de spp. e de outros diplomonadídeos. Ambos os núcleos estão

ancorados aos corpos basais dos flagelos anteriores, bem como aos flagelos posteriores e ventrais, sendo que essa ligação é feita provavelmente através de actina e centrina, mas não por dineína e tubulina (Benchimol, 2005). Isso indica que os núcleos teriam uma posição definida na célula devido ao entrelaçamento protéico.

Durante a mitose de *Leishmania*, os núcleos se movem lateralmente logo após a divisão nuclear, resultando em um trofozoíto de quatro núcleos. Uma proposta de que o disco adesivo participaria do processo de cariocinese foi levantada, já que durante a divisão *Leishmania* não apresenta um eixo microtubular típico tanto dentro como fora dos núcleos (Solari *et al.*, 2003). Esse fato daria mais um importante papel a essa estrutura microtubular, o disco adesivo. Ocorre, então, uma divisão em plano longitudinal de modo a manter a simetriabilateral. A citocinese pode ser lateral, o que é consistente com o mecanismo descrito acima; outras simetrias também são vistas (Benchimol, 2004), o que poderia alterar o eixo durante a citocinese.

Os cistos apresentam-se com formato elíptico ou ovalado, medindo entre 8 e 12 μm de comprimento e de 7 a 10 μm de largura (Sheffield & Bjorvatn, 1977). Possuem uma parede envolvendo-os (figura 1), a qual tem aproximadamente 0,3 μm de espessura, protegendo-os contra as condições ambientais desfavoráveis. Os flagelos não são aparentes externamente, bem como o disco adesivo, o qual está fragmentado e internalizado. Podem apresentar de 2 a 4 núcleos, dependendo de seu estágio de maturação. Assim como nos trofozoítos, também foi identificada a presença de grânulos de glicogênio dispersos no citoplasma dos cistos, apoiando a idéia de que estes seriam metabolicamente ativos (Paget *et al.*, 1989; Manning *et al.*, 1992).

4. Posição filogenética de *Giardia* spp.: uma controvérsia...

é um organismo eucarioto e membro do grupo dos protozoários. Os protistas são tradicionalmente classificados por sua morfologia em **ciliados**, **amebae** (rhizopodes), **esporozoa** e **flagelados**, sendo que o gênero está incluído neste último grupo. Pertence à ordem **Diplomonadida**, que tem como característica a presença de dois núcleos, pelo menos quatro flagelos, ausência de mitocôndria e aparelho de Golgi; diferenciam-se em cistos e podem ser de vida livre ou parasita. A família é a **Hexamitidae**, a qual tem como particularidades organismos de seis a oito flagelos, dois núcleos, simetria bilateral e podem apresentar axóstilo e um corpo mediano ou parabasal.

A classificação filogenética de spp. tem sido contestada ultimamente, sobretudo porque esse protozoário e outros anaeróbicos considerados “primitivos” não possuem algumas organelas típicas de eucariotos superiores, como mitocôndria, peroxisomo e Aparelho de Golgi. Entretanto, há relatos de que existem remanescentes do endossimbionte que deu origem às mitocôndrias em spp. (Tovar 2003), bem como em (Tovar 1999) e .

Foram identificados genes de proteínas marcadoras mitocondriais (IscU e IscS) nos cromossomos de (Tovar ., 1999). Essas proteínas são ativas e estão presentes em pequenas organelas que são compostas por membrana dupla, as quais foram denominadas como **mitossomos**. Estudos de localização evidenciaram que estas organelas estão distribuídas através do citoplasma, ao redor dos corpos basais e nos axonemas dos flagelos, e que sua quantidade varia de 25 até mais de 100 por célula (Tovar ., 1999). Presume-se que os mitossomos teriam como função metabólica nos protozoários amitocondriados a maturação das proteínas Fe-S, e que seria esta a única característica bioquímica essencial para

a célula eucariótica sobreviver sob condições de privação de oxigênio, o que é o caso desses organismos microaerófilos.

O fato de ter sido comprovado que remanescentes do endossimbionte que deram origem às mitocôndrias estão presentes em *Giardia lamblia* implica em uma discussão mais profunda da classificação filogenética deste protozoário. As hipóteses anteriores diziam que ou a *Giardia* nunca teve o endossimbionte, tendo divergido antes deste evento, ou ainda que ela o houvesse perdido secundariamente. O que se acredita atualmente é que *Giardia* teve a mitocôndria, porém devido ao ambiente onde habitava (praticamente anaeróbico), esta se tornou irrelevante e perdeu praticamente todas as suas funções e seu formato característico (Tovar *et al.*, 2003; 1999).

Proteínas características do Aparelho de Golgi já puderam ser evidenciadas em *Giardia lamblia* usando técnicas de imunocitoquímica. Além disso, estruturas similares ao Golgi também puderam ser observadas durante o processo de encistamento através de deep-etching (Lanfredi-Rangel *et al.*, 1999; Marti *et al.*, 2003 a e b).

5. Encistamento de *Giardia lamblia*

O metabolismo celular dos cistos de *Giardia lamblia* contribui para a sua permanência fora do organismo hospedeiro por períodos prolongados e sob condições extremas (Bingham & Meyer, 1979). O processo de encistamento, também chamado de diferenciação, ocorre após a divisão dos núcleos, porém antes da citocinese. É por esse motivo que podemos encontrar cistos que contenham de dois a quatro núcleos, sendo que somente estes últimos são considerados maduros. Os cistos apresentam também uma parede, a qual é composta de uma camada filamentosa externa e uma camada membranosa interna (duas membranas). Quatro

proteínas majoritárias compõem a porção externa da parede (CWPs – Cyst Wall Proteins/proteínas de parede cística). Além disso, o açúcar predominante é a N-acetilgalactosamina (GalNAc). No ambiente, os cistos têm somente de 10 a 20 % da atividade metabólica total do trofozoíto.

Durante a formação da parede cística, os trofozoítos sofrem importantes mudanças, que podem ser divididas em três estágios: i) recepção do estímulo e ativação dos genes específicos de encistamento; ii) biogênese de organelas secretórias e a síntese, empacotamento, transporte e liberação do material da parede cística; e iii) formação da parede cística na superfície celular. Outros importantes processos também ocorrem durante o encistamento, incluindo a divisão nuclear e a internalização do disco adesivo (revisto por Luján, 1997).

Na literatura de [vazio], ainda são discutíveis os dados de qual(is) seria(m) realmente os estímulos para o encistamento. A principal vertente defende que a expressão de CWPs (proteínas de parede cística em [vazio]), as quais são marcadoras do processo de encistamento, podem ser detectadas após 90 minutos de incubação em um meio de cultura deficiente em lipoproteínas. Neste caso, o encistamento é interrompido quando colesterol é adicionado ao meio de cultivo, levando à conclusão de que o encistamento é promovido devido à carência de colesterol (Luján, 1996). Porém outro grupo conseguiu demonstrar, também [vazio], que a adição de ácidos graxos e sais biliares ao meio de cultura, conjugados ao pH 7.8, mimetizariam as condições encontradas pela [vazio] no jejuno, o que daria início ao processo de encistamento (Gillin, 1987). Entretanto, ainda não se chegou a um consenso em relação a esses estímulos.

Nos eucariotos superiores, proteínas destinadas à secreção são dobradas, estruturadas e glicosiladas, sendo posteriormente transportadas do retículo endoplasmático através do aparelho de Golgi para a superfície celular (Haas, 1994; revisto por Alberts, 2002). Em

, a única evidência de secreção contínua é a liberação de proteínas variantes de superfície no meio extracelular (Luján et al., 1995; Nash, 1992, 1988). Entretanto, como já foi mencionado anteriormente, a formação de cisternas características do Golgi ocorre durante o processo de encistamento. A estruturação dessa organela e o desempenho de sua função específica, que é a atividade enzimática de processamento dos carboidratos, estão relacionados ao surgimento das vesículas específicas de encistamento. Essas vesículas transportam componentes da parede celular para a membrana plasmática da célula na fase de diferenciação e liberam seus conteúdos no exterior da célula durante a formação da parede cística (Gillin et al., 1991; revisto por Gillin et al., 1996). Inicialmente, a formação das vesículas específicas de encistamento ocorre através do acúmulo de conteúdos da parede cística em fendas do retículo endoplasmático (ou), as quais vão adquirindo formato poligonal até se arredondarem por completo.

A forma pela qual essas vesículas específicas de encistamento contendo componentes de parede são liberadas ainda permanece desconhecida, provavelmente porque este processo ocorre de maneira rápida e sincronizada. As vesículas periféricas estão presentes durante todos os estágios do encistamento, e recentemente vem sendo estudada uma possível relação entre essas vesículas e o processo de diferenciação. Elas participam da clivagem da CWP2 após sua interação com as vesículas de encistamento (revisto por Luján et al., 1997), armazenando ou processando os componentes de parede (Lanfredi-Rangel et al., 2003).

6. Quimioterapia antiparasitária: *Giardia* no alvo das drogas.

É sabido que infecta aproximadamente 2% dos adultos e de 6 a 8% de crianças em países em desenvolvimento (Kramer et al., 1996). Entretanto, até hoje ainda não existe um protocolo definido para terapia contra a giardíase. Por esse motivo, serão descritas a

seguir tanto as drogas mais comumente usadas no tratamento, bem como as que já foram empregadas anteriormente e aquelas em fase de teste. Algumas medicações são empregadas pela sabedoria popular e alguns exemplos e seus respectivos efeitos foram testados pelos métodos científicos, o que também será abordado nesta seção.

6.1. Metronidazol (Flagyl[®]): a droga de escolha

Metronidazol (1- (2-hidroxi-5-nitroimidazol-2-íli)-2-metil-nitroimidazol; Flagyl[®]), um composto pertencente ao grupo dos nitroimidazóis, é mundialmente a droga de escolha para o tratamento da giardíase. Essa classe de fármacos foi descoberta em 1955 e se mostrou altamente eficaz no tratamento da amebíase (*Entamoeba histolytica*) e da trichomoníase (*Trichomonas vaginalis*), e só posteriormente, em 1962, foi reportado seu uso no tratamento da giardíase (Darbon *et al.*, 1962).

O metronidazol é uma substância de cadeia cíclica que possui um grupamento nitro, o qual precisa ser reduzido para se tornar ativo e causar danos à célula. A droga utiliza uma via metabólica anaeróbica presente em *Entamoeba histolytica*, participando como um aceptor final de elétrons doados pela ferredoxina (molécula transportadora de elétrons do parasito), a qual é reduzida pela piruvato:ferredoxina oxidoreductase (PFOR) (figura 4). Um intermediário reduzido altamente tóxico é formado, ligando-se covalentemente ao DNA e interagindo com outras macromoléculas essenciais, causando quebra da fita e ligação cruzada (Müller, 1983; Docampo & Moreno, 1986; Smith *et al.*, 1988). O metronidazol, portanto, entra no organismo do hospedeiro de forma inativa e, somente após ter sido metabolizado pela célula alvo acarretará efeitos à mesma. Esse processo diminui as chances de que o grupamento nitro se torne ativo fora do parasito anaeróbico e atinja as células do hospedeiro. Todos esses efeitos são aplicáveis aos trofozoítos, já que os cistos são menos afetados pela droga, provavelmente

devido à pouca penetração desta através da parede que os envolve, embora não tenha sido diretamente testado (Liu *et al.*, 2000).

Vários efeitos colaterais são ocasionados aos pacientes, dentre eles gosto metálico na boca, dores de cabeça, náusea, vômitos, etc. O tratamento não é prolongado, e o período a que o paciente é submetido varia de acordo com a dose do fármaco a ser administrada. Até hoje o uso do metronidazol não foi aprovado pela FDA (US Food and Drug Administration). Entretanto, continua sendo a droga de escolha devido à sua eficácia no tratamento das doenças causadas pelos protozoários anaeróbicos.

Embora a redução do grupamento nitro da droga esteja restrita ao metabolismo do parasito alvo, vários casos de toxicidade em mamíferos têm sido demonstrado. Metronidazol também foi apontado como responsável por efeitos mutagênicos em bactérias e carcinogênicos em humanos. Pacientes submetidos ao tratamento apresentaram altas taxas de câncer de pulmão, dado este evidenciado pelo acompanhamento dos indivíduos ao longo de onze anos (Bendesky *et al.*, 2002). No caso de resistência de *Trichomonas vaginalis* ao metronidazol é necessário aumentar as doses administradas ao paciente durante a infecção. Isso se dá porque possivelmente ocorre diminuição da atividade da piruvato:ferredoxina oxidoreductase, enzima necessária para a ativação dos nitroimidazóis no metabolismo do parasito (Ellis *et al.*, 1992; Upcroft & Upcroft, 1993).

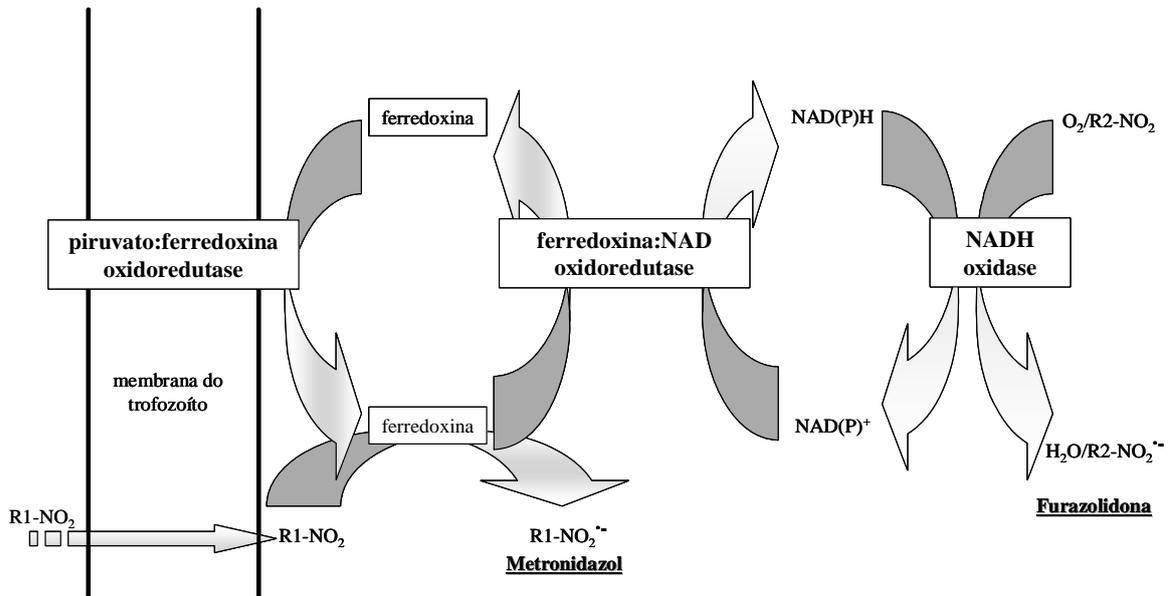


Figura 4: A via de transporte de elétrons proposta para a ativação do metronidazol. Elétrons derivados da descarboxilação oxidativa do piruvato (catalisado por uma piruvato:ferredoxina oxidoreductase associada à membrana) são transferidos para a ferredoxina (oxidada), a qual doa posteriormente elétrons para NAD(P)⁺ (catalisado por uma possível ferredoxina:NAD oxidoreductase (FNR), regenerando então o “pool” intracelular de NAD(P)H e ferredoxina oxidada. Alternativamente, ferredoxina tem um potencial de redox suficientemente baixo para reduzir (ativar) o metronidazol (R1-NO₂) para o seu radical nitro tóxico (R1-NO₂•). Adaptado de Ellis *et al.*, 1992 (Ellis *et al.*, 1992).

6.2. Fármacos alternativos para o tratamento da giardíase

6.2.1. Outros da classe dos nitroimidazóis

Desse grupo de fármacos, o **tinidazol** (Fasigyn[®]) foi o que demonstrou efeitos *in vitro* tão significantes quanto o metronidazol e, embora seja o único membro dessa classe disponível para o tratamento da giardíase nos EUA, também não tem seu uso aprovado pela FDA devido aos efeitos colaterais.

Ornidazol (Tiberal[®]) apresenta excelentes resultados quando administrado por vários dias; em dose única também é eficaz (92-100%), assim como o **secnidazol**, ainda que ambos igualmente não sejam recomendados pela FDA. Entretanto, o fato de terem meias-vidas mais longas reduz a toxicidade desses compostos em relação ao metronidazol, o que os torna propícios para o tratamento em dose única. Os principais efeitos colaterais são distúrbios gastrintestinais como náusea, anorexia e dores no abdômen.

6.2.2. Quinacrina (Atabrina)

Foi primeiramente utilizada no tratamento contra a malária, em 1930, tornando-se a droga de escolha contra esta doença para as tropas aliadas na Segunda Guerra Mundial devido à sua fácil disponibilidade e melhor tolerância em relação à quinina.

O mecanismo de ação da quinacrina ainda não está totalmente elucidado. É sabido que a droga se intercala no DNA da *Giardia lamblia* e é essa interação que provavelmente causa inibição da síntese de ácido nucléico (Tracy *et al.*, 1996). A toxicidade da droga é seletiva, já que o que difere é a taxa de captação entre as células do parasito e do hospedeiro (Thompson *et al.*, 1993). *In vitro*, a quinacrina reduz a viabilidade dos cistos e a porcentagem de excistamento. A resistência a esse composto foi induzida em culturas e está relacionada à diminuição da incorporação da droga (Upcroft *et al.*, 1996).

Alguns estudos demonstraram que a quinacrina é mais eficaz in vitro do que metronidazol e furazolidona (Boreham

6.2.4. Benzimidazóis

Dois membros dessa classe de fármacos são utilizados no tratamento da giardíase: o **albendazol (Albenza[®])**

6.2.6. Bacitracina complexada a sais de zinco

Bacitracina é um antibiótico que foi primeiramente isolado em 1945 e que teve seu uso prolongado até o período de 1960. Era amplamente usado nas infecções severas de devido à ausência de outros antibióticos menos tóxicos disponíveis. Posteriormente, sais de zinco foram adicionados à bacitracina para proporcionar um complexo mais estável. Esta droga interfere na síntese da membrana celular e, após terem sido demonstrados efeitos in vitro contra e , a bacitracina foi testada contra e também se mostrou ativa in vitro (Andrews , 1994).

A desvantagem de se usar bacitracina é que ela causa muita toxicidade aos rins e também distúrbios gastrointestinais quando administrada com prolongadas doses orais. Portanto, a descoberta, mesmo desse complexo com zinco, não foi suficiente para que a bacitracina fosse amplamente aceita como tratamento.

6.3 Drogas emergentes em *Giardia*

6.3.1. Compostos sintéticos

Vários agentes como **rifampina**, **bithionol**, **diclorofeno**, **hexaclorofeno**, **pirimetamina**, **fusidato de sódio**, **cloroquina** e **mefloquina**, têm demonstrado efeitos in vitro contra (Farthing, 1992; Farthing & Inge, 1986; Takeuchi , 1985). Tetraciclina lipofílica, como **doxiciclina**, são altamente ativas ; porém, sua eficácia clínica é limitada devido à sua rápida absorção intestinal (Edlind, 1989). Certos análogos de pentamidina, como **azitromicina**, teve seus efeitos in vitro similares aos do metronidazol (Boreham & Upcroft, 1991).

Nitazoxanida, um derivado do 5-nitrotiazol com amplo espectro contra protozoários, helmintos e algumas bactérias, apresentou eficácia limitada em adultos e crianças no México, em taxas de 71 e 78%, respectivamente (Cabello et al., 1997).

Estudos utilizando ratos como modelos demonstraram a eficácia da **ivermectina** sob condições específicas (Youssef et al., 1996). **Dissulfiram**, um composto utilizado no tratamento do alcoolismo em humanos, demonstrou cura significativa e diminuição da carga parasitária em modelos de camundongo (Nash & Rice, 1998).

6.3.2. Fitoterápicos

Pesquisas usando conhecimentos etnobotânicos anti-*Leishmania* de uma tribo do leste africano demonstraram que extratos metanólicos de 21 dos 36 taxa analisados proporcionaram efeitos letais ou inibitórios no crescimento desse protozoário (Johns et al., 1995). Outras fontes provenientes da sabedoria popular, como alho (*Allium sativum*) e orégano (*Origanum onites* spp.), por exemplo, também foram testados em culturas de *Leishmania* e apresentaram efeitos na viabilidade deste parasito (Ankri & Mirelman, 1999; Harris et al., 2000; Ponce-Macotella et al., 2006).

7. Drogas emergentes e promissoras na quimioterapia de protozoários parasitos

A procura por drogas que inibam o crescimento e a proliferação, tanto *in vitro* como *in vivo*, de parasitos tem aumentado a cada dia. Por este motivo, alguns compostos foram desenvolvidos especialmente para atingir determinado metabolismo do parasito alvo, como foi o caso dos azoles para os fungos, por exemplo. Entretanto, alguns testes posteriores foram promovidos em outros organismos, sendo que alguns demonstram efeitos positivos.

Um exemplo interessante de ser explorado é o caso dos **ácidos zaragóxicos (AZ)**. Esta é uma classe de drogas que foi utilizada primeiramente para impedir a síntese de colesterol e diminuir os níveis deste nos primatas, e são potentes inibidores de duas reações catalisadas pela enzima *HMG-CoA reductase*, a qual está relacionada diretamente à biossíntese de esteróis (figura 5). Os esteróis são importantes na manutenção da fluidez das membranas, e estão presentes em células eucarióticas. A estrutura dessas drogas é similar à molécula de pré-squaleno pirofosfato (p-SP), onde ambos apresentam um núcleo central ácido com duas longas cadeias hidrofóbicas, levando à hipótese de que os AZs inibiriam competitivamente a SQS por mimetizarem o p-SP, ligando-se a ela. Esses ácidos zaragóxicos também possuem atividade anti-fúngica, bloqueando a biossíntese de ergosterol (Bergstrom *et al.*, 1995; Hiyoshi *et al.*, 2000). Outros inibidores da SQS, como o (3-bifenil-4-il)-quinuclidina (BPQ-OH), ER-119884 e E5700 vêm sendo testados em tripanossomatídeos e Apicomplexa visando reduzir também as taxas de esteróis desses protozoários (Braga *et al.*, 2004; Urbina *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005; Martins-Duarte *et al.*, 2006).

Os **azasteróis** também são um grupo de compostos que foram inicialmente desenhados e sintetizados visando o metabolismo de esteróis de fungos (Oehlschlager *et al.*, 1984). O alvo seria a enzima *lanosterol 14 α -demethylase*, a qual está diretamente relacionada à síntese especificamente de lanosterol (figura 5), esterol este presente somente em fungos e em tripanossomatídeos. Os azasteróis também causam inibição na proliferação de protozoários como *Leishmania* e *Trypanosoma* (Rodrigues *et al.*, 2002; Urbina *et al.*, 1995, 1996), bem como acarretaram efeitos ultraestruturais nos mesmos, principalmente tendo as mitocôndrias desses parasitos como alvos preferenciais.

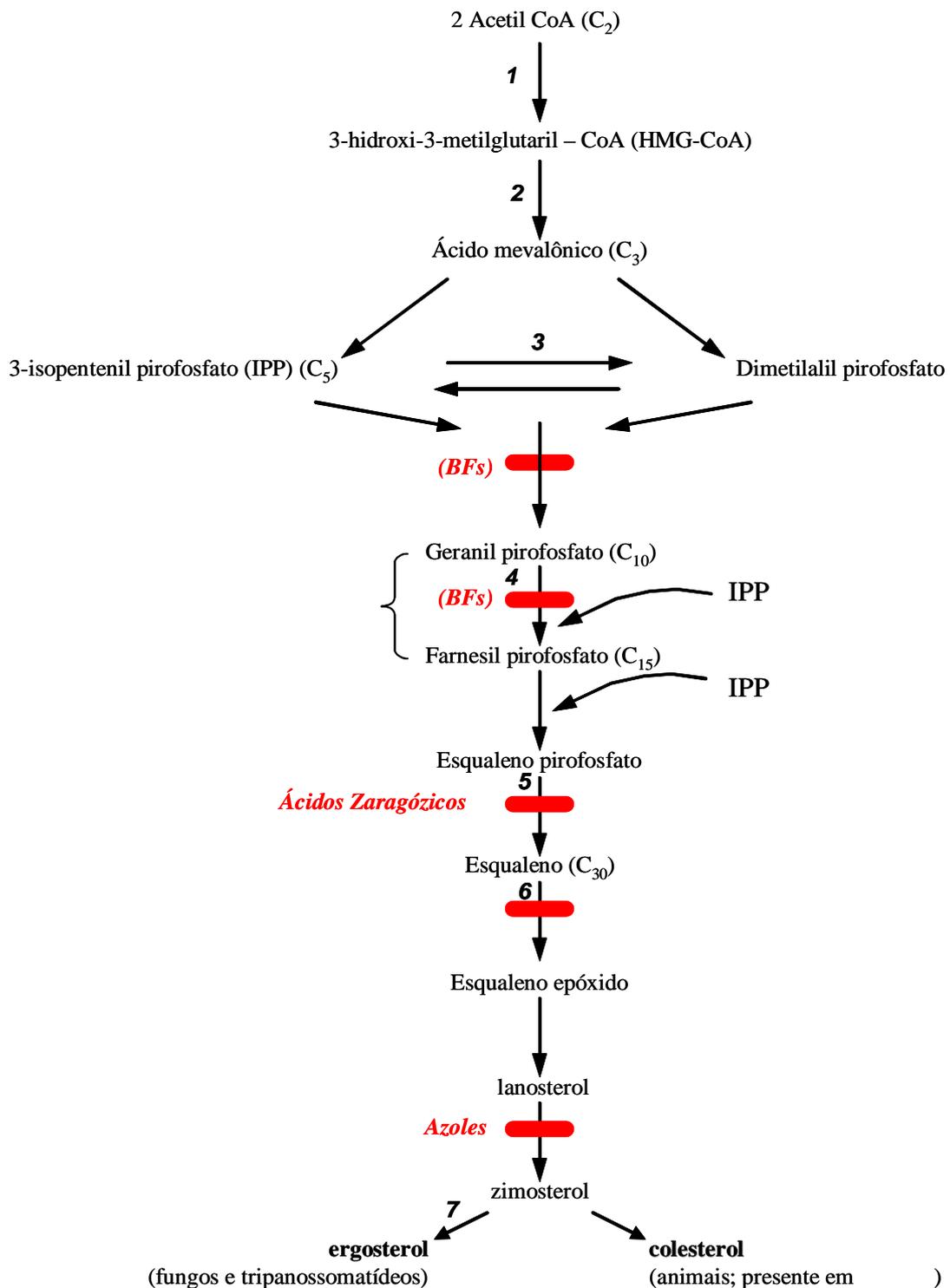


Figura 5: Início da via de biossíntese de esteróis. As enzimas catalisadoras dos compostos estão enumeradas e seus respectivos inibidores aparecem em destaque. 1 – HMG-CoA sintase; 2 – HMG-CoA redutase; 3 – IPP isomerase; 4 – Farnesil pirofosfato sintase (prenil transferase); 5 – esqualeno sintase (SQS); 6 – esqualeno epoxidase; 7 – S-adenosil-L-metionina ²⁴⁽²⁵⁾-esterol metiltransferase (24-SMT). Adaptado de Barret-Bee & Ryder, 1992.

Entretanto, estas drogas demonstraram efeitos significativos na proliferação de *Leishmania*, um protozoário pertencente ao grupo dos apicomplexa e que não possui ergosterol na composição de suas membranas, mas sim colesterol (Dantas-Leite *et al.*, 2004; DeSouza *et al.*, 2005). Mais recentemente, em estudos com o tripanossomatídeo *Trypanosoma*, foram relatadas alterações ultraestruturais em seu endossimbionte, o qual não possui qualquer esterol em suas membranas, assim como as bactérias (Palmié-Peixoto *et al.*, 2006). Em ambos os casos, a composição de fosfolipídeos nas membranas foi alterada, sugerindo um alvo metabólico alternativo para ação dos azasteróis nas células que não a biossíntese de esteróis.

Alguns compostos análogos ao pirofosfato, os chamados **bisfosfonados (BF)**, atuam na *mevalonato*, enzima esta também conhecida como *HMG-CoA sintase*, e inibem tanto a formação de *mevalonato* como de *isoprenóides* (figura 5) (Docampo & Moreno, 2001; Szajnman *et al.*, 2003). Ao contrário do pirofosfato, os BFs apresentam grande estabilidade metabólica devido ao fato de não serem hidrolisados por pirofosfatases. Apesar de serem usados por mais de trinta anos, só recentemente é que foi elucidado o mecanismo de ação dos BFs, que é a via de isoprenóides. O processo de isoprenilação de proteínas consiste na ligação dos grupos farnesil e geranilgeranil a resíduos C-terminais da cisteína de várias proteínas, como pequenas GTPases tipo Ras, Rac, Rab e Rho, dando origem a proteínas farnesiladas e geranilgeraniladas. Esses grupamentos prenil ligados às proteínas são responsáveis pelo ancoramento de proteínas às membranas, atuando também em interações proteína-proteína. Essas moléculas são sinalizadores importantes e estão envolvidas em processos cruciais para o funcionamento de células como os osteoclastos, por exemplo. Os BFs são inibidores eficazes da reabsorção óssea e por esse motivo são usados atualmente no tratamento de várias doenças, dentre elas a osteoporose (Emkey & Ettinger, 2006).

Esses BFs também têm sido estudados em *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonax axosolus* e *Trichomonas tenax* e os resultados demonstram grande eficácia desses fármacos na inibição da proliferação desses protozoários (Martin *et al.*, 2001). A incubação de *Giardia lamblia* com o bisfosfonado risedronato com adição de outro inibidor da biossíntese de esteróis, o cetoconazol, resultou em uma depleção de esteróis endógenos, levando à completa inibição do crescimento do parasito e, por fim, à lise celular (Docampo & Moreno, 2001). Efeitos seletivos também puderam ser obtidos a partir de ensaios de infecção de *Giardia lamblia* em células Vero e em tecidos cardíacos murinos com risedronato (Garzoni *et al.*, 2004).

8. Metabolismo lipídico de *Giardia lamblia*

Ao contrário dos fungos e tripanossomatídeos, os parasitos amitocondriados como *Giardia lamblia* spp., *Trichomonas vaginalis* spp. e trichomonadídeos, não possuem ergosterol, mas sim o colesterol, a mesma molécula presente nas células de mamíferos. O colesterol está presente em *Giardia lamblia* tanto em sua forma trofozoítica quanto em sua forma cística (Das *et al.*, 2002).

Paget *et al.* (1990; 1993) reportaram que, sob condições anaeróbicas, *Giardia lamblia* metaboliza glicose em etanol e alanina. Entretanto, na presença de oxigênio (baixas concentrações, não trazendo danos às células) os produtos finais são acetato e CO₂, em sua maioria. A produção de acetato a partir de glicose na presença de O₂ poderia render moléculas de ATP extras (Coombs & Müller, 1995), o que poderia ser utilizado para iniciar a biossíntese de lipídeos ou de vias mais complexas. Entretanto, sempre foi muito discutida a capacidade de síntese lipídica desses organismos microaerófilos, e uma regulação por um sistema sensor de altas e baixas concentrações de O₂ foi sugerida por Keegan & Blum (1990).

Em estudos feitos por Jarroll *et al.* (1981) foram usados precursores radioativos para monitorar a síntese de lipídeos e de ácidos graxos pela *Giardia lamblia*. Foi visto que o

colesterol foi rapidamente incorporado pelos trofozoítos quando adicionado ao meio. Contudo, a molécula de acetato (acetil CoA), precursora da biossíntese de esteróis em células de mamíferos e outros parasitos e plantas (Figura 5), foi incorporada em quantidades muito pequenas. Esses resultados foram os primeiros a indicar que ***Giardia* seria incapaz de sintetizar lipídeos *de novo***, sugerindo a incorporação das moléculas através da dieta do hospedeiro. Nesse mesmo estudo também há evidências de que a acetil CoA criada durante o metabolismo de glicose não é utilizada pelas vias biossintéticas de lipídeos.

No meio de cultivo de *Giardia*, o TYI-S-33, os lipídeos são provenientes, em sua maioria, de lipoproteínas presentes no soro bovino adulto, o qual é adicionado ao sistema como suplemento. A maior parte do colesterol proveniente do soro está associada às lipoproteínas, porém uma pequena fração pode ser encontrada em micelas mistas com fosfolipídeos, glicerídeos e ácidos graxos. É sabido que a adição de pequenas quantidades de sais biliares ao meio de cultura contendo soro estimula a proliferação desse protozoário, mais possivelmente por aumentar a transferência de lipídeos do meio para o parasito (Luján *et al.*, 1996a; Farthing *et al.*, 1985; Schupp & Erlandsen, 1987). Essas pequenas quantidades de sais de bile presentes no soro estão associadas à albumina e são transportadas juntamente com a mesma. Além disso, se um excesso de sais biliares for adicionado ao sistema, acima das concentrações em que a albumina possa carrear-los, o colesterol e alguns fosfolipídeos são removidos das lipoproteínas para formar micelas com os sais de bile, os quais são preferencialmente captados pelos parasitos (Luján *et al.*, 1996a).

Em 1996, Luján e colaboradores (Luján *et al.*, 1996b) demonstraram que a adição de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) no meio de cultura de trofozoítos de *Giardia* propiciava o crescimento do parasito, e que essas lipoproteínas teriam sido captadas mais provavelmente por endocitose mediada por receptor. Anticorpos anti-LDL humanos foram eficazes na imunoprecipitação de proteínas dos

trofozoítos, sugerindo que receptores LDL humanos (ou proteínas ligadoras) devem estar presentes em *Leishmania* e envolvidos no transporte de lipoproteínas do meio de cultura.

Apesar de ter sido proposto que os trofozoítos de *Leishmania* seriam incapazes de sintetizar fosfolípidos, ácidos graxos e colesterol *de novo*, foi visto que este protozoário é ainda capaz de captar do meio de cultivo glicerofosfolípidos (GFLs) e análogos de ácidos graxos (Stevens *et al.*, 1997). Em certos tecidos de mamíferos, fosfolipases celulares geram, a partir de GFLs, lisofosfolípidos (LFLs) e ácidos graxos livres, os quais são então reciclados para produzir fosfolípidos e ácidos graxos novos ou modificados, em uma via denominada **Ciclo de Lands**. Em mamíferos, os ácidos graxos formados pelo ciclo de Lands, como o ácido araquidônico, por exemplo, servem como precursores de biossínteses de eicosanóides e prostaglandinas. Resultados recentes sugeriram que *Leishmania* também seria capaz de fazer reações de desacilação/reacilação, tal qual as do ciclo de Lands, para gerar novos fosfolípidos (Das *et al.*, 2001). O fato de esta via operar eficazmente neste parasito é importante principalmente devido a sua síntese *de novo* muito limitada.

Durante o processo de encistamento ocorrido em *Leishmania* inúmeras mudanças podem ser observadas em se tratando de lipídeos, como aumento da insaturação de ácidos graxos e o acúmulo de lipídeos de estoque, por exemplo. Isso seria consistente com a fase de diferenciação do parasito para cisto, permitindo a este a sobrevivência em ambientes de baixas temperaturas e com poucas fontes de nutrientes. Foi mostrado, também, que *Leishmania* tem não só a capacidade de sintetizar lipídeos isoprenóides *de novo*, mas também pode metabolizar ácidos graxos através da adição de ligações duplas (Ellis *et al.*, 1996; Luján *et al.*, 1995 b). Este fato poderia abrir caminho para testes com drogas que teriam como alvo este segmento do metabolismo do parasito.

9. Poliaminas

Poliaminas (PAs) são, por definição, moléculas não protéicas, de baixo peso molecular, de cadeia alifática e nitrogenadas, fato este que lhes atribui carga positiva. A designação desses compostos, sendo que alguns são diaminas e triaminas, torna o termo “poliamina” não apropriado. Para tal surgiram propostas de que passassem a ser chamadas de “oligoaminas”, contudo este termo não obteve grande aceitação e o vocábulo “poliamina” é até hoje utilizado (Cohen, 1998).

As poliaminas foram descobertas e caracterizadas em 1930 e compreendiam cinco principais componentes: putrescina, espermidina, espermina, cadaverina e 1,3-diaminopropano (figura 6), sendo que as três primeiras são as mais conhecidas e seus papéis celulares melhor compreendidos. Putrescina e cadaverina são diaminas (1,4-diaminobutano e 1,5-diaminopentano, respectivamente) e eram tidas como produto final do metabolismo de bactérias. Já espermidina é uma triamina e a espermina é uma tetramina, e ambas são moléculas derivadas da putrescina (figura 6).

As aminas presentes nesses compostos contribuem para que eles apresentem carga positiva, fazendo com que tenham afinidade por moléculas e regiões ácidas e de carga negativa nas células, inclusive as membranas, devido à interação com os fosfolípidos (Igarashi & Kashiwagi, 2000; Tabor & Tabor, 1984). As poliaminas também têm a capacidade de modular as funções de importantes moléculas nas células, como RNAs (mensageiro, transportador e ribossomal), DNA, nucleotídeos trifosfato, proteínas e outras substâncias ácidas. Por exemplo, elas promovem mudanças na conformação estrutural do RNA na região onde há formação de dupla-fita a fim de estabilizá-los, atuando como cofatores na síntese protéica de células de mamíferos (Igarashi & Kashiwagi, 2000). Esses e outros fatores tornam as poliaminas indispensáveis para a manutenção da viabilidade celular

(quando presente em baixas concentrações) e para estimular a proliferação das células (quando em altas concentrações).

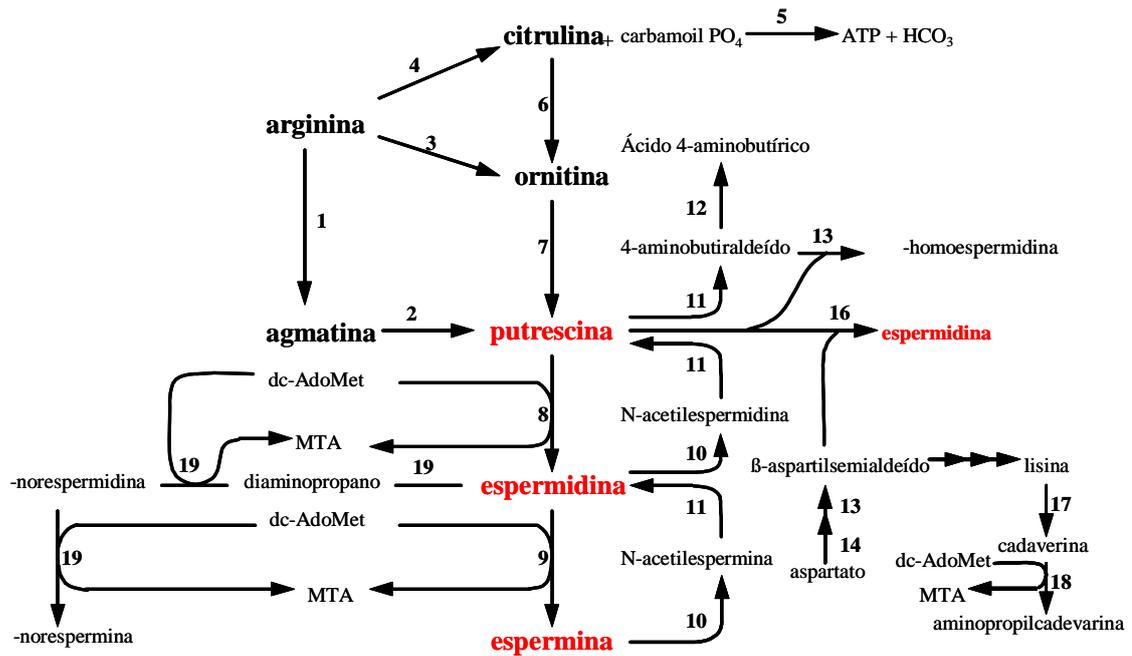


Figura 6: Biossíntese de poliaminas e seus análogos. 1- arginina descarboxilase; 2- agmatina deiminase; 3- arginase; 4- arginina deiminase; 5- carbamoil fosfato cinase; 6- ornitina carbamoil transferase catabólica; 7- ornitina descarboxilase; 8- espermidina sintase; 9- espermina sintase; 10- poliamina acetilase; 11- diamina oxidase; 12- aldeído desidrogenase; 13- reações exclusivas de algumas arqueobactérias; 14- aspartato cinase; 15- aspartil-fosfato desidrogenase; 16- aspartil semialdeído desidrogenase; 17- lisina descarboxilase; 18- aminopropil cadaverina sintase; 19- reações exclusivas de . MTA, metiltioadenosina, *dc-AdoMet*, S-adenosilmetionina descarboxilada. Adaptado de Yarlett , 1988.

Em pH fisiológico as poliaminas encontram-se protonadas, apresentando carga positiva em cada átomo de nitrogênio e atuando como “supercátions” equivalentes e uma ou duas moléculas de cálcio ou magnésio. Entretanto, as cargas das poliaminas estão distribuídas ao longo de sua cadeia, tornando-as únicas e distintas das cargas pontuais presentes nos cátions inorgânicos bivalentes (Wallace , 2003). As cargas positivas permitem às poliaminas interagir eletrostaticamente com macromoléculas aniônicas dentro da célula.

Poliaminas como a putrescina, espermidina e espermina estão envolvidas em processos biológicos fundamentais como transcrição, tradução, diferenciação e proliferação celulares. O requerimento de PAs por células em atividade proliferativa motivou numerosos estudos empregando antagonistas metabólicos na busca de mecanismos citostáticos/carcinostáticos (Davidson ., 1999; Thomas & Thomas, 2001). Além dos diferentes papéis biológicos das poliaminas, as vias de síntese e conversão destas diferem consideravelmente entre os procariotos, eucariotos inferiores e os organismos considerados superiores, constituindo alvos terapêuticos potenciais (Müller , 2001).

Devido à sua carga, tanto a espermidina como a espermina podem formar pontes dentro das fendas maiores e menores do DNA, atuando como um grampo entre duas cadeias diferentes ou entre duas partes distantes da mesma molécula (Tabor & Tabor, 1984). Análogos de poliaminas como o bis(etil)homoespermina (BEHSpm) alteram a matriz do DNA nuclear, sugerindo que as poliaminas não só afetam a estrutura do DNA, como também a sua função (Basu ., 1993). Além destas funções, as poliaminas favorecem a formação da hélice tripla no DNA, sugerindo um mecanismo pelo qual estes policátions regulam a transcrição de genes regulatórios do crescimento (Hampel ., 1991).

Além de interagir com moléculas do DNA e RNA, as poliaminas podem interagir também com fosfolípídeos ácidos nas membranas (Schuber, 1989), aumentando a sua rigidez através da formação de complexos com fosfolípídeos e proteínas. Também possuem um papel

anti-oxidante, prevenindo a peroxidação de lipídeos (Tadolini, 1988). Poliaminas estão ainda envolvidas na regulação de muitas enzimas associadas à membrana, incluindo a adenilato ciclase e alguns canais iônicos (Williams, 1997).

Poliaminas diminuem o processo de auto-oxidação, inibindo o dano oxidativo ocasionado por radicais livres. Khan *et al.*, 1992 a e b, propuseram que uma função primária das poliaminas seria a de proteger o DNA e o RNA contra o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2^*$). Os autores apresentaram evidências de que as poliaminas são capazes de quelar quimicamente o $^1\text{O}_2^*$, protegendo o DNA dos danos causados por esta espécie de oxigênio altamente reativa. Confirmando estes resultados, Ha *et al.* (1998), utilizando espectrometria de massa, observaram uma interação direta entre poliaminas e oxigênio singlete, sugerindo seu papel na proteção do DNA contra radicais livres (Tkachenko & Nesterova, 2003). A atividade de enzimas da biossíntese de poliaminas e de seus produtos é aumentada em células de *S. cerevisiae* em resposta ao estresse oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio. Putrescina e espermidina adicionados ao meio de cultura em concentrações fisiológicas aumentam significativamente a expressão dos genes *R* e *G*, responsáveis pela ativação de genes de enzimas que atuam contra o estresse oxidativo, como a hidroperoxidase I e glutathione redutase. O mesmo grupo já havia demonstrado que 1,4-diamino-2-butanona (DAB), um inibidor específico da ornitina descarboxilase (ODC, EC 4.1.1.17), possui um efeito inibitório sobre a expressão de *R* em condições de estresse oxidativo, efeito que é revertido pela adição de putrescina.

9.1. Via de produção de poliaminas

As poliaminas são moléculas ubíquas, podendo ser encontradas em vários tipos celulares, desde bactérias, plantas, fungos, eucariotos unicelulares, até mamíferos. Entretanto,

o que as diferencia não é o tipo de molécula presente em cada um desses diferentes organismos, mas sim o modo como são produzidas e/ou incorporadas, e em que quantidades estão presentes.

Em células de mamíferos, a síntese das poliaminas é iniciada a partir da descarboxilação do aminoácido **ornitina** pela enzima **ornitina descarboxilase** (ODC), para a formação da primeira poliamina da via, a putrescina (figura 6). Em plantas, fungos, muitos procariotos e, possivelmente, , a **agmatina**, a qual é derivada da descarboxilação da arginina, é o precursor da putrescina (Pegg & McCann, 1982; Pegg & McCann, 1992).

Para a formação de espermidina, a enzima espermidina sintetase catalisa a reação de transferência de um grupamento aminopropil proveniente da S-adenosilmetionina descarboxilada (S-AdoMet) (figura 6). O mesmo processo ocorre para a formação da espermina, entretanto a enzima envolvida é a espermina sintetase, liberando também metiltioadenosina proveniente da S-AdoMet descarboxilada. Essas reações de aminopropil transferase são irreversíveis; todavia, a espermidina e a espermina podem ser convertidas novamente à putrescina através das ações combinadas de espermidina/espermina-1-N-acetil transferases (Pegg & McCann, 1982; Pegg & McCann, 1992).

O primeiro passo da síntese de poliaminas em células de mamíferos é catalisado pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), a qual descarboxila a ornitina formando a putrescina. Em mamíferos esta enzima tem meia-vida de aproximadamente dez minutos. O gene que codifica a ODC é considerado um possível proto-oncogene crucial para a regulação do crescimento e diferenciação celulares. A inibição específica da ODC é um dos mais eficientes mecanismos para inibir a síntese de poliaminas (Mitchell , 1998).

A putrescina é convertida em espermidina e esta, por sua vez, em espermina. Em ambas as conversões um grupo aminopropil é adicionado. O doador do resíduo aminopropil é

a S-Adenosilmetionina descarboxilada, a qual é gerada a partir da S-adenosilmetionina, que sofre uma descarboxilação catalisada pela AdoMetDC (S-Adenosilmetionina descarboxilase, EC 4.1.1.50), que assim como a ODC, é uma das enzimas-chave do metabolismo de poliaminas e possui uma meia-vida curta. Os grupos aminopropil são adicionados por aminopropil transferases específicas – espermidina e espermina sintetase, respectivamente, e 5-metiladenosina (MTA) é obtida como subproduto. Este é normalmente reciclado a metionina e adenina em um quinto passo (revisto por Bacchi & Yarlett, 2002).

As reações de aminopropil transferases que geram espermidina e espermina são irreversíveis. No entanto, as poliaminas podem ser convertidas e degradadas de volta a putrescina pela ação de duas enzimas: poliamina oxidase – PAO (dependente de FAD) e espermidina/espermina-N¹-acetil transferase (SSAT). Esta última catalisa a conversão de espermina em N¹-acetilespermina, que é degradada pela poliamina oxidase, originando espermidina e acetamidopropanal. Da mesma forma, a SSAT atua sobre a espermidina formando N¹-acetilespermidina, que é degradada em putrescina e 3-acetamidopropanal (Marton & Pegg, 1995).

Há muito se conhece que concentrações intracelulares de poliaminas são reguladas por mecanismos enzimáticos, pela regulação transcricional, traducional e pós-traducional das atividades das enzimas regulatórias da ODC, AdoMetDC e SSAT (Seiler, 1996). A síntese de putrescina é regulada pela disponibilidade de ornitina e pela ODC, enquanto a conversão de putrescina em outras poliaminas é ajustada pela atividade da AdoMetDC. Ambas, ODC e AdoMetDC são reguladas por diferentes estímulos externos e mecanismos de “feedback” (ou retroalimentação) (Müller, 2001). A ODC pode ter sua atividade rapidamente aumentada em resposta a hormônios, fatores de crescimento, drogas, estímulos regenerativos e promotores de tumor (Pegg, 1988; Kaminska, 1990). O aumento da atividade da ODC aumenta a produção de putrescina que, por sua vez, ativa a AdoMetDC

gerando um suprimento de dcAdoMet, garantindo grupos aminopropil para a formação de espermidina (Pegg, 1988).

As três enzimas regulatórias da biossíntese e interconversão de poliaminas – ODC, AdoMetDC e SSAT – apresentam uma taxa de “turnover” muito elevada. Ambas, ODC e a AdoMetDC de mamíferos apresentam a seqüência PEST (Pro-Glu-Ser-thr) e por isso tem uma meia-vida curta (10 a 20 minutos). Esta elevada taxa de “turnover” possibilita que grandes variações nas concentrações das enzimas sejam alcançadas rapidamente quando o estímulo apropriado é aplicado (Pegg, 1988).

Embora a síntese seja a maior fonte de poliaminas dentro das células de mamíferos, o transporte também contribui para a sua homeostase (Wallace, 2003). Mais recentemente, tornou-se claro que o transporte está integrado ao sistema de regulação dos níveis celulares de poliaminas. Em muitas células, como fibroblastos humanos, por exemplo, a captação de poliaminas se dá por mecanismos de transporte saturável e dependente de energia, através de proteínas carreadoras (Wallace, 2003).

Embora algumas células possuam um único transportador para as três poliaminas, a maioria apresenta duas classes de carreadores: um com atividade preferencial para a putrescina e outro para a espermidina e espermina (Seiler et al., 1996). A existência de duas classes de transportadores foi confirmada por estudos de competição, especificidade de substrato e de dependência de íon sódio (Morgan, 1992). Entretanto, os sistemas de transporte de poliaminas transportam moléculas tão diversas quanto o paraquat, MGBG (metilglioxal(bis)benzilhidrazona) e análogos de poliaminas, sendo esta baixa especificidade interessante para o desenvolvimento de drogas citotóxicas (Porter et al., 1984).

Em células deficientes em poliaminas pela inibição das enzimas ODC ou AdoMetDc, observa-se uma rápida incorporação de poliaminas exógenas. Esse aumento no transporte requer a síntese protéica do transportador (Mitchell et al., 1998). Esta indução de

transportadores de poliaminas tem grande importância fisiológica quando há necessidade de elevadas concentrações desses polícatíons para realizar diversos fenômenos biológicos. Linfócitos B, por exemplo, quando entram na fase G1, passam a expressar um transportador de poliaminas, concomitantemente ao aumento da atividade de ODC, pois durante esta fase é necessário o acúmulo de espermidina e espermina para que as células entrem na fase S. Ao término da divisão o conteúdo de poliaminas é dividido entre as duas células filhas (Seiler *et al.*, 1996).

Sob circunstâncias normais as concentrações intracelulares de poliaminas regulam sua própria biossíntese e captação, prevenindo a superprodução por mecanismos de retroalimentação negativa. Altas concentrações de poliaminas exógenas podem levar à morte celular (Brunton *et al.*, 1991).

Células que superexpressam ODC e AdoMetDC são incapazes de regular a captação de poliaminas exógenas, acumulando esses cátions em concentrações tóxicas. Como mecanismo de controle, concentrações intracelulares elevadas de poliaminas levam à indução de uma antienzima (AZ). A AZ é uma pequena proteína regulatória de 23 kDa que se liga à ODC, sendo o complexo AZ-ODC degradado por proteasoma 26S (Murakami *et al.*, 2000). Além do papel da degradação da ODC, uma das três formas de antienzimas já identificadas, a AZ2, também está intimamente associada à regulação negativa do transporte de poliaminas. Desta forma, a antienzima é capaz tanto de inibir a biossíntese como o transporte de poliaminas, evitando o acúmulo tóxico destes cátions no interior da célula (Zhu *et al.*, 1999).

9.2. Poliaminas e o ciclo celular

O motivo pelo qual as células desenvolveram um sistema de regulação de poliaminas tão complexo ainda é desconhecido. Historicamente, acredita-se que as poliaminas têm um papel como fatores no crescimento intracelular, aumentando a taxa de proliferação e

diferenciação celulares. Mais recentemente foi mostrado que as poliaminas também regulam processos de morte celular (Schipper *et al.*, 2000). Desta forma pode-se dizer que as poliaminas funcionam como reguladores bivalentes da função celular, promovendo multiplicação ou morte, dependendo dos sinais provenientes do ambiente.

Há muito é sabido que existem mudanças nas concentrações de ODC e de poliaminas durante o ciclo celular. Há um pico inicial de ODC na fase G₁, seguido de um aumento do conteúdo de poliaminas e, posteriormente, um aumento na fase G₂ antecedendo a mitose. As concentrações intracelulares de poliaminas regulam importantes “checkpoints” dentro do ciclo celular, explicando em parte porque sua concentração é controlada durante o mesmo. Acredita-se também que as poliaminas regulem a degradação de ciclinas (Thomas & Thomas, 2001). Outro fato que confirma o papel das poliaminas no ciclo celular são as altas concentrações destas amins encontradas em células cancerosas. A regulação da ODC, por exemplo, é alterada em muitos tumores, resultando no aumento da sua expressão. Muitos estudos confirmam esse aumento na atividade da ODC e um subsequente aumento nas concentrações intracelulares de poliaminas como um evento inicial na carcinogênese (Wallace & Caslake, 2001).

Estudos mais recentes ligam as poliaminas à morte celular, particularmente à apoptose. No entanto, seus efeitos são complexos: indução e inibição das atividades das enzimas catabólicas estão associadas ao aumento e diminuição da apoptose (Schipper *et al.*, 2000). Harada & Sugimoto, 1997, mostraram que todas as três poliaminas previnem a morte celular induzida por altas concentrações de KCl em neurônios cerebelares de rato. Espermina exógena também previne a apoptose, indicando um papel protetor para as poliaminas. Este efeito protetor pode ser devido à estabilização (Basu *et al.*, 1997) ou proteção do DNA contra o estresse oxidativo (Muscarì *et al.*, 1995) ou pela inibição de endonucleases (Ribeiro & Carson, 1993; Wallace *et al.*, 2003). Apesar de todos os efeitos protetores observados,

poliaminas exógenas em altas concentrações podem ser tóxicas: espermina (2 mM) é tóxica para hepatócitos em cultura (Brunton et al., 1990) e putrescina acima de 1 mM em culturas de *Trypanosoma brucei* (Gillin et al., 1984). Além disso, estudos realizados por Packham & Cleveland (1994), relacionaram aumentos na atividade de ODC à apoptose. Em células HL-60 a espermina ativa a liberação de citocromo c da mitocôndria, inicia a atividade caspase 3, causando a morte celular via apoptose.

9.3. Poliaminas em protozoários

O estudo do metabolismo de poliaminas em diferentes protozoários tem revelado que esta via é um excelente alvo quimioterápico no tratamento de diversas doenças parasitárias. Enzimas dos parasitos exibem propriedades significativamente diferentes das presentes em mamíferos e algumas enzimas que usam poliaminas como substrato são únicas em parasitos, possibilitando o desenho de novas drogas mais seletivas.

Um dos maiores avanços relacionados às poliaminas ocorreu na terapia da tripanossomíase africana, ou doença do sono, sendo particularmente relevante a utilização do DFMO no tratamento da doença experimental provocada pelo *Trypanosoma brucei* em murinos (Bacchi et al., 1980) e *Trypanosoma brucei* em humanos (revisto por Marton & Pegg, 1995). A aprovação desta droga pela OMS (Organização Mundial da Saúde) e pela FDA (Food and Drug Administration) deu grande incentivo aos estudos sobre a síntese de PAs tanto quanto *Trypanosoma brucei*.

Estudos comparativos acerca dos níveis intracelulares de poliaminas em *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma congolense* demonstraram que *Trypanosoma brucei* apresenta as menores concentrações totais desses cátions, em especial a putrescina (Gillin et al., 1984). Entretanto, pouco se sabe a respeito deste microaerófilo parasita.

Trichomonádídeos produzem grandes quantidades de poliaminas tanto como . apresenta altos níveis intracelulares de putrescina e baixos níveis de espermidina e espermina (Yarlett, 1988). Pacientes infectadas por apresentam um conteúdo de putrescina bastante elevado na secreção vaginal (Yarlett, 1988). Existem evidências de que a síntese de poliaminas neste parasito esteja ligada à produção significativa de ATP via arginina dihidrolase. Nesta via, a arginina é convertida à putrescina, CO_2 e NH_4^+ com produção de uma molécula de ATP por molécula de arginina consumida. Esse caminho metabólico proporciona uma alternativa para a produção de ATP, configurando uma grande vantagem para parasitos que habitam locais pobres em carboidratos livres e ricos em aminos e arginina (Yarlett et al., 1993).

, assim como , utiliza a via de arginina dihidrolase na síntese de poliaminas. Já em , a putrescina é sintetizada pela ODC a partir da ornitina, que é obtida pela conversão direta da arginina pela arginase (Kim et al., 1987). Em , estudos sobre a atividade ODC revelaram que a biossíntese de poliaminas a partir da ornitina é necessária durante o ciclo vegetativo e está implicada no processo de encistamento deste parasito (Calvo-Méndez et al., 1993).

O ciclo de vida do pode ser interrompido em muitos estágios pelo tratamento com inibidores da ODC. Quando administrado em mosquitos vetores, o DFMO (DL- -difluorometil ornitina) inibe a esporogonia de , evitando a transmissão da malária a ratos (Gillet et al., 1983). Em eritrócitos humanos infectados com , o DFMO também inibe o crescimento e a maturação dos trofozoítos (Whaun & Brown, 1985; Heby et al., 2003) e a inibição irreversível da AdoMet por AbeAdo causa efeitos similares em cepas resistentes de à cloroquina (Wright et al., 1991; Heby et al., 2003).

II - Justificativa

A giardíase é considerada motivo de preocupação pela Organização Mundial da Saúde devido aos altos índices de infecção observados em todas as populações do globo, não havendo uma área endêmica preferencial. Países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá e Reino Unido, por exemplo, apresentam altos índices de indivíduos parasitados por *Giardia lamblia*, tornando este fato um caso importante nas políticas de saúde pública.

O fato de:) o número de cepas de *Giardia lamblia* resistentes às drogas ser cada vez maior, sendo necessárias doses mais elevadas durante o tratamento;) os fármacos disponíveis trazerem inúmeros efeitos colaterais, inclusive o mais usado (metronidazol, Flagyl[®]), o qual não tem seu uso recomendado pela FDA e) não existir até hoje um protocolo definido para a terapia contra a giardíase (Gardner & Hill, 2001); torna a busca por drogas alternativas no tratamento dessa e de outras doenças causadas por parasitos anaeróbicos e microaerófilos imprescindível.

No presente trabalho são discutidos os efeitos de alguns inibidores de biossíntese de esteróis, os quais têm se mostrado eficazes no tratamento de alguns tripanossomatídeos e apicomplexa (*Leishmania*). Também são demonstrados e discutidos os efeitos de um inibidor da biossíntese de poliaminas, droga esta também utilizada anteriormente como quimioterápico para outros anaeróbicos e tripanossomatídeos.

III - Objetivos

O objetivo central deste trabalho é testar novos compostos na quimioterapia do protozoário, parasito intestinal de humanos.

Os objetivos específicos da presente dissertação são:

1. Estudar os **efeitos sobre a proliferação** em culturas de acarretados pelo tratamento com azasteróis (**22,26-azasterol** e **epiminolanosterol**), inibidores da esqualeno sintetase (**ER 119884**, **E 5700**, **BPQ-OH** e **WSP 1267**), um bisfosfonado (**risedronato**) e um análogo de poliamina (**1,4-diamino-2-butanona**);
2. Avaliar a **integridade celular** após o tratamento com as drogas, discutindo a relação entre as alterações morfológicas e ultraestruturais sofridas pelo parasito com os efeitos causados pelos compostos testados.

IV - Materiais e Métodos

1. Reagentes

O dimetilsulfóxido (DMSO), diluente das drogas relacionadas ao metabolismo lipídico (grupos 1 e 2) foi proveniente da empresa Merck (USA, NJ, Whitehouse Station).

Componentes do meio de cultura: Trypticase (casein peptone) e extrato de levedura foram da marca BBL (Austrália, NSW, Liverpool); dextrose (ou glicose anidra), cloreto de sódio (NaCl), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) foram da marca Vetec (Brasil, RJ, Duque de Caxias); cisteína era da empresa USB (USA, Ohio, Cleveland); bile bovina era da Sigma (USA, ST-Louis) e o ácido ascórbico da Reagen (Brasil, RJ, Rio de Janeiro).

2. Cultura de células

A cepa Portland 1 de *Yersinia enterocolitica* foi utilizada para os ensaios. O meio de cultivo usado foi o TYI-S-33 (Keister, 1983) suplementado com 10% de soro bovino adulto. Os componentes do meio estão descritos na tabela 1. As culturas foram mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 por um período de 72 horas desde o momento do inóculo até o do próximo repique.

Componentes	Quantidade/litro	Concentração final
Trypticase (casein peptone)	20 g	
Extrato de levedura	10 g	
Dextrose (glicose anidra)	10 g	56 mM
Cloreto de sódio	2 g	34 mM

Componentes	Quantidade/litro	Concentração final
Fosfato de potássio monobásico	0,6 g	4,4 mM
Fosfato de potássio dibásico	1 g	4,4 mM
Cisteína	2 g	16,5 mM
Bile bovina	1 g	
Ácido ascórbico	0,2 g	1,1 mM
Hidróxido de sódio	Ajuste do pH 7.0 a 7.2	

Tabela 1: Componentes do meio de cultura de (modificado de Keister, 1983).

3. Curvas de crescimento

As células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura para a contagem do inóculo inicial das curvas, o qual foi de 5×10^4 de trofozoítos por ml. A estimativa do número de células foi feita utilizando-se câmara de Neubauer para contagem e um microscópio óptico de contraste de fase para observação. As drogas foram adicionadas após 24 horas de cultivo, ou seja, no início da fase logarítmica do crescimento, para que seus efeitos fossem acompanhados em uma cultura já estabilizada após a fase de adaptação ao meio. As amostras para contagem foram coletadas incubando-se os tubos de ensaio no gelo por 10 minutos para que as células aderidas à parede do tubo se desprendessem, e então os mesmos foram delicadamente vertidos 10 vezes para o completo destacamento. A fixação foi feita a partir de diluições em uma solução de formaldeído 4% em tampão fosfato (PBS). O crescimento da cultura foi acompanhado até 72 horas após o início da curva de crescimento, quando é atingida a fase estacionária. Foram utilizadas pelo menos três replicatas independentes durante os testes de cada uma das drogas em curvas de crescimento.

4. Drogas

As drogas utilizadas atuam em diferentes alvos, podendo ser divididas em quatro grupos:

1- inibidoras da esqualeno sintetase; **2-** os azasteróis (inibidores da ²⁴⁽²⁵⁾-esterol metiltransferase); **3-** bisfosfonado (análogo do pirofosfato inorgânico); e **4-** análogo de putrescina (inibidora da via de produção de poliaminas). As estruturas moleculares de algumas das drogas citadas acima podem ser observadas nas figuras 7, 8, 9 e 10.

- As do **grupo 1** são: ER 119884, E 5700, BPQ-OH (WSP 889) e a WSP 1267 (Figura 8). O BPQ-OH (WSP 889) foi sintetizado conforme descrito por Urbina e colaboradores (Urbina *et al.*, 2002); o ER 119884, E 5700 foram fornecidos por Tsukuba Research Laboratories, Eisai Company Ltd., Japão; o WSP 1267 foi sintetizado no laboratório do Dr. Ian H. Gilbert, Cardiff University, UK, segundo Lorente e colaboradores (Lorente *et al.*, 2005).
- As do **grupo 2** são: 22,26-azasterol (22,26-azasterol(20-piperidina-yl-5 β -pregnan-3 β -20(R-S)-diol)) e (24,25-(R,S))-epiminolanosterol (figura 7). Essas drogas foram sintetizadas e fornecidas pelo Dr. Julio A. Urbina, Laboratório de Química Biológica y Biofísica, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela, e também pelo Dr. Ian H. Gilbert. O ponto inicial para o programa de síntese dos compostos foi a molécula de azasterol, primeiramente desenvolvida pela companhia Zeneca como parte de um programa de preparação racional de inibidores da 24-SMT de fungos. Neste composto, o átomo de nitrogênio é encontrado na posição equivalente ao carbono 23 da cadeia lateral. Com isso, foram preparados análogos onde o nitrogênio está localizado em diferentes posições em torno do anel, que corresponde a um intermediário de alta energia com um átomo de nitrogênio nas posições 24 e 25.
- A do **grupo 3** é o bisfosfonado 2-(3-piridil)-1-hidroxi-etano-1,1-bisfosfonado, sal monossódio (risedronato) (figura 9), o qual foi sintetizado de acordo com van Beek e

colaboradores (van Beek et al., 1999). Análises elementares de ressonância magnética nuclear demonstraram que este composto apresentava-se com 98,8% de pureza.

- A do **grupo 4** é 1,4-diamino-2-butanona, dihidrocloreto (DAB) (figura 10). Esta droga foi adquirida a partir da empresa Sigma-Aldrich (USA, ST-Louis), com 99% de pureza.

As drogas dos grupos **1** e **2** foram diluídas primeiramente em dimetilsulfóxido (DMSO) para formar uma primeira solução estoque mais concentrada de 10 mM e depois diluídas em meio de cultura para 1 mM para formar um segundo estoque, o qual era utilizado diretamente nos tratamentos. A diluição foi feita desta forma para que a concentração de DMSO não excedesse 0,1% (v/v), já que acima desse teor iria interferir no crescimento de *S. aureus*. As dos grupos **3** e **4** foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente filtradas em uma membrana com poros da dimensão de 0,22 µm (Millipore) para esterilização. O PBS não altera o crescimento de *S. aureus* em nenhuma das concentrações utilizadas nos ensaios. O risedronato teve a sua solução estoque de 25mM, enquanto que a do DAB foi de 1M.

5. Análises estatísticas e cálculo do IC₅₀

Para examinar a significância entre os valores das curvas foi aplicado o teste ANOVA (two-way analysis of variance), sendo que P foi <0,0001 e seus valores foram considerados estatisticamente significativos.

O IC₅₀ é o valor referente à concentração da droga que inibe 50% do crescimento da cultura. Os valores foram calculados utilizando o programa Jandel Sigma Plot. Os experimentos foram repetidos independentemente e os dados utilizados a partir dos valores encontrados durante as contagens. O cálculo da IC₅₀ foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$I = \frac{I_{\text{máx}} \times C}{IC_{50} + C}$$

Onde,

I = porcentagem de inibição

$I_{\text{máx}}$ = máximo de inibição (100%)

C = concentração da droga inibidora

IC_{50} = Concentração da droga para inibir 50% do crescimento da cultura

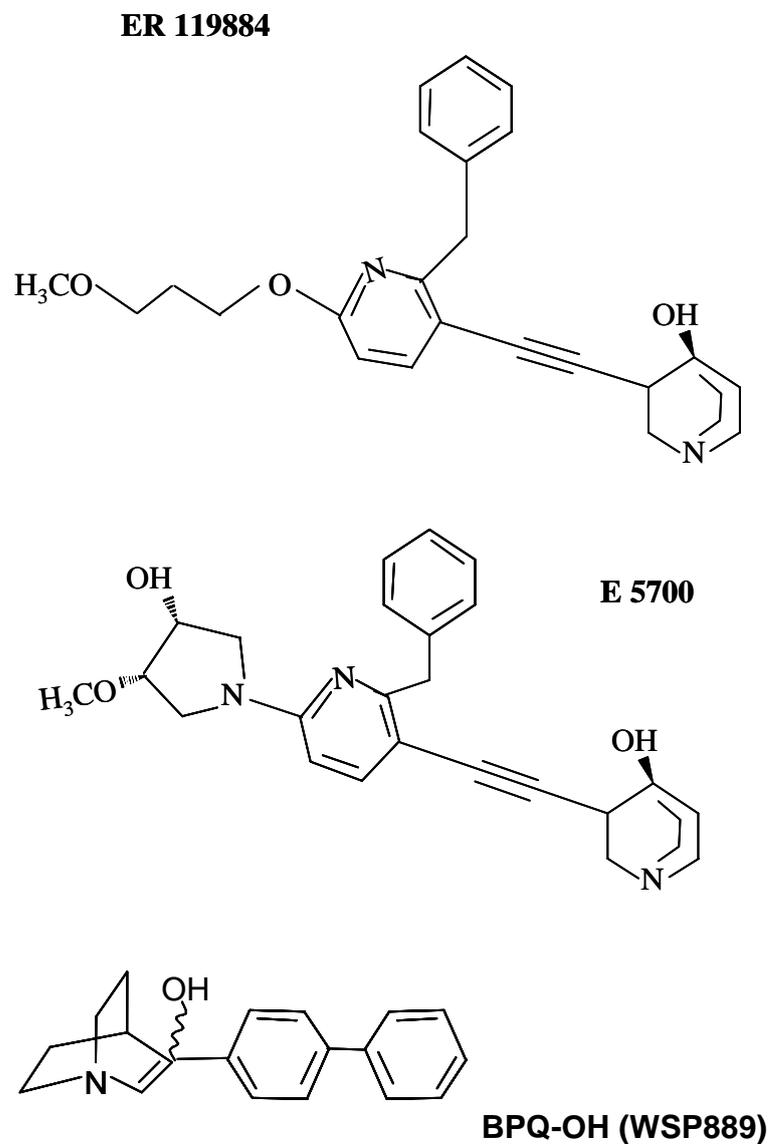
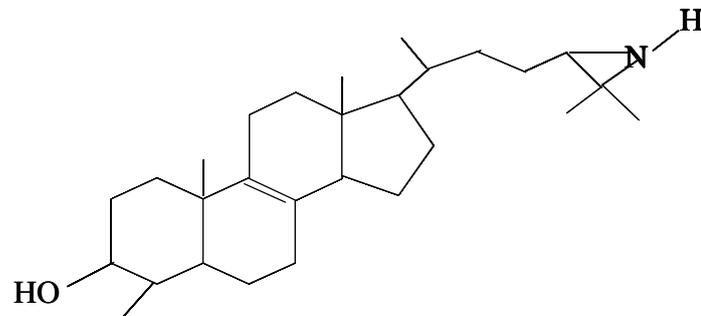


Figura 7: Estruturas de alguns compostos conhecidos como inibidores da enzima esqualeno sintase, também conhecidos como ácidos zaragózicos, e que foram utilizados nos ensaios em culturas de

24(R,S), 25epiminolanosterol



22,26-azasterol

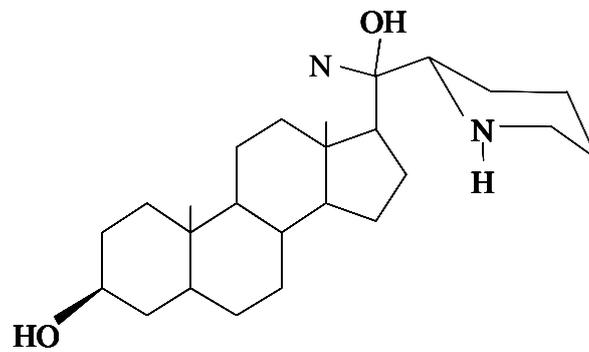


Figura 8: Estruturas de alguns dos compostos conhecidos como inibidores da enzima ²⁴⁽²⁵⁾ esterol metiltransferase e que foram adicionados às culturas de .

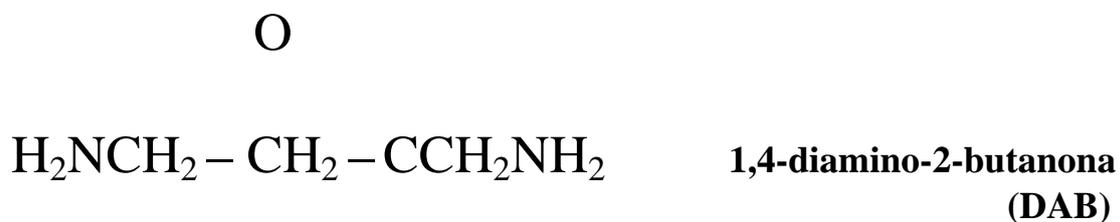
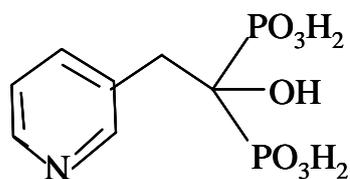


Figura 9: Molécula do análogo da poliamina putrescina 1,4-diamino-2-butanona (DAB).



risedronato

Figura 10: Esquema estrutural do bisfosfonado 2-(3-piridil)-1-hidroxi-etano-1,1-bisfosfonado (risedronato).

6. Coloração das células

As células foram centrifugadas para obtenção de um concentrado de células (pellet) e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura. Foi feito, então, um esfregaço nas lâminas com secagem à temperatura ambiente, seguido de fixação e coloração com panótico. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e as lamínulas foram aderidas a elas com entellan. A observação foi feita utilizando-se um microscópio óptico Zeiss.

7. Ensaio de incorporação de putrescina tritiada ($[^3\text{H}]$ -putrescina)

Trofozoítos de _____ foram tratados com 10mM de DAB por 24 horas e então lavados com o meio RPMI para retirar a droga do meio. Posteriormente, as amostras foram incubadas com RPMI sem soro à temperatura de 37°C por uma hora, onde foi adicionada a $[^3\text{H}]$ -putrescina na concentração de 1 $\mu\text{Ci}/10\mu\text{l}$. Foram feitos dois controles: um a 37°C e outro a 0°C, o qual seria o controle negativo de captação, já que nesta temperatura não ocorre incorporação. O processo foi interrompido quando 2ml de PBS a 4°C foram introduzidos no sistema, e as amostras foram lavadas sete vezes. As células foram rompidas com 1ml de água destilada, sendo posteriormente submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Foram adicionados 100 μl da amostra em papel de filtro de microfibras de vidro AP25 (Millipore), e após secagem em estufa a 37°C por aproximadamente 30 minutos, os filtros foram acondicionados em tubos “vials” contendo líquido de cintilação (POPOP 0,4% e PPO 0,01% em tolueno) e a leitura foi realizada em cintilador líquido.

8. Atividade da Ornitina descarboxilase

Em um ensaio trofozoítos de _____ foram incubados com DAB por 24 horas, sendo os controles desprovidos da droga. Os trofozoítos foram lavados e estocados à -20°C em

tampão Tris-HCl 20mM pH 7,1, contendo 50 μ M Na-EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, sal sódico), 50 μ M piridoxal fosfato, segundo DeMello *et al.*, 1976. As células foram lisadas como descrito acima e sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento. A incubação na presença de [¹⁴C]ornitina (0,12 μ Ci/ml) foi feita por um período de 1 hora a 37°C. A reação foi parada pela adição de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e o ¹⁴CO₂ resultante foi captado em hidróxido de benzetônio a 1M (Sigma Chemical Co.) a 37°C por 30 minutos. A atividade da ODC foi então determinada por cintilação líquida.

9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As células foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução fixadora, composta por glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4%, tampão cacodilato de sódio a 0,1M e sacarose a 4% para equilibrar a osmolaridade do meio. As amostras foram mantidas 1 hora a temperatura ambiente, tempo este necessário para que ocorra a fixação. O material foi, então, lavado 2 vezes com tampão cacodilato 0,1 M e pós-fixado com uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) a 1%, ferrocianeto de potássio 0,5 mM e cloreto de cálcio a 5 mM. A desidratação foi feita em concentrações crescentes de acetona, deixando 15-20 minutos entre cada troca, desde 30%, passando por 50%, 70%, 90% até 100%, sendo que esta última foi repetida mais 2 vezes para certificar que toda a água das células foi extraída. A resina hidrofóbica Epon foi utilizada para a inclusão, usada na proporção (acetona: epon) 2:1, 1:1 (6 horas) e epon puro (6 horas). Todo o processamento até esta etapa foi feito à temperatura ambiente (25 °C). Após

omu

IV - Resultados

1. Efeitos das drogas na proliferação de culturas e na biologia celular de *Giardia lamblia*

1.1. Azasteróis

Os azasteróis testados, como dito anteriormente, foram o 22,26-azasterol e o epiminolanosterol. Os respectivos valores do IC₅₀ podem ser observados na tabela 2 abaixo.

Compostos	IC ₅₀
22,26-azasterol	7,00 µM
Epiminolanosterol	0,17 µM

Tabela 2: Azasteróis e seus respectivos valores de IC₅₀ após 48 horas de incubação de com as drogas (72 horas de cultivo).

A inibição causada pelos azasteróis foi do tipo dose-resposta, e o valor dos IC₅₀ após 48 horas de incubação com as drogas, já que as mesmas foram adicionadas às culturas 24 horas após o inóculo, foram 7 µM para o 22,26-azasterol (figura 11) e de 0,17 µM para o epiminolanosterol (figuras 12). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente das drogas e foi adicionado ao sistema na concentração de 0,1% (a maior utilizada durante os ensaios) para observação de algum possível efeito tóxico. Entretanto, a adição de DMSO não apresentou qualquer alteração significativa no crescimento de todas as culturas em que as drogas o tinham como diluente até a concentração de 0,1%.

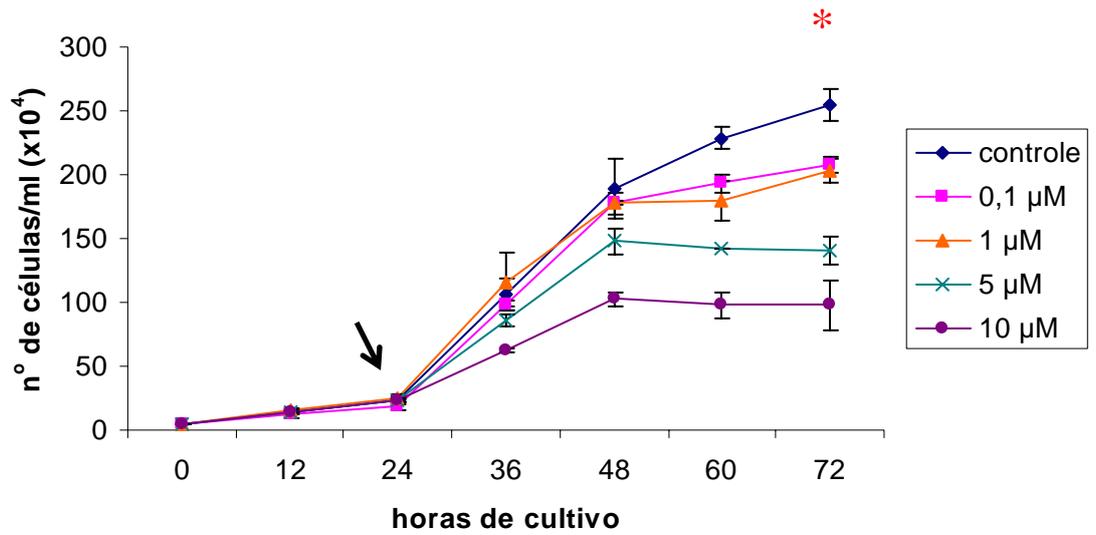


Figura 11: Cultura de cepa P1 tratada com 22,26-azasterol (AZA). - controle; - - AZA 0,1μM; - - AZA 1μM; - x - AZA 5μM; - - AZA 10μM. Seta: momento da adição da droga. *: tempo final de cultivo em 72 horas, referente a um total de 48 horas de incubação com a droga.

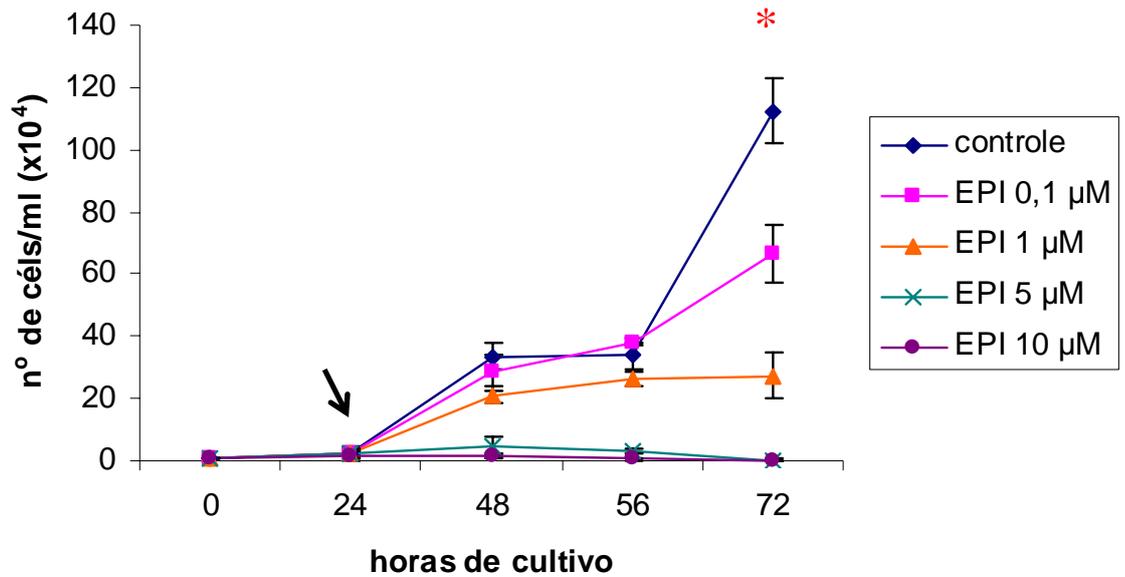


Figura 12: Curva de crescimento de cepa P1 tratada com epiminolanosterol (EPI), onde se pode observar o efeito dose-resposta. Cultura de cepa P1 tratada com 22,26-azasterol (AZA). - - controle; - - EPI 0,1 μM ; - - EPI 1 μM ; - x - EPI 5 μM ; - - EPI 10 μM . Seta: momento da adição da droga. *: tempo final de cultivo em 72 horas, referente a um total de 48 horas de incubação com a droga.

1.2. Ácidos Zaragózicos

As drogas **E 5700**, **ER 119884**, **WSP 889 (BPQ-OH)** e **WSP 1267**, todas inibidoras da enzima esqualeno sintase (SQS), apesar de comprometerem a proliferação de tripanossomatídeos e do membro do grupo Apicomplexa (Braga *et al.*, 2004; Urbina *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005; Martins-Duarte *et al.*, 2006), não apresentaram efeitos significativos na proliferação de *Leishmania* até a concentração de 10 μM , a qual foi utilizada como concentração máxima para todas as outras drogas (Tabela 3). Nestes ensaios com outros protozoários parasitas esta também foi a máxima concentração utilizada, apresentando efeitos evidentes.

Compostos	Resultados
ER 119884	não inibiu
E 5700	não inibiu
WSP 889 (BPQ-OH)	não inibiu
WSP 1267	não inibiu

Tabela 3: Inibidores da SQS em culturas de *Leishmania*, nas quais não houve inibição após 48 horas de incubação com as drogas.

Na figura 13 estão representadas algumas das curvas de crescimento nas quais podemos notar que esta classe de inibidores da esqualeno sintase não inibe a proliferação de *Leishmania*. Em A, a droga utilizada é a E 5700; em B é a BPQ-OH (WSP 889) e em C é a WSP 1267.

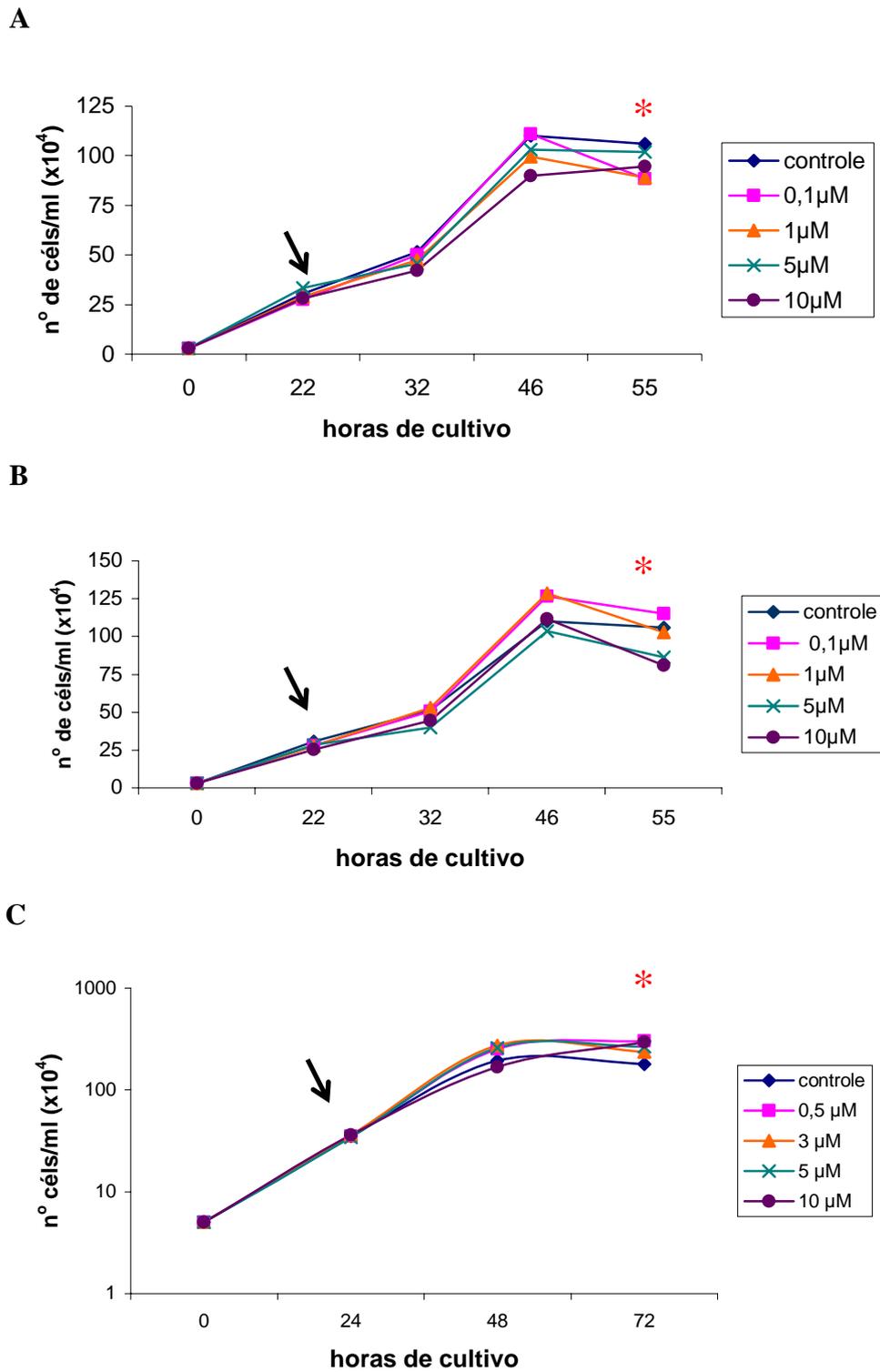


Figura 13: Gráficos das curvas de crescimento de culturas de tratadas com E 5700 (A), BPQ-OH (B) e WSP 1267 (C). Podemos notar que nenhuma das três drogas inibiu a proliferação de maneira representativa, uma vez que as tratadas tiveram um comportamento similar aos controles sem droga e com DMSO 0,1%. Seta: momento de adição das drogas (24 horas após o início da curva). *: tempo final de cultivo, quando as culturas atingiram a sua fase estacionária.

1.3. Bisfosfonado

O bisfosfonado **risedronato**, análogo estável de pirofosfato e inibidor da farnesil pirofosfato sintase, também apresentou efeito inibitório às culturas de . Entretanto, Assim como ocorreu com os tratamentos anteriores com as outras drogas, a diminuição do número de células do sistema teve seu início somente após 24 horas de incubação, ou seja, a partir do ponto de 48 horas (figura 14). O IC_{50} do risedronato foi de 12,11 μM (tabela 4).

Composto	IC_{50}
Risedronato (bisfosfonado)	12,11 μM

Tabela 4: o bisfosfonado risedronato e seu respectivo valor de IC_{50} nas culturas de após 48 horas de incubação com a droga.

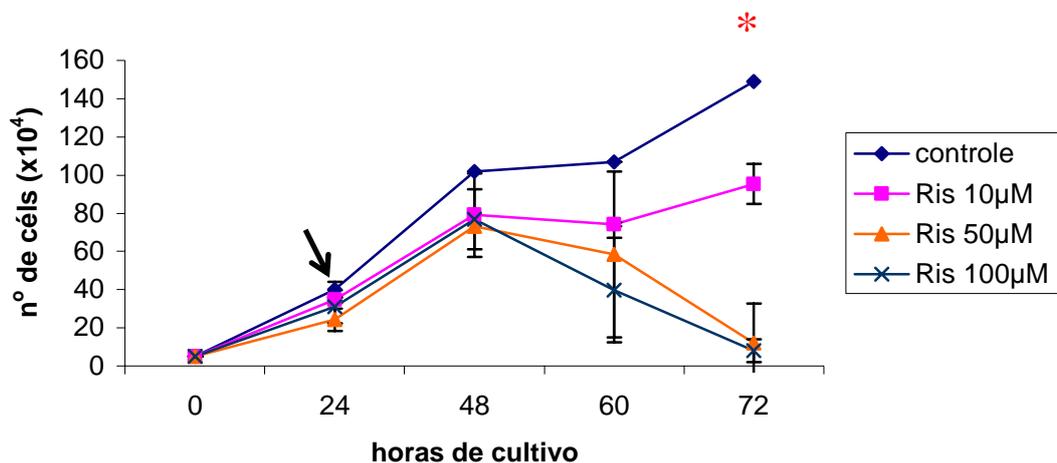


Figura 14: Curva de crescimento com o bisfosfonado risedronato adicionado ao meio. A inibição do crescimento pela droga é iniciada a partir de 48 horas de cultivo. Seta: momento de adição da droga (24 horas). *: tempo final de cultivo em 72 horas, referente a um total de 48 horas de incubação com a droga.

1.4. Análogo da poliamina putrescina

Culturas de *S. aureus* foram tratadas com o análogo de putrescina **1,4-diamino-2-butanona** (DAB), o qual foi adicionado 24 horas após do início da curva, fase esta em que as células já estão adaptadas ao meio e iniciando a sua fase proliferativa (logarítmica). A inibição do crescimento pelo DAB foi dose e tempo dependentes, e pode ser observada através do gráfico da figura 15. O IC₅₀ para o tempo de 72 horas de cultivo, ou seja, de 48 horas de incubação com DAB, foi inferior a 0,1 mM.

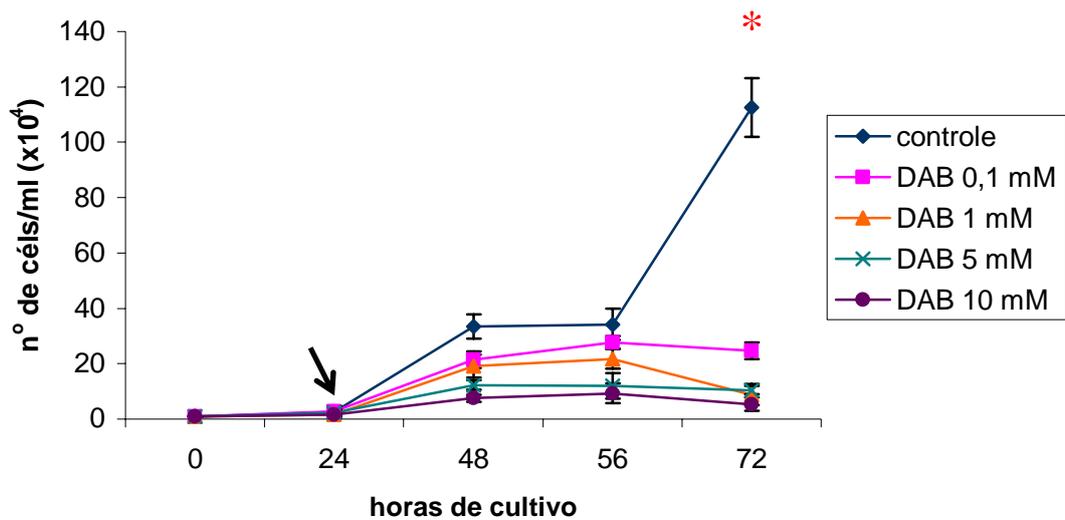


Figura 15: Curva de crescimento do análogo de putrescina DAB, demonstrando seu efeito inibitório nas culturas de *S. aureus*. A seta indica o momento de adição da droga às culturas (24 horas). - - controle; - - DAB 0,1 mM; - - DAB 1 mM; - x - DAB 5 mM; - - DAB 10 mM. *: tempo final de cultivo em 72 horas, referente a um total de 48 horas de incubação com a droga.

1.4.1. Conteúdo intracelular de putrescina

Os efeitos do DAB sobre os níveis de putrescina intracelulares de trofozoítos de *T. brucei* foram analisados a partir de ensaios com putrescina tritiada ($[^3\text{H}]$ putrescina), conforme descrito anteriormente na metodologia. O gráfico da figura 16 mostra que *T. brucei* capta pouca putrescina, se comparada a outros modelos celulares. Na figura 16 podemos perceber que a captação de *T. brucei* é aproximadamente 3 vezes menor do que o de *L. amazonensis*, protozoário este que tem altas taxas de incorporação desta poliamina. Esse resultado nos sugere que *T. brucei* não possui transportador para incorporação de putrescina. Entretanto, DAB não estaria entrando na célula através de transportadores para putrescina. Ainda não foi possível identificar qual seria o modo de incorporação do fármaco, sendo mais testes necessários para elucidar essa questão.

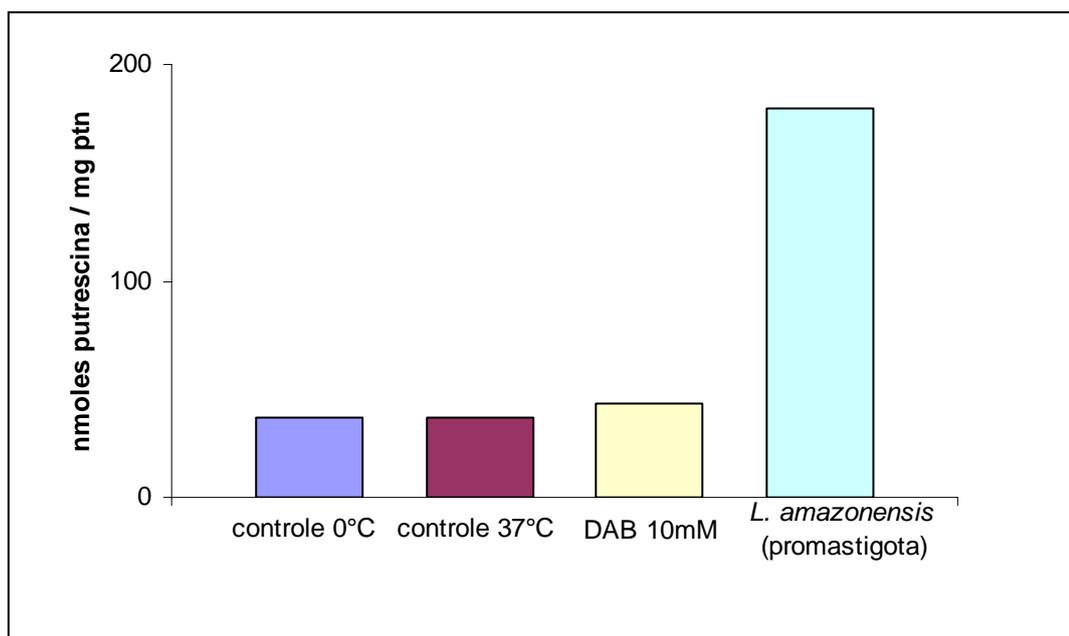


Figura 16: Efeitos do DAB sobre a concentração de putrescina intracelular de trofozoítos de *T. brucei*. Não houve captação de putrescina pelas células controles, e também não houve diferenças significativas entre estes e os tratados após a incubação com DAB. O teor de putrescina endógena do tripanossomatídeo *L. amazonensis* foi colocado ao lado para visualização do que seria um valor significativo de um ensaio com 1 hora para incorporação da putrescina (adaptado de Lopes, 2004).

1.4.2. Atividade da ornitina descarboxilase (ODC)

A atividade da ODC de homogenatos de trofozoítos de *Leishmania* foi dosada após a incubação com DAB a 10mM. Podemos notar certo aumento, porém pequeno, nos níveis de CO₂ presentes após 24 horas de tratamento com o composto (figura 17), porém não significativo. Apesar de este protozoário provavelmente não utilizar a ODC como principal enzima para a produção de poliaminas, a presença do análogo da putrescina estimulou um aumento da atividade dessa enzima.

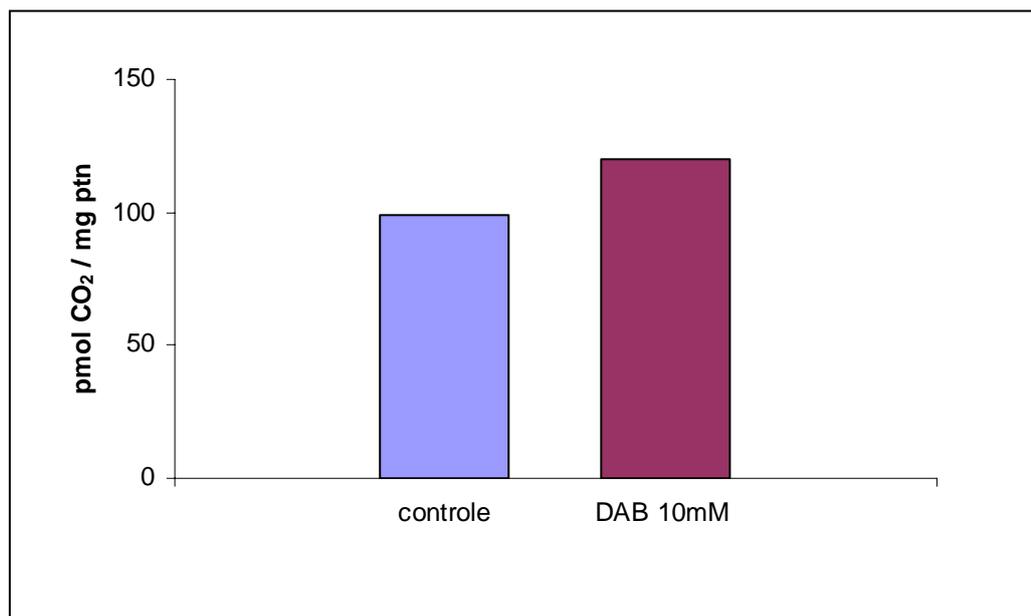


Figura 17: Dosagem da atividade da enzima ODC em trofozoítos de *Leishmania* após o tratamento com DAB 10mM por 24 horas. Pode-se perceber um aumento irrisório na atividade desta enzima.

1.4.3. Co-tratamento: DAB e metronidazol

Já que um dos papéis das poliaminas é o de proteger as células contra estresses oxidativos, uma proposta interessante em se tratando de quimioterapia seria o co-tratamento com o análogo da putrescina e a droga de uso corrente, o metronidazol. Para tal foram utilizadas as concentrações de 1mM e 0,5µg/ml, respectivamente, sendo que ambas são inferiores àquelas que produzem efeitos antiproliferativos . Adaptando a metodologia de Urbina e colaboradores (Urbina , 1993) para análise de efeitos combinados entre duas ou mais drogas, encontramos um resultado que seria referente ao para este ensaio, o que pode ser visto na figura 18.

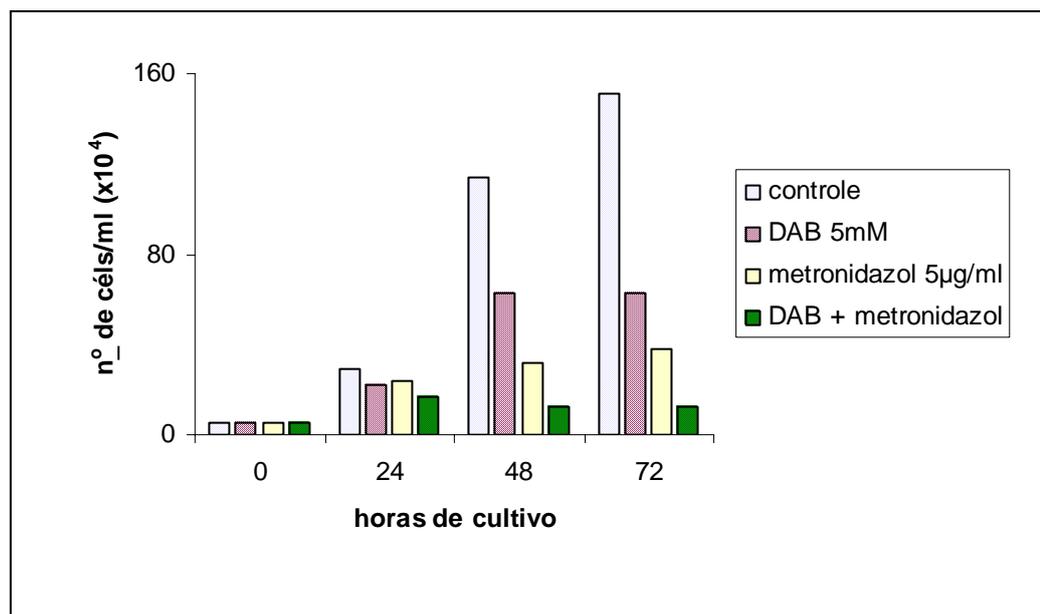


Figura 18: Ensaio demonstrando o efeito sinérgico quando DAB e metronidazol são concomitantemente adicionados às culturas de . Para que o efeito seja considerado sinérgico o valor médio da inibição (I_{syn}) deve ser entre zero e 1 ($0 < I_{syn} < 1$). Neste caso, o valor foi de 0,009, ou seja, está ocorrendo sinergismo durante os tratamentos em combinação.

2. Alterações na Estrutura Celular

As próximas análises relatam efeitos ultraestruturais, os quais são provenientes de estudos utilizando-se como ferramenta a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A figura 19 é uma micrografia eletrônica de trofozoíto de *Leishmania* em corte transversal, demonstrando suas principais estruturas. Podemos notar a presença dos dois núcleos, e entre eles os axonemas flagelares. O disco adesivo aparece na posição ventral e em suas extremidades vemos a flange ventro-lateral. As vesículas periféricas estão distribuídas ao longo de toda a região dorsal.

2.1. 22, 26-azasterol (AZA)

No tratamento com AZA pudemos observar a formação de estruturas provenientes de retículo endoplasmático e que são precursoras das vesículas de encistamento, denominadas fendas ou “clefts” (figuras 20, 21, 22 e 23). O material de parede cística é depositado nestes locais e estes vão se transformando em vesículas de encistamento (VEs) conforme o acúmulo desse material. As VEs são destacadas do retículo endoplasmático e exocitadas quando suficientemente maduras. O processo de diferenciação pode ser observado novamente com o aparecimento de vesículas de encistamento completamente formadas em alguns trofozoítos das culturas (figuras 20-23).

Após 48 horas de tratamento com 0,1 μ M de AZA, além das vesículas de encistamento nos trofozoítos, houve também a presença de um cisto completamente formado, todavia com um grande vacúolo em seu interior (figuras 20 e 21).

O AZA também provocou alterações morfológicas durante o tratamento e em concentrações mais altas. Além de os trofozoítos persistirem no processo de diferenciação, as vesículas de encistamento foram observadas inclusive em tamanho maior do que se é comumente observado (figura 22). Alguns indivíduos das culturas conseguiram chegar até a

fase de cisto, entretanto apresentaram sua ultraestrutura alterada, onde sua parede encontrou-se anômala, de maneira frouxa e delgada, não se justapondo à membrana plasmática (figura 23).

Figura 19: Micrografia eletrônica demonstrando um corte transversal de trofozoíto de *Leishmania* em seu estado normal. N: Núcleo (os dois núcleos podem ser vistos); DA: Disco adesivo; setas: axonemas dos flagelos; (*): vesículas periféricas, concentradas, neste corte, na região dorsal; FL: flange (ou franja) ventro-lateral. Barra= 1,1 μ m.

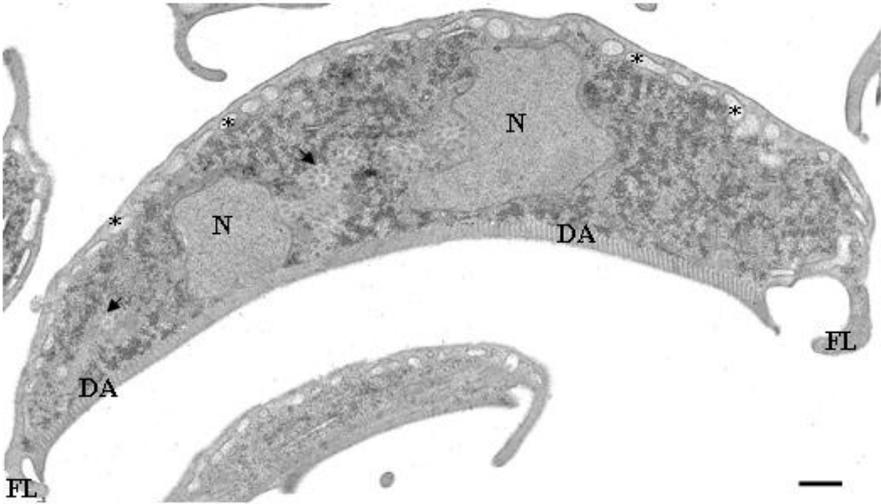


Figura 20: Alterações vistas através de MET: tratada com AZA 0,1 μ M por um período de 24 horas. Em **A** podemos conferir a presença de inúmeras vesículas de encistamento (*), bem como fendas precursoras dessas mesmas vesículas em **B** (setas) e um cisto formado em **C**, o qual apresenta um grande vacúolo em seu interior (*). PC: Parede cística; F: flagelo. Barras: A= 1,1 μ m; B= 2 μ m; C= 0,6 μ m.

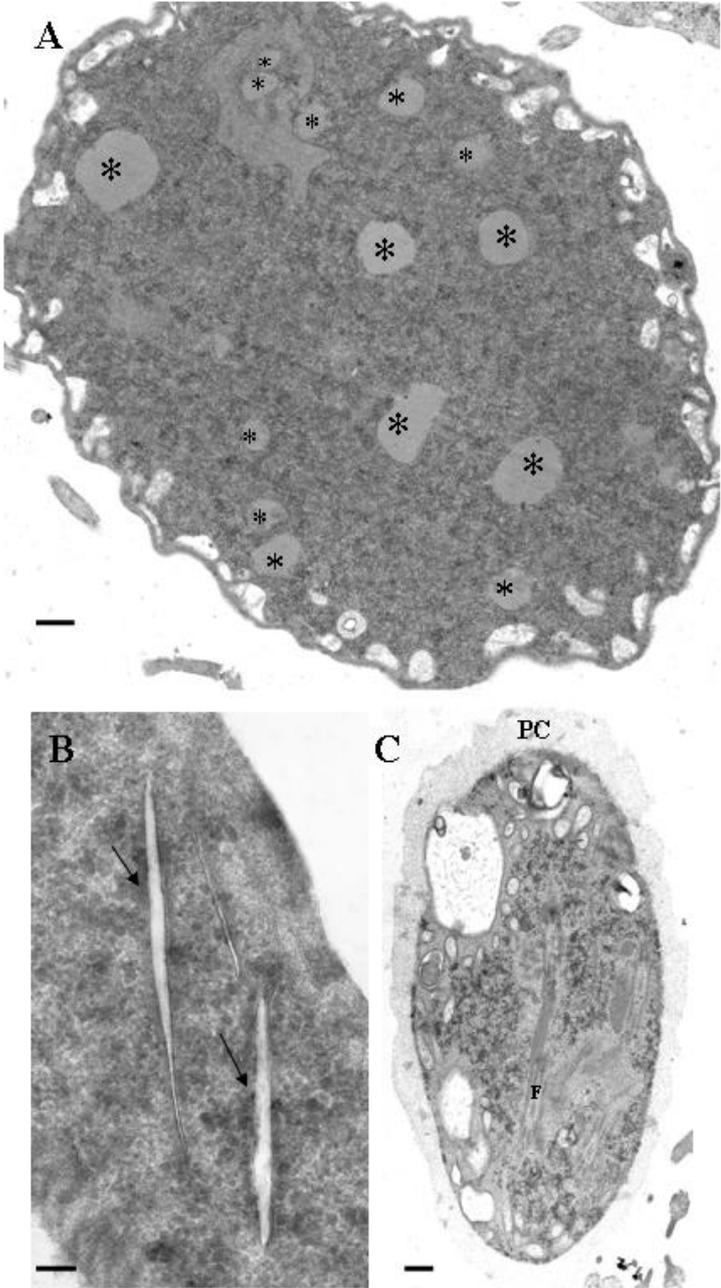


Figura 21: submetida ao tratamento com AZA na concentração de 0,1 μ M por 48 horas. As vesículas específicas de encistamento ainda são aparentes (A e B), inclusive sendo vista na região ventral (A), e um cisto formado pode ser observado em C. Entretanto, este último apresenta vacúolos anômalos, de grande tamanho (V). VE: vesícula de encistamento; N: núcleo; A: axonemas flagelares; DA: disco adesivo, PC: parede cística; V: vacúolo. Barras: A e B= 200nm; C= 500nm.

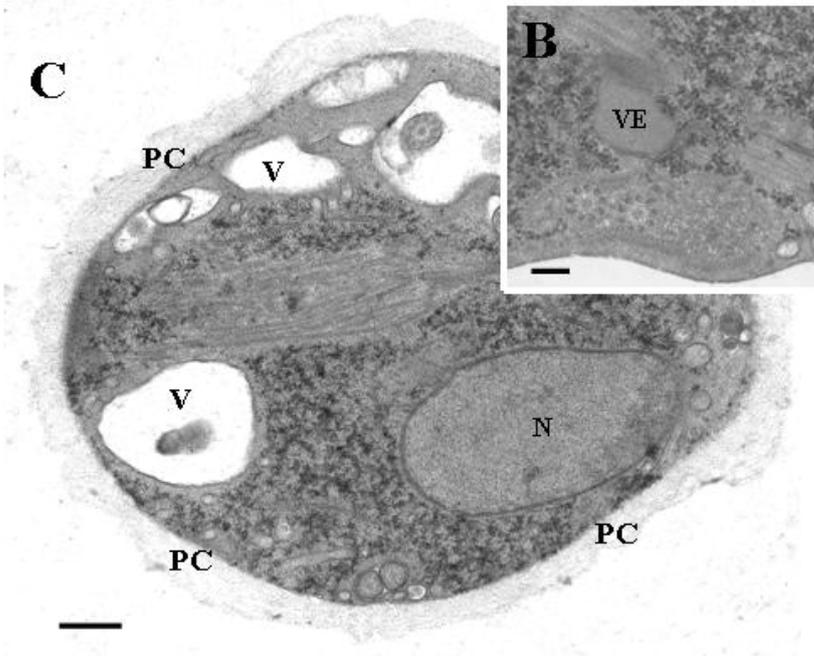
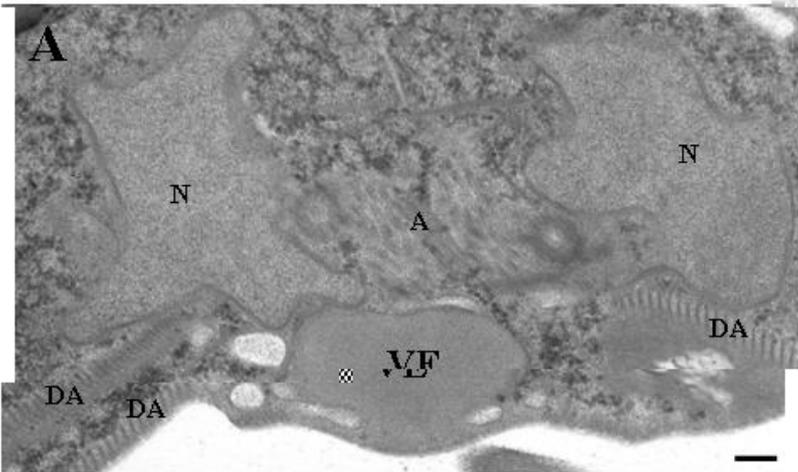


Figura 22: Microscopia eletrônica de transmissão de *Leishmania* tratada com AZA 10 μ M por um período de 24 horas. **A**, mostra um cisto formado, embora sua parede não esteja justaposta à membrana plasmática. **B** e **C** evidenciam as vesículas de encistamento maduras (*). As setas indicam a presença das fendas. PC: Parede cística. Barras: A= 0,1 μ m; B e C= 0,6 μ m.

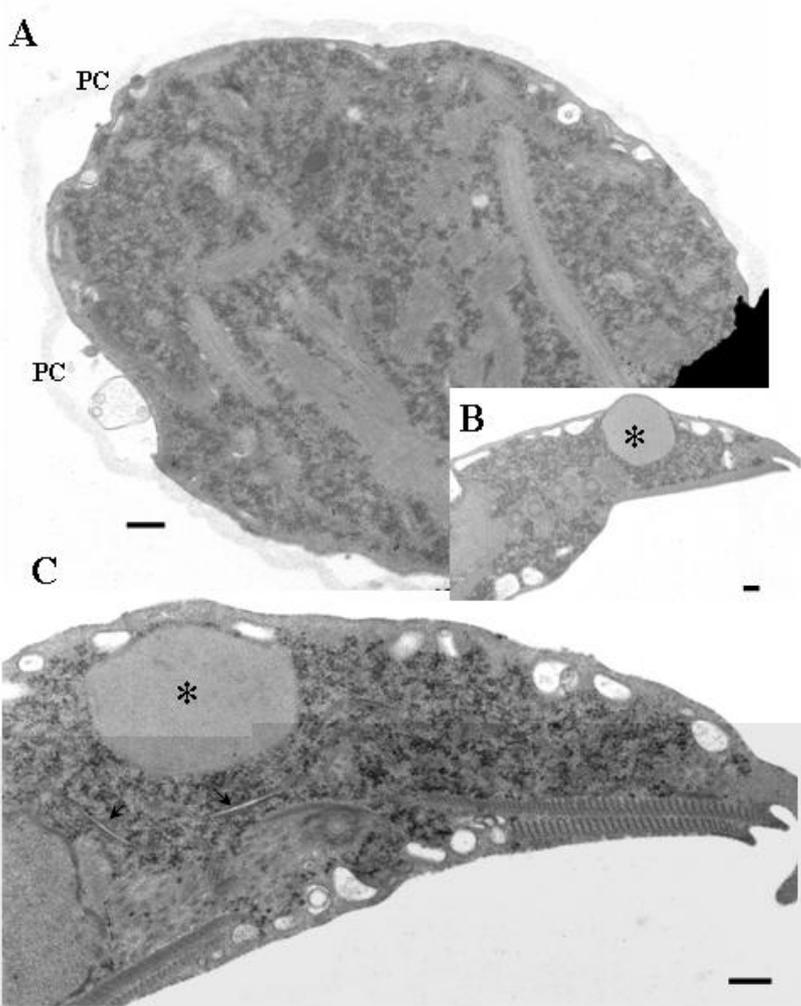
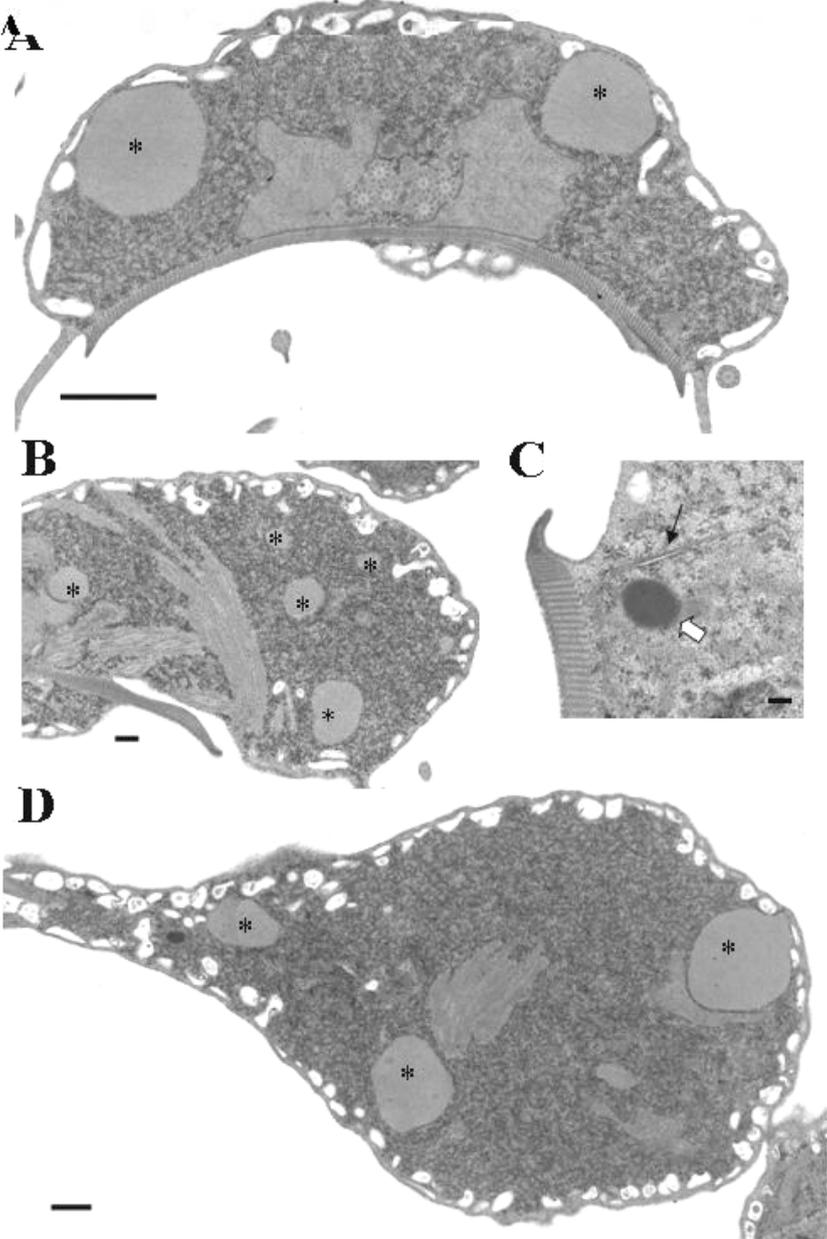


Figura 23: tratada com AZA na concentração de 10 μ M por 48 horas. As vesículas de encistamento (*) estão presentes nas células em grande número, bem como em tamanho maior do que o comumente observado (A, B e D). Em C podemos ver uma fenda (seta fina), a qual já apareceu antes em outras concentrações e em outros tempos de incubação com AZA, e também uma estrutura de natureza não identificada presente em algumas células tratadas (seta larga). Barras: A= 1 μ m; B= 1,1 μ m; C= 200nm; D= 1,7 μ m.



2.2. Epiminolanosterol (EPI)

Embora nas curvas de crescimento não fosse possível detectar efeitos tão drásticos na proliferação com a concentração de $0,1\mu\text{M}$ de EPI incubado por período de 24 horas, ao analisarmos a ultraestrutura através da MET pudemos verificar implicações celulares de grande importância. No tratamento com EPI $0,1\mu\text{M}$ por 24 horas surgiram perfis de retículo que parecem ser o início da formação das fendas (figura 24). Após 48 horas de tratamento as fendas ainda puderam ser encontradas muito frequentemente nos parasitos, assim como algumas vesículas de encistamento e um cisto formado. As vesículas periféricas estavam em tamanho alterado em relação ao que é usualmente observado (figura 25), atingindo ampliações de 3 a 4 vezes em média. Nos controles elas variam entre $0,03$ a $0,06\ \mu\text{m}$ de diâmetro, enquanto que nas culturas tratadas elas atingiram a faixa de $2,3$ a $3,7\ \mu\text{m}$ de diâmetro.

Já ao usar $10\mu\text{M}$ de EPI por 24 horas, grande parte das células estava com suas vesículas periféricas alteradas, sendo o volume das mesmas muito maiores se comparadas com o que foi visto anteriormente em outras concentrações (figuras 26 e 27). Outras vesículas também apresentavam material amorfo, assemelhando-se àquelas decorrentes do processo de autofagia. Outras tinham material membranoso disposto de forma concêntrica em seu interior, lembrando figuras de mielina. A superfície celular muitas vezes apresentou-se de forma delgada, sugerindo alguma alteração na constituição da membrana plasmática. Durante o tratamento, estruturas eletrondensas não circundadas por membranas e de natureza desconhecida também foram observadas (figuras 26 e 27). Esse tipo de forma não esteve presente em momento algum em células controles.

Figura 24: Alterações ultraestruturais em *Trichomonas vaginalis* após incubação com EPI 0,1 μ M por 24 horas. Em A nota-se a intensa formação de fendas (setas) precursoras das vesículas de encistamento, onde o material de parede é depositado para posterior liberação no meio. Em B há uma micrografia de um cisto totalmente formado, entretanto o mesmo traz em seu interior dois grandes vacúolos, provavelmente efeitos da droga. PC: parede cística; V: vacúolo; *: porções celulares onde o disco adesivo aparece fragmentado e internalizado, característico de cistos de *T. vaginalis*; A: axonemas flagelares. Barras: A= 300nm; B; 1 μ m.

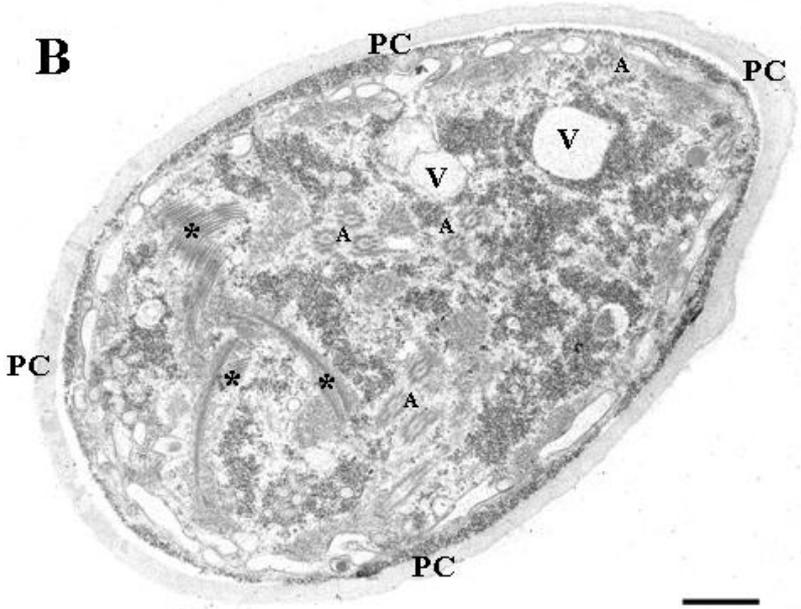
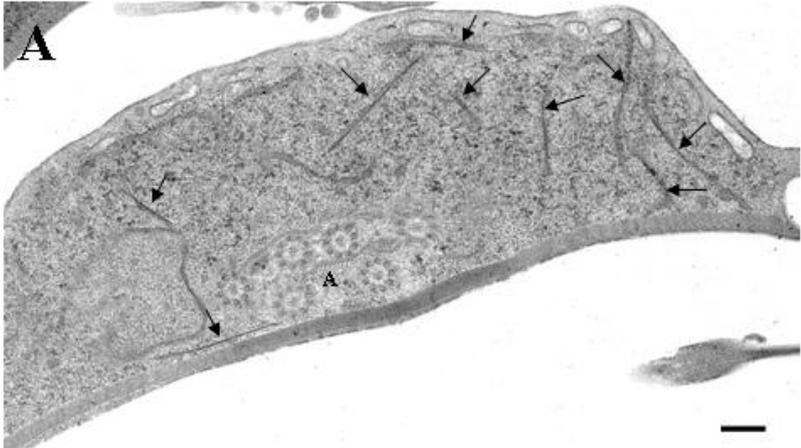


Figura 25: Efeitos ultraestruturais causados por EPI 0,1 μ M por 48 horas em *Trypanosoma brucei*. Podemos verificar passos do processo de encistamento sofridos pelas culturas, desde a formação das fendas para deposição de material de parede cística (*) em B e C, bem como as vesículas propriamente ditas (A e D). Em E é possível observar o cisto formado. F: outra alteração muito comum neste tratamento é o aumento das vesículas periféricas (VP). PC: parede cística; DA: disco adesivo. Barras: A e F= 1,1 μ m; B e C= 200nm; D= 0,4 μ m; E= 0,6 μ m.

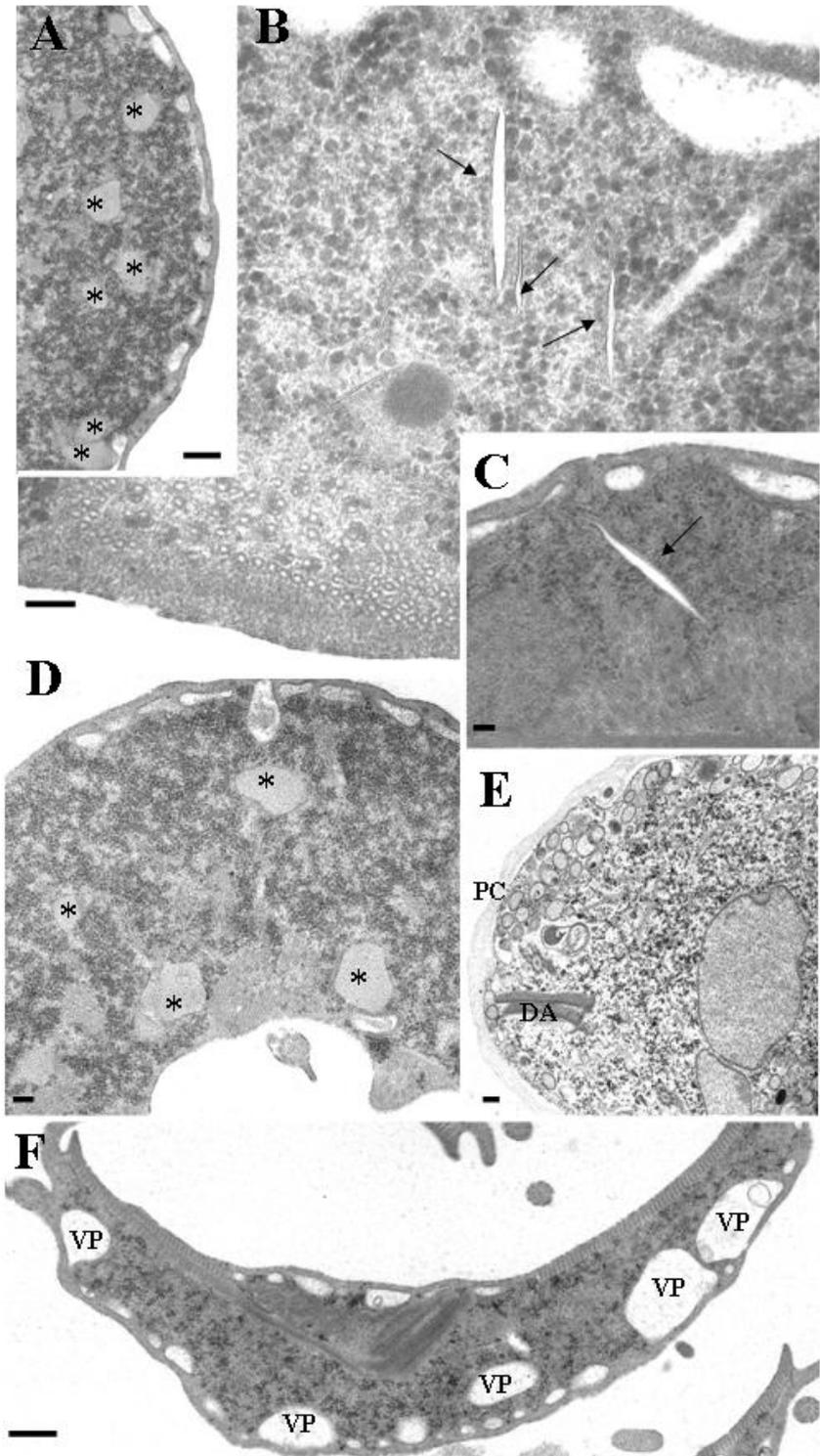


Figura 26: Efeitos ultraestruturais causados pela droga EPI a 10 μ M por 24 horas em culturas de *Trichomonas vaginalis*. Seções A e B: aumento do tamanho das vesículas periféricas (*); o mesmo pode ser visto na seção C (*), além de a superfície celular encontrar-se muito delgada (setas); D: figura de mielina (cabeça de seta); E: surgimento de vesículas com material amorfo em seu interior, similares às de autofagia (estrelas). N: núcleo; A: axonema flagelar. Barras: A, B, D, E= 1 μ M; C= 500nm.

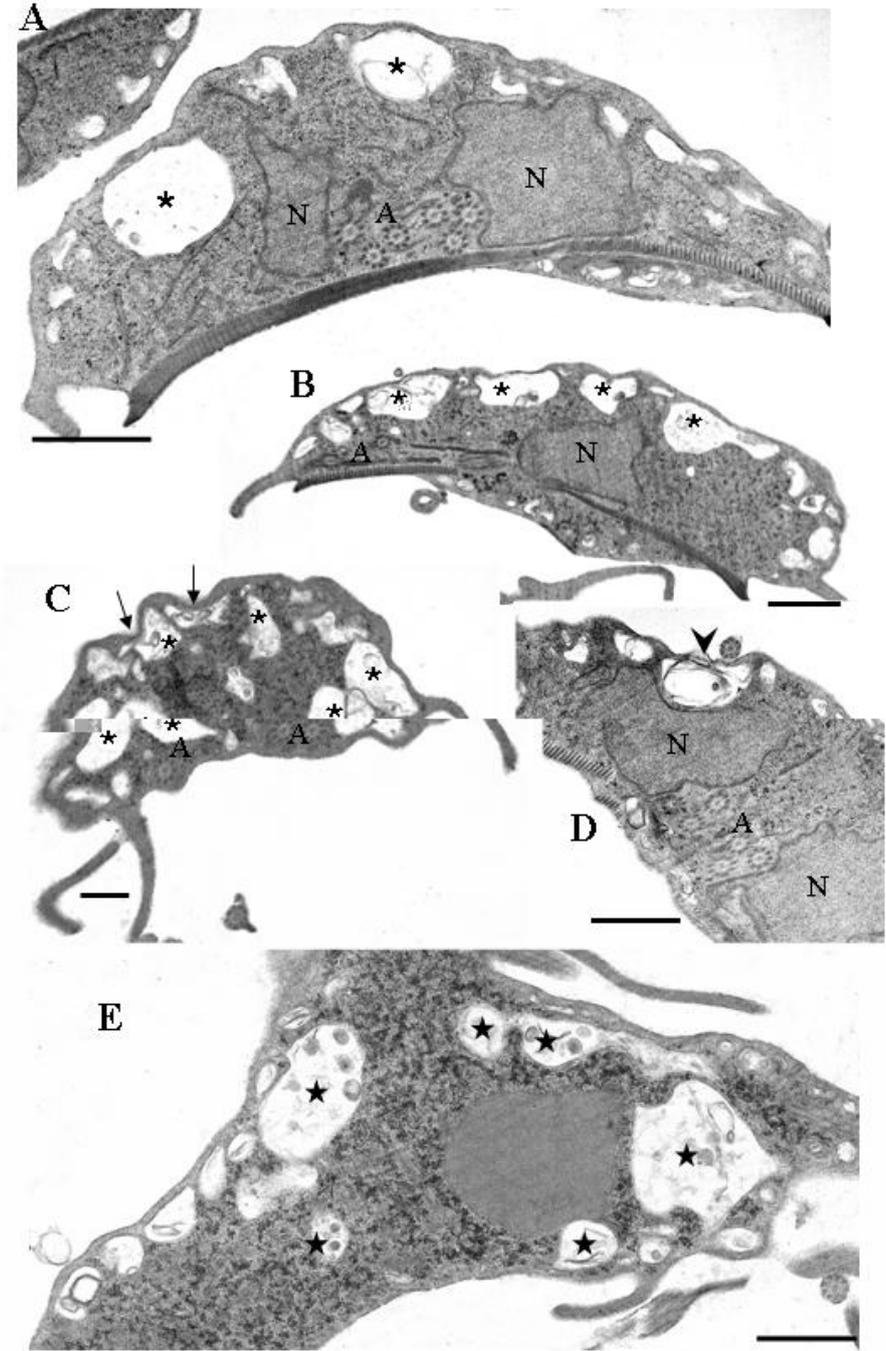
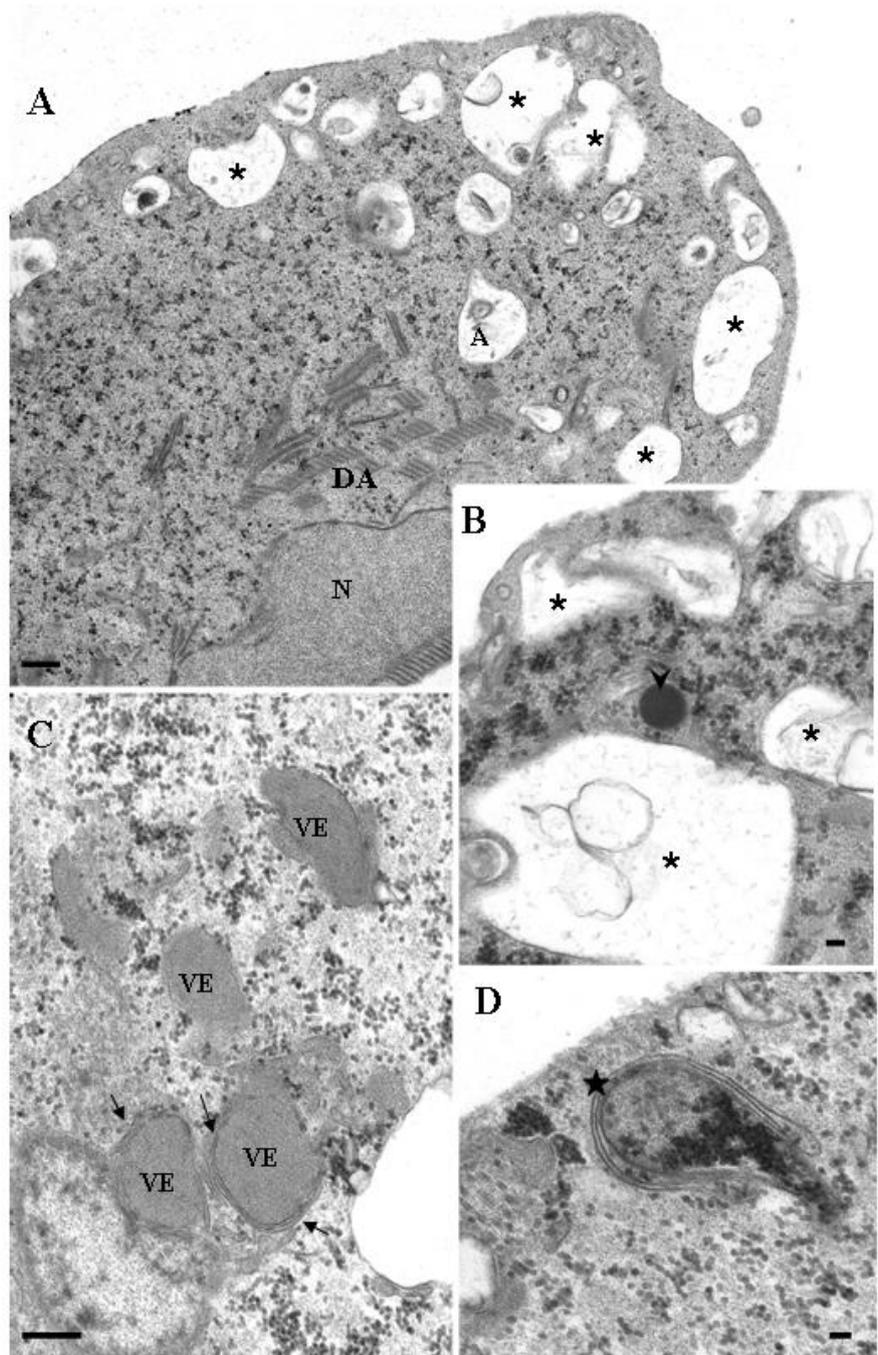


Figura 27: Alterações provocadas em devido ao tratamento com EPI na concentração de $10\mu\text{M}$ por 48 horas. Em A podemos verificar o aumento do tamanho das vesículas periféricas (*), porém concomitantemente à fragmentação do disco adesivo (DA), característica típica do processo de diferenciação celular. B: Novamente as vesículas periféricas aparecem aumentadas, e ainda há a presença de uma estrutura eletrondensa e de propriedades não determinadas (cabeça de seta). Em C, as vesículas de encistamento (VE) estão formadas, e estruturas membranares surgem em seu entorno (setas). D: Perfis de membranas (estrela), que parecem estar englobando porções do conteúdo celular, sugerindo início do processo de autofagia. N: núcleo; A: axonema flagelar. Barras: A= $0,6\mu\text{m}$; B= $0,4\mu\text{m}$; C e D= 200nm .



2.3. Bisfosfonado (RIS)

Por microscopia eletrônica de transmissão de culturas de tratadas com 100µM de risedronato (RIS) pudemos verificar uma intensa vacuolização das células, e em muitas vezes seus conteúdos citoplasmáticos apresentaram-se completamente extraídos (figuras 28 e 29). Algumas micrografias sugerem que certas vesículas estejam sendo liberadas no espaço extracelular. Vacúolos semelhantes aos de autofagia também puderam ser vistos durante o após 48 horas de incubação com RIS. Outra alteração evidente foi a formação de estruturas de membrana similares a figuras de mielina, as quais também puderam ser encontradas fora das células (figuras 29 e 30).

Ainda outro evento que parece estar ocorrendo devido ao tratamento com RIS é o de diferenciação. Uma das etapas desse processo pode ser acompanhada através do aparecimento de fendas para deposição do material de parede cística. Um cisto maduro também pode ser notado, bem como um outro em que seu conteúdo citoplasmático está extraído, sugerindo que este esteja morto ou inviável (figura 31).

Figura 28: Uma das principais alterações causadas em pelo tratamento com RIS foi uma intensa vacuolização celular (A e B, asteriscos), bem como quase total extração do conteúdo citoplasmático (C e D, estrelas). A seta mostra uma vesícula com material amorfo que parece estar sendo liberada pelo protozoário. N: núcleo; F: flagelo. Barras = 1µM.

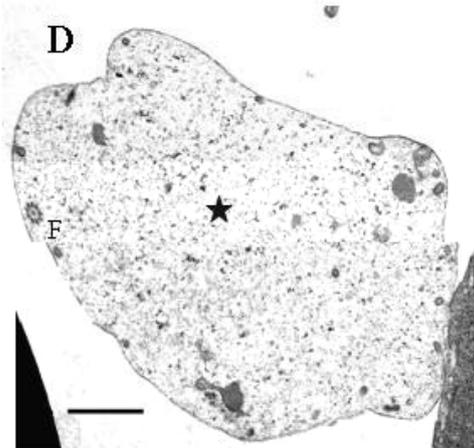
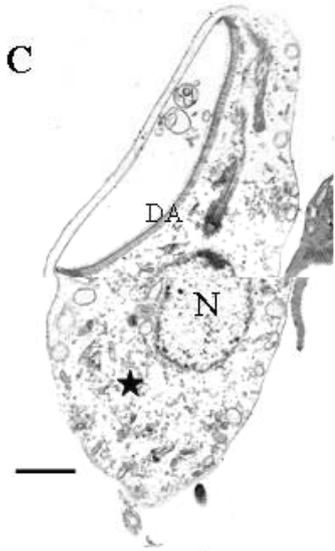
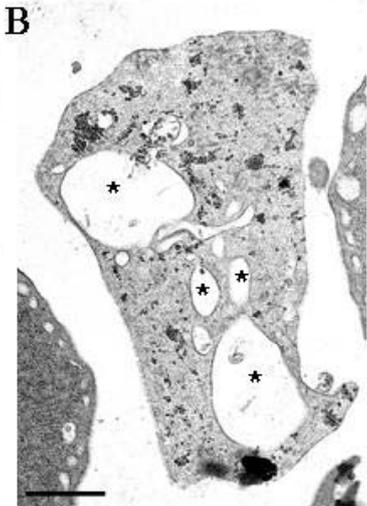
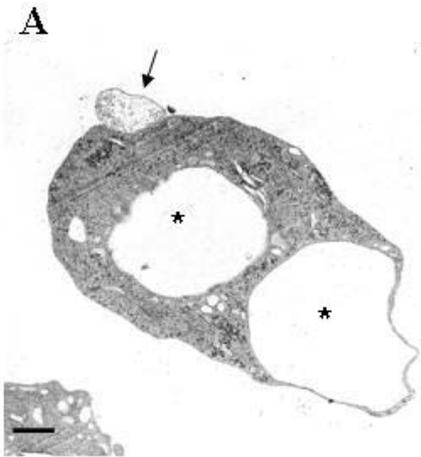


Figura 29: Micrografias demonstrando novamente o conteúdo extraído da célula (estrela, A) e a intensa vacuolização (asteriscos, B). Em B um dos vacúolos também contém material amorfo (cabeça de seta). A seta em C mostra uma vesícula sendo exocitada e seu conteúdo sendo disperso fora da célula. N: núcleo; F: flagelo. Barras: A=2 μ M; B= 1 μ M; C= 500nm.

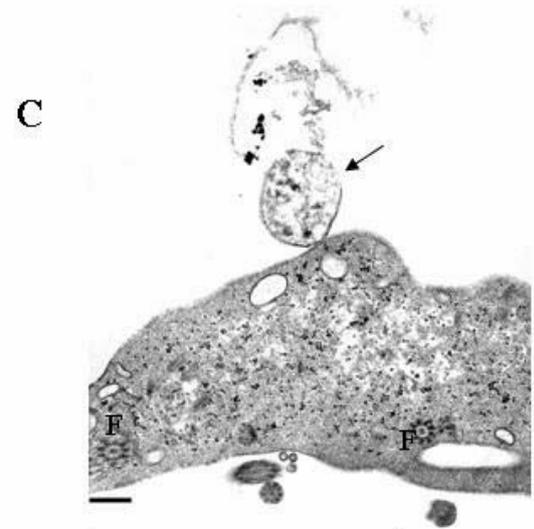
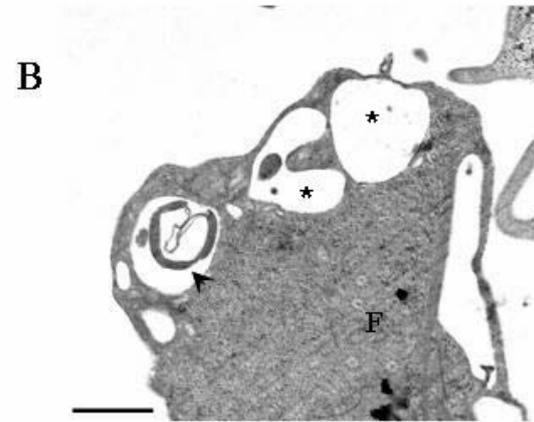
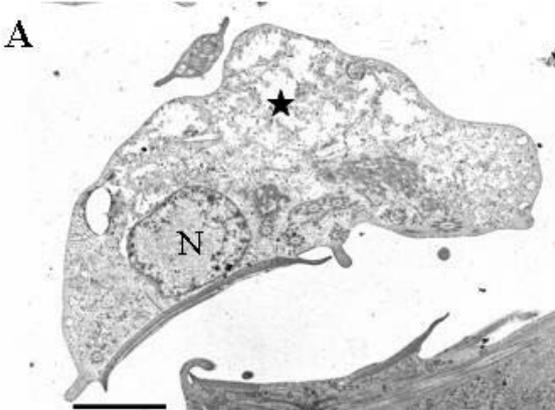
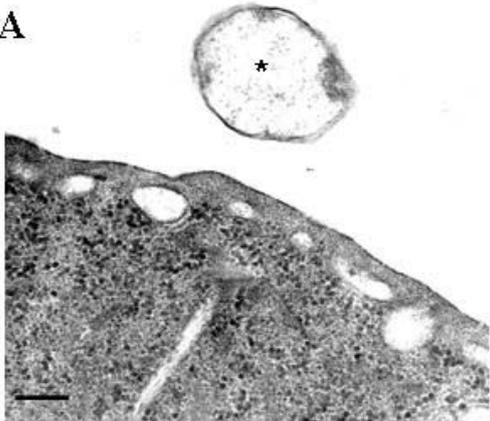
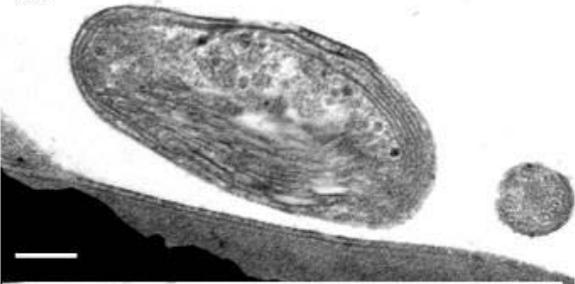


Figura 30: Em A podemos ver uma vesícula já fora da célula, provavelmente tendo sido exocitada (asterisco). Perfis de retículo similares a figuras de mielina puderam ser encontrados tanto dentro das células (C, setas) quanto fora (B) após o tratamento com risedronato. Barras: A, B= 200nm; C= 500nm.

A



B



C

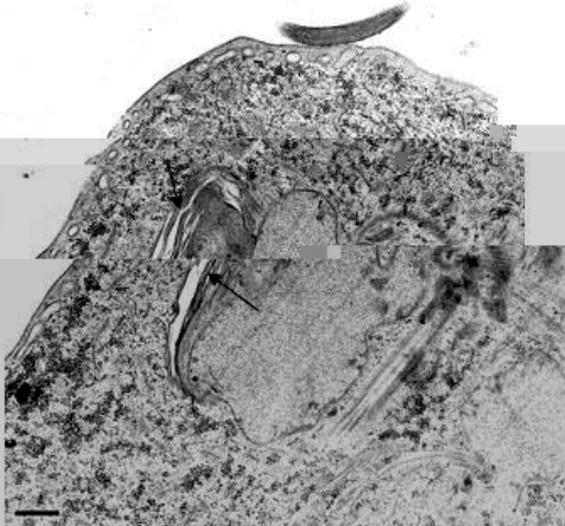
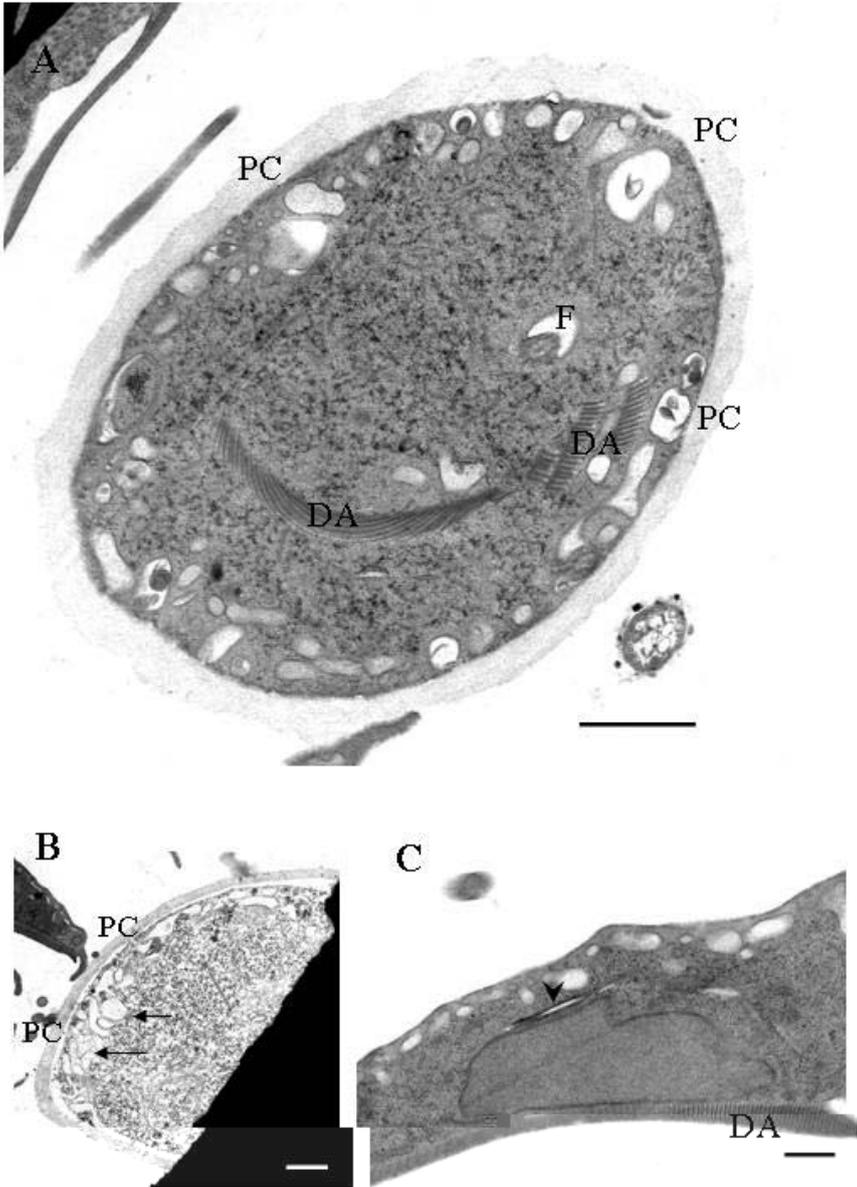


Figura 31: Outro tipo de alteração causada pela incubação com RIS foi o aparecimento de estruturas relacionadas ao processo de encistamento. Podemos ver o aparecimento das fendas (C, cabeça de seta), um cisto maduro e íntegro em A e um outro anômalo em B. Este último apresenta o seu citoplasma pouco eletrondenso e com vesículas incomuns, indicando sua provável inviabilidade. PC: parede cística; DA: disco adesivo; F: flagelo. Barras: A, B= 1 μ m; C= 500nm.



2.4. 1,4-diamino-2-butanona (DAB)

As culturas tratadas com DAB apresentaram como principais alterações o disco adesivo fragmentado no interior do parasito, juntamente com estruturas reticulares que parecem ser iniciais da formação de clefts, amplamente distribuídos através da célula. Em alguns casos as vesículas periféricas também se apresentaram alteradas no tamanho. Tanto nas incubações com a concentração de 0,1mM por 48 horas quanto em concentrações maiores pode-se observar o disco adesivo fragmentado, porém já sendo possível identificar a presença de vesículas de encistamento maduras. Pode-se constatar também a presença de vesículas contendo material amorfo, lembrando àquelas relacionadas ao processo de autofagia. Perfis de membrana aparecem no interior do núcleo, de origem ainda não identificada (figuras 32 e 33).

Figura 32: Alterações sofridas pela *Leishmania* após a incubação com DAB na concentração de 10 mM por 24 horas. Em A podemos acompanhar o início do processo de diferenciação, no qual os fragmentos do disco adesivo encontram-se interiorizados (DA), ainda nota-se a presença de axonemas flagelares distribuídos por locais não usuais na célula e uma fenda formada em D (seta). B: vesícula de encistamento madura (VE). C: cisto formado, onde a parede cística é evidente (PC). Barras: A= 500nm; B= 0,6 μ m; C= 200nm; D= 400nm.

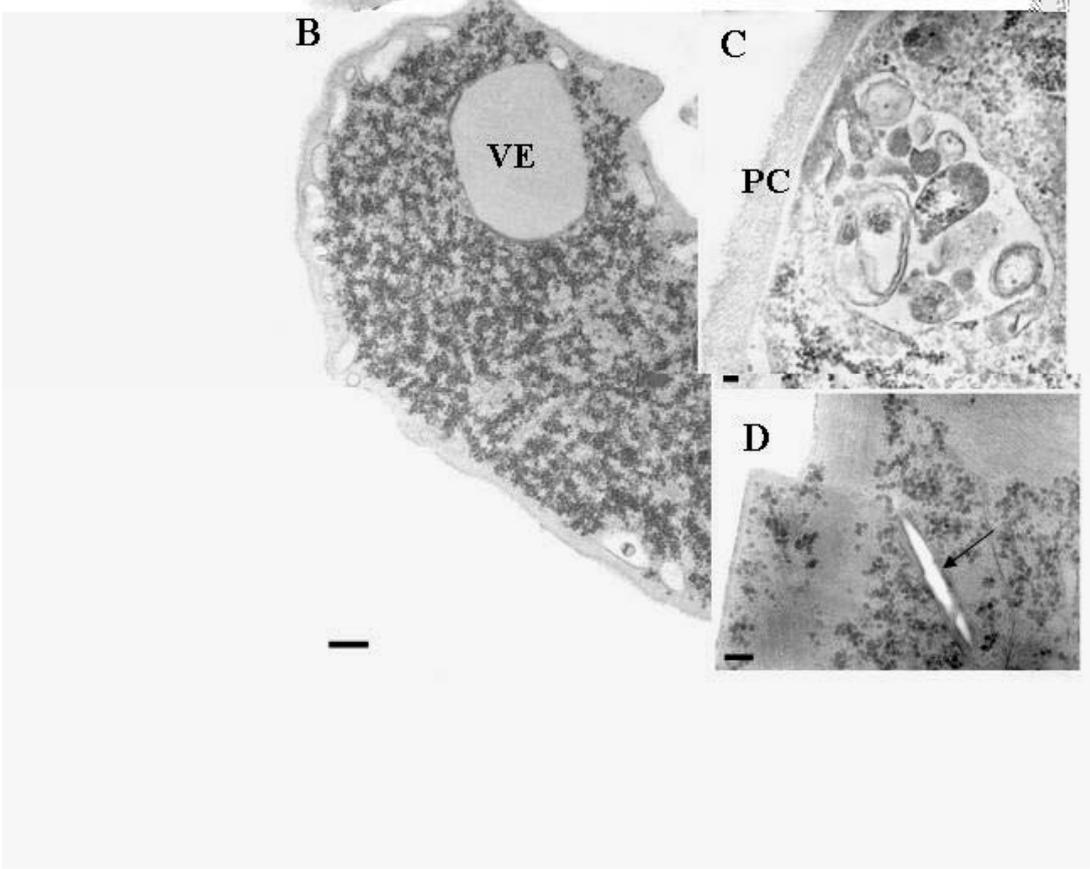
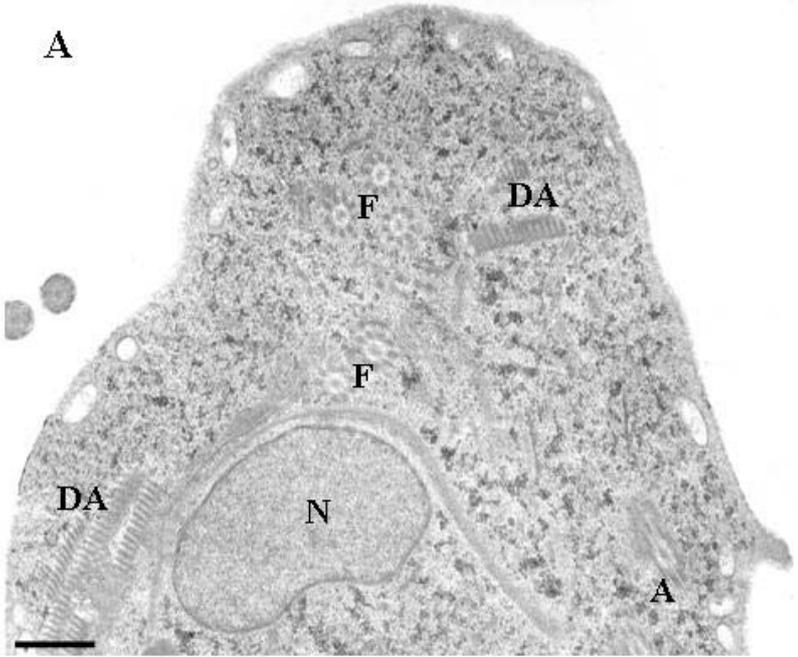
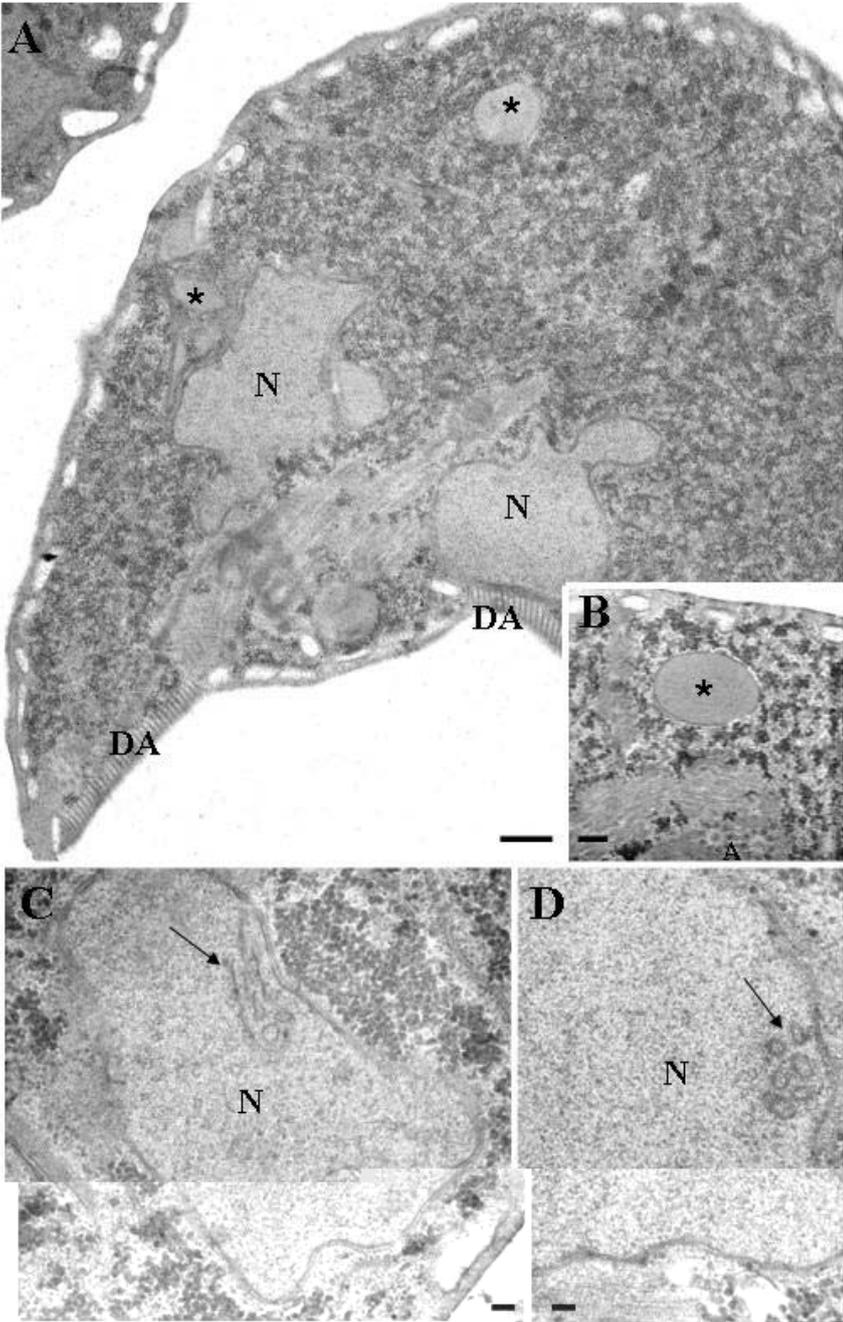


Figura 33: Alterações ultraestruturais observadas através de MET em *Leishmania* tratada com DAB 0,1mM por 48 horas. Em A pode-se observar a presença de vesículas de encistamento (*), assim como em B, a qual se encontra madura. Em C e D as setas apontam para perfis de membrana localizados no interior do núcleo celular, de origem ainda não identificada. N: núcleo; DA: disco adesivo; F: flagelo. Barras: A= 1 μ m; B= 0,4 μ m; C e D: 200nm.



V – Discussão

O principal fármaco para tratamento dos pacientes infectados com *Leishmania* é o metronidazol (Flagyl[®]), o qual até hoje não tem seu uso recomendado pela U. S. Food and Drug Administration (FDA). Tendo em vista que aumentam a cada dia os casos de cepas resistentes desses organismos, é necessário que as doses do fármaco administrado sejam aumentadas. Portanto, a busca por novas drogas alternativas no tratamento dessas doenças é imprescindível.

Algumas substâncias, como 22,26-azasterol, epiminolanosterol, WSP1267, BPQ-OH, E5700, ER119884 e risedronato, são conhecidas como inibidoras da biossíntese celular de esteróis – mais particularmente a de ergosterol. Existem ensaios que relatam os efeitos desses compostos em alguns fungos, protozoários e até mesmo plantas. Dentre os protozoários parasitos testados, podemos citar alguns tripanossomatídeos e o Apicomplexa *Leishmania*, além de *Trypanosoma*, organismo que tem uma posição indefinida filogeneticamente, situando-se entre fungi e protozoa (Palmié-Peixoto *et al.*, 2006; Martins-Duarte *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2005; Dantas-Leite *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2004; Dantas-Leite *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2002; Urbina *et al.*, 2002; Urbina *et al.*, 1997; Contreras *et al.*, 1997; McTaggart *et al.*, 1996; Urbina *et al.*, 1996; Vivas *et al.*, 1996; Urbina *et al.*, 1995; Nes *et al.*, 1991; Nes *et al.*, 1989).

Em *Leishmania*, protozoário do grupo Apicomplexa, o esterol que participa da composição de suas membranas é o colesterol. Embora esta molécula seja incorporada a partir do metabolismo do hospedeiro, algumas dessas drogas inibidoras da biossíntese de ergosterol citadas anteriormente causaram efeitos drásticos na proliferação e na ultraestrutura desse parasito intracelular obrigatório (Martins-Duarte *et al.*, 2006; Dantas-Leite *et al.*, 2005; Dantas-Leite *et al.*, 2004).

No caso do tripanossomatídeo *Leishmania*, a sua bactéria endossimbionte foi diretamente afetada quando as culturas foram tratadas com 22,26-azasterol. É sabido que procariotos não possuem esteróis na composição de suas membranas, sugerindo que o azasterol estaria agindo de forma distinta na célula. Tanto nesse caso como no de *Trypanosoma* foi visto que a proporção de alguns fosfolipídeos estava drasticamente alterada, indicando um outro possível alvo dessa droga (Palmié-Peixoto *et al.*, 2006; Dantas-Leite *et al.*, 2004).

Tendo em vista que alguns dos compostos acima causaram efeitos danosos a certos tipos celulares, os quais inclusive não sintetizam esteróis e/ou não os possuem, resolvemos testá-los em culturas do parasito intestinal *Trypanosoma*. Os resultados deste intento puderam ser analisados no presente trabalho.

As poliaminas são moléculas catiônicas que, devido as suas estruturas, têm afinidade por determinadas porções de cargas negativas e ácidas nas células, estabilizando-as. Elas vêm sendo utilizadas como alvos quimioterápicos em diversas células, e o que as difere dentre os modelos celulares não são suas composições, mas sim suas velocidades de síntese e degradação intracelular (*et al.*). Isso gera concentrações diferentes de poliaminas em cada tipo de célula, de acordo com suas respectivas necessidades. A relação parasito/hospedeiro onde os requisitos de poliaminas de cada um podem ser diferentes vem sendo alvo de recentes estudos. Portanto, as drogas que tenham como alvo a síntese e/ou os mecanismos de transporte intracelulares de poliaminas poderiam também se tornar excelentes quimioterápicos, já que teriam chance de acabar selecionando o tipo celular que se deseja suprimir.

Algumas moléculas já foram desenvolvidas para atuar no sistema de síntese e de transporte de poliaminas, principalmente causando efeitos em organismos responsáveis por parasitoses humanas. Dentre as drogas testadas uma das mais conhecidas é a DL- - difluorometilornitina (DFMO), a qual tem sido utilizado como droga para tratamento da

tripanossomíase africana e também em testes com trichomonádídeos (Bremner ., 1987; Santoro, 2002).

DFMO também já foi testado em culturas de , sendo que este trabalho de Gillin e colaboradores (Gillin ., 1984) é o único que se tem na literatura envolvendo este parasito e drogas inibidoras da biossíntese de poliaminas. Quando o inibidor da enzima ornitina descarboxilase DFMO foi testado em , a menor concentração usada foi de 5mM, sendo que 20mM desse composto não foi suficiente para reduzir totalmente a proliferação (Gillin ., 1984). Isso demonstra que, apesar de utilizar a enzima ODC para produzir poliaminas, essa não seria uma via única ou preferencial de produção, sugerindo que este organismo metabolize essas moléculas através de outras vias. Apesar disso, a putrescina, molécula que é diretamente produzida pela ação da ODC, é uma

celular e observando as respectivas alterações ultraestruturais mais evidentes nos parasitos. Com isso, novas perspectivas de possíveis quimioterápicos poderiam ser reveladas, bem como novos conhecimentos sobre a biologia celular desse protozoário.

1. Efeitos no metabolismo lipídico de *Giardia lamblia*

1.1. Efeitos proliferativos em culturas de *Giardia lamblia*

Neste trabalho foi testado um total de sete drogas dentre elas os ácidos zaragóxicos, os azasteróis e o bisfosfonado.

Os inibidores da esqualeno sintase (SQS), os ácidos zaragóxicos, foram inicialmente utilizados na tentativa de reduzir os níveis de colesterol em seres humanos, já que esta enzima está envolvida em um dos primeiros passos para a formação dos esteróis. Alguns desses inibidores vêm sendo testados ultimamente em protozoários parasitos com amplo sucesso, mesmo nos que não apresentam tal esterol como componentes de suas membranas, mas sim o ergosterol. Dentre eles podemos citar o 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH), o E5700 e o ER119884. Efeitos citotóxicos foram observados principalmente em tripanossomatídeos e apicomplexa, por exemplo (Urbina *et al.*, 2002; Braga *et al.*, 2004; Urbina *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005; Martins-Duarte *et al.*, 2006). Devido aos resultados obtidos em testes com *Trypanosoma brucei*, em que a enzima SQS também é ausente, foi proposto que E5700 e ER119884 teriam outro mecanismo de ação além do bloqueio da via metabólica ao nível da SQS. Entretanto, quando culturas de *Giardia lamblia* foram tratadas com BPQ-OH, E5700, ER119884 e WSP1267 nenhuma redução na proliferação foi obtida, e as células continuaram crescendo com o mesmo padrão dos controles não tratados. Esses

resultados com apicomplexa e demonstram que o(s) alvo(s) desses inibidores da biossíntese de esteróis (IBEs) permanecem ainda não totalmente elucidados.

Em , a concentração mínima de 22,26-azasterol (AZA) para inibir o crescimento das formas epimastigotas foi de 10 μ M por um período de 144 horas, e efeitos ultraestruturais drásticos só puderam ser observados quando a concentração de AZA foi de 30 μ M (Vivas , 1996; Urbina , 1995; Urbina , 1996). Em a concentração da droga que inibiu 50% da proliferação da cultura (IC₅₀) foi de 0,3 μ M, e para que houvesse uma redução de 80% no crescimento foi necessário 10 μ M, ambos por 96 horas (Urbina, 1997; Urbina , 1997). Somente em culturas de o IC₅₀ foi menor, já que foi preciso somente 1 μ M de AZA por um período de 24 horas para as formas promastigotas (Rodrigues , 2002). No atual trabalho, podemos perceber que é muito sensível ao AZA, já que para termos 50% de inibição da proliferação das culturas foi necessária a concentração de apenas 7 μ M por um período de 48 horas de incubação, sendo que a droga foi adicionada somente quando as células já estavam no início de sua fase de crescimento exponencial, e não no momento do inóculo, conforme os outros já citados. Apesar de inibir aproximadamente 62% do crescimento no total, o tempo de incubação foi menor do que todos os analisados até agora em outros protozoários em culturas axênicas, totalizando 48 horas. Esses valores estão próximos àqueles encontrados quando células renais de macaco Rhesus (LLCMK2) foram infectadas com , em que o IC₅₀ foi de 5,3 μ M após 24 horas e 4,5 μ M após 48 horas de incubação (Dantas-Leite , 2004).

A droga epiminolanosterol (EPI) já é comprovada com sendo um fármaco com efeitos antiproliferativos (Urbina , 1996; Dantas-Leite , 2004). Esse foi o azasterol que se demonstrou mais eficaz, com o IC₅₀ de 0,17 μ M com um tempo de incubação de 48 horas, sendo que a mesma também foi adicionada no início da fase logarítmica de crescimento, ou seja, 24 horas após o inóculo das células. Mais uma vez o resultado é semelhante àquele

encontrado por Dantas-Leite e colaboradores (Dantas-Leite *et al.*, 2004) em células de mamíferos infectadas com taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, onde a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular foi de 0,12 μ M de EPI. Através do gráfico da curva de crescimento de EPI (figura 12) podemos observar que a menor concentração da droga utilizada (0,1 μ M) já está próxima da faixa do IC₅₀, e que a inibição causada nos tratamentos tanto de 5 μ M quanto de 10 μ M foi de praticamente 100%, em se tratando da proliferação parasitária.

Os bisfosfonados são moléculas estáveis, análogas ao pirofosfato inorgânico, as quais já são utilizadas há mais de trinta anos no tratamento da reabsorção óssea causada por doenças como a osteoporose, por exemplo. Apesar de terem seu uso aprovado pela FDA e serem usados já há décadas, o alvo dos bisfosfonados, que é a via de isoprenóides, só foi revelado mais recentemente (Martin *et al.*, 1999). Só em 2001 foram descobertos seus efeitos na quimioterapia de protozoários parasitos, tais como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Plasmodium* (Garzoni *et al.*, 2004; Szajnman *et al.*, 2001; Martin *et al.*, 2001). O bisfosfonado risedronato (RIS) teve um dos melhores desempenhos, com valores de IC₅₀ em torno de 8,6 μ M quando incubado *in vitro* por 72 horas com a forma sangüínea tripomastigota de *Trypanosoma brucei* e 0,49 μ M quando testado em taquizoítos de *Toxoplasma gondii* por 48 horas (Martin *et al.*, 2001). É muito provável que *Toxoplasma gondii*, apesar de não sintetizar esteróis, tenha o início desta via em seu metabolismo, o que seria suficiente para que ocorra isoprenilação de proteínas. Evidências já puderam ser vistas com ensaios de incorporação de mevalonato e tratamento com estatinas (Luján *et al.*, 1995), além de ter sido reportada a presença de ubiquinona CoQ₉, uma molécula relacionada à respiração mitocondrial e que apresenta cadeias altamente preniladas (Ellis *et al.*, 1994). Foi proposto que *Toxoplasma gondii* incorpora mevalonato e o utiliza principalmente para produzir farnesil pirofosfato (FP) e geranil pirofosfato (GP), iniciando o processo de isoprenilação de proteínas (Luján *et al.*, 1995). Além disso, sua proliferação é

inibida quando estatinas são adicionadas ao meio de cultura, as quais atuam bloqueando a ação da enzima-chave para o processo de isoprenilação, a HMG-CoA redutase, o que impede a formação do ácido mevalônico e, conseqüentemente, a de FP e GP (Luján et al., 1995).

Não há na literatura dados demonstrando testes em que *G. lamblia* tenha sido submetida ao tratamento com bisfosfonados, inibindo a via ao nível da FP sintase e GP sintase. Neste trabalho trofozoítos de *G. lamblia* foram incubados com risedronato (RIS) por um período total de 48 horas, sendo que a droga só foi adicionada no início da fase exponencial de proliferação da cultura, ou seja, 24 horas após o inóculo. O IC₅₀ encontrado nesse ensaio após o tratamento foi de 12,11µM, valor este muito próximo àquele encontrado em testes com tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* (Martin et al., 2001). Ambas as culturas de amastigotas de *Trypanosoma brucei* e de *Leishmania amazonensis* em estágio intraeritrocítico tiveram seus valores de IC₅₀ em torno de 123µM (Martin et al., 2001; Garzoni et al., 2004). Isso mostra que RIS reduz de maneira expressiva o crescimento de *G. lamblia* em seu estágio proliferativo, atuando em concentrações muito baixas se comparadas às outras em determinados protozoários patogênicos, o que torna esse tratamento de alto valor especulativo e também como possível quimioterápico.

1.2. Alterações Morfológicas em *Giardia*

Todas as culturas de *G. lamblia*, tanto as tratadas quanto as controles, foram analisadas por microscopia óptica de contraste de fase, contraste interferencial (DIC) e campo claro, através da coloração com panótico. Contudo, não foi possível avaliar qualquer alteração morfológica significativa causada pelas drogas utilizando estes métodos e suas respectivas magnitudes.

Uma vez que não apresentaram efeitos morfológicos (análise através de microscopia óptica) e inibitórios no crescimento das culturas, as drogas do grupo i (ácidos zaragóxicos -

inibidores da SQS) não foram utilizadas para estudo das alterações ultraestruturais através de microscopia eletrônica nem da análise de compartimentos ácidos intracelulares.

Para os estudos de microscopia eletrônica de transmissão, as drogas do grupo **ii** (tanto AZA quanto EPI) foram incubados no sistema. As culturas foram estudadas em concentrações e tempos diferentes, e seus efeitos podem ser analisados na seção IV – resultados (2.1). Os efeitos causados pelo bisfosfonado RIS (grupo **iii**) também foram avaliados sob as mesmas condições.

Uma das alterações mais expressivas decorrentes do tratamento de com EPI foi o aparecimento de grandes vacúolos nas células, sendo que alguns provavelmente são vesículas periféricas com tamanho alterado. Sabe-se que as vesículas periféricas estão envolvidas no processo endocítico de , fazendo parte de um sistema endossomal-lisossomal (Bockman & Winborn, 1968; Lindmark, 1980; Feely & Dyer, 1987; Lanfredi-Rangel , 1997). É possível que as condições de estresse causadas pelos tratamentos tenham interferido de alguma maneira na composição lipídica das membranas, bem como em suas permeabilidades, inclusive aos íons, o que poderia afetar diretamente o metabolismo endocítico das vesículas periféricas, ocasionando o aumento no volume destas estruturas. Grandes vacúolos já foram observados anteriormente em outros tipos celulares tratados com azasteróis, tanto EPI quanto AZA (Dantas-Leite , 2004; Vivas , 1996; Braga , 2005) e, também, durante combinações de outros compostos inibidores da biossíntese de esteróis, como é o caso da edelfosina com o cetoconazol (Santa-Rita , 2005). Em alguns casos, houve um desenvolvimento exacerbado da bolsa flagelar de tripanossomatídeos, resultando em uma vacuolização desta área. Esta é uma porção celular que também está relacionada às atividades endocíticas e secretórias, e uma relação entre este tipo de alteração e essas drogas que alteram o metabolismo lipídico foi proposta (Carvalho & DeSouza, 1987; Soares & DeSouza, 1991; Figueiredo & Soares, 2000).

Outra alteração morfológica marcante é a presença de vacúolos com material amorfo em seu interior, circundado por perfis de retículo endoplasmático, semelhantes a autofagossomos. Além disso, membranas concêntricas estavam presentes nos citoplasmas dos trofozoítos de *Leishmania*, de forma similar a figuras de mielina, modificações essas vistas também durante a incubação com o bisfosfonado risedronato (RIS). Essas alterações foram vistas ainda em tripanossomatídeos e apicomplexa quando submetidos à incubação com inibidores da 24-SMT (Dantas-Leite *et al.*, 2004; Braga *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2002; Palmié-Peixoto *et al.*, 2006; Vivas *et al.*, 1996; Granthon-Azevedo, 2006). Essas estruturas foram observadas ainda em *Leishmania* e *Trypanosoma* quando tratados com outros inibidores da via de biossíntese de esteróis, tais como cetoconazol e terbinafina (Lazardi *et al.*, 1990, Vannier-Santos *et al.*, 1995), risedronato (Garzoni *et al.*, 2004), bis-triazol ICI-195,739 (Lazardi *et al.*, 1991), e ainda com diferentes azasteróis (Magaraci *et al.*, 2003; Lorente *et al.*, 2004) e edelfosina (Santa-Rita *et al.*, 2004). É sabido que durante o processo de autofagia ocorre a formação de vesículas, as quais se formam a partir de pequenas áreas do citoplasma ou organelas citoplasmáticas e são circundadas por membranas derivadas do retículo endoplasmático (Cooper, 2001). Há na literatura evidências de que a autofagia represente uma estratégia de sobrevivência celular em tempos de estresse (Edinger & Thompson, 2004). Entretanto, fenômenos autofágicos em organismos unicelulares ainda não estão tão bem elucidados quanto em células de mamíferos, por exemplo. Todavia, estudos com *Leishmania* sugerem que a presença de vacúolos contendo o acúmulo de material semelhante ao que foi visto no presente trabalho com *Leishmania* e em anteriores com tripanossomatídeos tratados com inibidores da biossíntese de esteróis sejam decorrentes de processo autofágico (Takeshige *et al.*, 1992). Além disso, pesquisas anteriores já demonstraram a presença desses vacúolos semelhantes aos de autofagia em protozoários microaerófilos, inclusive em *Leishmania*, quando submetidos à incubação com um alcalóide

(Kaneda et al., 1991). Em [redacted], o envolvimento do retículo endoplasmático em resposta a tratamentos com droga também sugeriu uma relação entre esta organela e processos de autofagia (Benchimol, 1999). O aparecimento dessas estruturas autofágicas (vacúolos e figuras de mielina) durante o tratamento de [redacted] com os IBEs pode estar ocorrendo devido a uma reciclagem anômala das unidades de membranas, sugerindo que neste protozoário ocorre um intenso remodelamento das organelas intracelulares, processo este que pode estar sendo comprometido e/ou interrompido com a utilização desses fármacos. Assim como os vacúolos autofágicos, as figuras de mielina no citoplasma das células tratadas provavelmente estão relacionadas à ausência e/ou mudanças na composição e nos níveis de esteróis, os quais são essenciais à manutenção da estrutura de membranas, inclusive as do retículo endoplasmático.

A incubação com EPI propiciou a formação de estruturas com material eletrondenso acumulado, não circundado por membranas, o que não está presente em trofozoítos controle de [redacted]. Esses “corpos eletrondensos” ainda não haviam sido descritos em outros organismos quando tratados com IBEs. Na literatura também jamais foi reportado em qualquer estrutura compatível com o que foi observado neste ensaio através da análise ultraestrutural do protozoário. Ainda não foi possível estabelecer qualquer correlação entre estas estruturas e o metabolismo deste parasito microaerófilo, nem mesmo qual a natureza desse material.

O outro azasterol testado foi o 22,26-azasterol (AZA), e uma das principais conseqüências do tratamento foi a indução do encistamento, onde podemos perceber alguns dos eventos que precedem este processo, desde a fragmentação e internalização do disco adesivo, formação das fendas para deposição do material de parede, passando pela fase das vesículas de encistamento maduras, até o aparecimento de cistos formados. Sabe-se que durante o encistamento de [redacted] ocorre uma mudança na composição dos ácidos graxos

presentes nas membranas, onde aumenta o número destas moléculas que se apresentam em sua forma insaturada (Ellis ., 1996). Muitas células sob estresse ambiental modificam as composições lipídicas de suas membranas para um estado mais insaturado; isso torna as

~~para os ácidos lipídicos, rod. Trabalho anterior~~

(entre outras transdutoras de sinais), e outras estão ligadas a GTP (Casey, 1995). Os nossos resultados sugerem que grande parte dos efeitos observados em também possam ser provenientes da inibição da FP sintase e da GP sintase. Embora o mecanismo molecular preciso dos efeitos de RIS serem complexos e até agora permanecerem obscuros, eles podem estar relacionados à alteração da síntese e do rearranjo protéicos, associado à sinalização celular anormal, devido à depleção de poli-isoprenóides essenciais.

., 2006), bem como pela ação de AZA no endossimbionte sem esteróis do tripanossomatídeo (Palmié-Peixoto ., 2006). Somente a enzima farnesil pirofosfato sintase (FP sintase) teve suas respectivas seqüências encontradas no genoma de . Essa informação é relevante se considerarmos que este parasito intestinal isoprenila proteínas (Luján ., 1995), embora não sintetize esteróis (Jarroll ., 1981). Além disso, apresenta uma seqüência que codifica uma proteína de função catalítica chamada **esqualeno oxidase**, a qual não apresentou similaridade com qualquer outro organismo, nem mesmo os dos reinos protista e fungi, podendo ser considerada exclusiva desse parasito até o presente momento. Apesar disso, ainda não se sabe qual seria exatamente a função desta enzima, já que não há trabalhos na literatura sobre este assunto. ¹

Em um artigo publicado por Ellis e colaboradores (Ellis ., 1996) foi visto que outros esteróis além do colesterol (o qual é captado do meio) estão presentes com certa representatividade em . Entretanto, ainda não se tem evidências de que este protozoário tenha a capacidade de metabolizar o colesterol captado a outras moléculas de esteróis, utilizando parte da via biossintética presente em outros modelos celulares. Os estudos com os IBEs podem ainda nos trazer mais informações acerca do complexo e desconhecido metabolismo de , além de serem promissores em se tratando da quimioterapia parasitária, constatado no presente trabalho.

¹ Para se chegar a tal resultado, foi feita uma pesquisa para localizar regiões de seqüências similares no código genético (BLAST -) entre os organismos mencionados anteriormente.

2. Efeitos no metabolismo de poliaminas de *Giardia lamblia*

2.1. Efeitos proliferativos nas culturas e na biologia celular de *Giardia*

Neste trabalho um análogo da poliamina putrescina, o 1,4-diamino-2-butanona (DAB), foi testado como inibidor da proliferação de culturas de *Giardia lamblia*. Apesar desse fármaco já ter sido utilizado como molécula auxiliar no estudo da biologia celular envolvendo a via de poliaminas, sua eficiência foi comprovada ainda na área quimioterápica, com resultados promissores (Menezes *et al.*, 2006; Lopes, 2004; Santoro, 2002; Reis *et al.*, 1999). O IC₅₀ encontrado em *Giardia lamblia* após 8 dias de tratamento com DAB foi de 1,99mM (Lopes, 2004), enquanto que para *Trichomonas vaginalis* esse valor foi de 1,18mM após 4 dias de incubação (Menezes *et al.*, 2006). As concentrações necessárias para inibir o crescimento de trichomonadídeos foram as mais altas, girando em torno de 20mM (Reis *et al.*, 1999; Santoro, 2002). *Trichomonas vaginalis* demonstrou ser muito sensível ao DAB se comparada aos outros protozoários, já que seus IC₅₀ foram os mais baixos, com valores menores que 1mM, na faixa de micromolar. Esse dado é importante devido ao fato de as poliaminas serem encontradas nas células em concentrações na faixa de milimolar (Thomas & Thomas, 2001; Yarlett, 1988). Além disso, o tempo total de incubação com a droga foi de 48 horas, sendo que a mesma só foi adicionada ao sistema 24 horas após o inóculo inicial, ou seja, no início da fase logarítmica de crescimento. Em todos os trabalhos anteriores, a droga foi adicionada no momento do inóculo, quando as culturas ainda não estavam completamente adaptadas ao sistema e o crescimento ainda não havia sido estabelecido. Nos casos de *Trichomonas vaginalis* e *Giardia lamblia*, os estágios utilizados para os ensaios não foram os mesmos que são encontrados nos hospedeiros vertebrados em seu estado proliferativo e vegetativo, mas somente os estágios encontrados em seus respectivos hospedeiros invertebrados, ou seja, durante suas formas infectivas (Menezes *et al.*, 2006; Lopes, 2004). Já no presente trabalho, as culturas de

foram submetidas ao tratamento em sua forma proliferativa, ou seja, aquela presente no epitélio intestinal dos mamíferos, causadora da parasitemia em si, o que torna os resultados mais promissores.

Durante o co-tratamento de DAB com o metronidazol (Flagyl[®]), que é a droga de escolha nos tratamentos de infecções causadas por parasitos anaeróbicos, pode-se observar um efeito sinérgico, mesmo com ambas as drogas sendo utilizadas em concentrações muito menores do que aquelas que causaram a inibição proliferativa. Esse resultado confirma os anteriores, que sugerem um papel protetor das poliaminas na sobrevivência de *Trichomonas vaginalis*, atuando como agente anti-oxidante. Quando metronidazol é ativado no metabolismo do parasito uma série de reações oxi-redutoras se inicia, gerando radicais livres tóxicos ao organismo anaeróbico alvo. A depleção de poliaminas do sistema aumentaria o poder citotóxico do metronidazol, já que o parasito perderia parte de seu sistema protetor anti-oxidante.

No experimento onde a atividade da enzima ODC foi dosada, foi visto que a mesma não possui intensa atividade no metabolismo de trofozoítos de *Trichomonas vaginalis*. Esse resultado já sugere que a putrescina intracelular nesse organismo seria proveniente de outras fontes. Para tal, foi feito um ensaio de captação de putrescina tritiada, onde se verificou que a mesma não era proveniente de fontes externas, já que foram ínfimos os resquícios radioativos intracelulares provenientes dessa molécula. Isso corroborou a hipótese de que a via preferencial de produção de poliaminas em *Trichomonas vaginalis* seria através da ação da enzima arginina descarboxilase (ADC). Esse resultado é coerente com os que foram apresentados por Gillin e colaboradores (Gillin *et al.*, 1984), onde o uso da droga inibidora da atividade da ODC não inibiu significativamente a proliferação de *Trichomonas vaginalis* em baixas concentrações, a não ser quando doses mais elevadas do fármaco foram utilizadas.

Entretanto, desde que a poliamina putrescina não é incorporada pela , os resultados obtidos não explicam o evento pelo qual o análogo DAB estaria sendo captado pela célula e, conseqüentemente, acarretando os efeitos proliferativos e ultraestruturais. Resultados de tratadas com DAB sugeriram que a droga teve sua entrada na célula através de transportadores de putrescina (Lopes, 2004). Esse protozoário possui transportadores de poliaminas distintos, sendo que um deles seria responsável pela captação de putrescina (Kandpal & Tekwani, 1997). Em trichomonadídeos, sabe-se que existe um fluxo inverso, onde duas moléculas de putrescina são liberadas ao meio extracelular concomitantemente à entrada de uma molécula de espermina (Yarlett & Bacchi, 1994). Neste caso, DAB estaria acarretando seus efeitos tóxicos ao impedir esse sistema de antiporte que confere efeitos protetores desse organismo (Reis , 1999). Em ainda não se tem informações sobre qualquer tipo de transportador para poliaminas, permanecendo obscuras ainda as hipóteses sobre como ocorreria a entrada do análogo DAB neste protozoário.

O DAB, sendo um análogo de uma molécula-chave (putrescina), ao se encontrar no sistema em questão pode ter de certa forma alterado ou inibido a biossíntese de poliaminas através de “feedback” ou retroalimentação, indicando à célula que já existiria quantidades significativas da molécula. Mais uma vez as circunstâncias nos levam a crer que seja realmente a arginina descarboxilase (ADC) a responsável por esse evento. Entretanto, após certo tempo (24 horas, por exemplo) a atividade de outra enzima poderia também estar sendo aumentada para compensar a desestruturação do metabolismo de PAs, o que foi indicado no ensaio da ODC. Esta enzima, apesar de não ser a preferencial na produção das PAs em , poderia estar sendo utilizada como escape devido às condições estressantes provocadas pela droga.

2.2. Alterações morfológicas em *Giardia lamblia*

As culturas tratadas com diferentes concentrações de DAB foram analisadas através de microscopia óptica, utilizando um microscópio de contraste interferencial (DIC) para análise da motilidade de células vivas, bem como a morfologia de células fixadas. O uso do corante panótico foi uma ferramenta para analisar algumas das estruturas de ; entretanto, assim como nos tratamentos com os IBEs, alterações significativas não puderam ser observada utilizando-se essas ferramentas.

Através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível perceber a ocorrência de encistamento durante a incubação com DAB. Podem-se notar vários eventos desse processo, tais como a desorganização dos axonemas no citoplasma, fragmentação e internalização do disco adesivo, formação de fendas para deposição de material de parede, as vesículas de encistamento propriamente ditas, aparecimento do cisto formado. O tratamento de trichomonadídeos com o inibidor da ODC, o DFMO, levou à formação de pseudocistos, estágio este de funções metabólicas reduzidas (Santoro, 2002). É sabido que a formação desses pseudocistos pode ser induzida em culturas pelo estresse oxidativo (Mattern .., 1973) ou pela redução da temperatura (Granger .., 2000). Sendo desprovidos de parede cística, estes pseudocistos não têm a função de resistência no ciclo vital dos parasitos, mas indicam a exposição a condições desfavoráveis, podendo representar um marcador biológico em testes de fármacos microbicidas. Em testes prévios a droga DFMO induziu ainda o encistamento de (Kim .., 1987). Em , sabe-se que a redução nos níveis da atividade da ODC está relacionada ao processo de diferenciação (Calvo-Mendez .., 1993). Contudo, não há na literatura relação alguma entre o processo de diferenciação de e o metabolismo de poliaminas. Os presentes resultados levaram a sugerir que a depleção de poliaminas em e, conseqüentemente, a

perda de sua proteção anti-oxidante, gerou algum tipo de estresse ainda não esclarecido que tenha disparado os eventos de sinalização para a indução do encistamento.

A presença de perfis membranosos no interior dos núcleos pode ser devido, pelo menos em parte, ao “turnover” de membrana causado pela peroxidação de lipídeos, uma vez que este processo é regulado por poliaminas (Tadolini, 1988). Sabe-se que as poliaminas inibem a peroxidação de lipídeos de membrana em eritrócitos causada por radicais livres (Farriol et al., 2003). Uma alteração desenfreada desse controle celular poderia ser responsável pelo aparecimento de perfis de membranas em locais incomuns, inclusive nas porções nucleares, por exemplo. Esse processo poderia estar relacionado ainda à autofagia, já que o envolvimento de perfis de retículo em organelas celulares é um indicativo desse processo (Kaneda et al., 1991). Foi observada anteriormente em *Trichomonas* a presença de figuras de mielina no citoplasma após o tratamento com o análogo da putrescina DAB (Lopes, 2004); o aparecimento de vesículas com material amorfo em seu interior foi visualizado por MET em *Trichomonas* ao ser incubado com a mesma droga (Menezes et al., 2006). Em *trichomonadídeos* foi visto que parte do citoplasma era englobado por processos de membrana emitidos de compartimentos presumivelmente hidrogenossomais. Foi sugerido que o significado desse processo poderia representar um processo de compensação da deficiência de algum metabólito por esta organela de origem endossimbionte, o que seria ocasionado provavelmente por processos de autofagia (Santoro, 2002). O mesmo tipo de vesículas também pode ser observado em cistos de *Trichomonas* formados, levando a crer que este protozoário esteja sofrendo uma série de complicações em seu metabolismo, podendo gerar cistos que se tornariam inviáveis caso fossem liberados no ambiente pelo hospedeiro.

Dados prévios demonstraram que através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode-se notar que DAB não chegou a bloquear o processo inicial da divisão celular, mas impediu a septação após a mitose (Maia et al., submetido). Tal efeito pode estar

relacionado com o fato de as poliaminas regularem em parte o ciclo celular. É sabido que existem mudanças nas concentrações de ODC e de poliaminas durante o ciclo celular de algumas células eucarióticas (Thomas & Thomas, 2001). No caso de podemos extrapolar esse resultado para a enzima ADC, já que esta é a principal responsável pelos altos níveis desses polímeros neste organismo. Um acúmulo intracelular do análogo da putrescina poderia estar promovendo no parasito um mecanismo de “feedback” ou “retroalimentação”. Isso significa que, em presença de grandes concentrações de putrescina ou do seu análogo, a enzima ADC poderia estar sendo inibida. Portanto, o papel que as poliaminas desempenhariam no ciclo celular de estaria sendo suprimido. Alguns autores chegaram a sugerir que o DAB atuaria como um inibidor da ODC (Stevens ., 1977; Calvo-Mendez ., 1993; Artega-Nieto ., 1996), porém seu verdadeiro mecanismo ainda não foi totalmente elucidado.

Muitos dos passos envolvidos na biossíntese de poliaminas nos parasitos são comuns às células de mamíferos, entretanto tentativas de desenvolvimento de uma quimioterapia anticâncer baseada na via de poliaminas ainda não obtiveram sucesso. As células de mamíferos desenvolveram um sofisticado mecanismo regulatório dos níveis de poliaminas que impede o sucesso dos inibidores desta via. A dificuldade de interferir na síntese de poliaminas em células de mamíferos sugere um alvo promissor para a quimioterapia antiparasitária, onde análogos de putrescina podem ser usados em combinação com doses menores de drogas já disponíveis, diminuindo efeitos colaterais, e mecanismos compensatórios homeostáticos podem ser considerados no desenho racional de drogas contra a giardíase.

VI – Conclusões

Este trabalho teve como objetivo principal apresentar um estudo sobre a proliferação e a ultraestrutura de cepa P1 quando tratada com diferentes inibidores que atuam no metabolismo de esteróis, visando a procura de possíveis drogas alternativas no tratamento da giardíase. Além disso, um análogo de pirofosfato inorgânico e inibidor do processo de isoprenilação de proteínas (risedronato), e um análogo da poliamina putrescina foram utilizados também para testes como fármacos alternativos e ainda para melhor compreensão do metabolismo lipídico e de poliaminas de . Após analisar os resultados deste trabalho as seguintes conclusões foram obtidas:

- é sensível ao 22,26-azasterol e ao epiminolanosterol, com valores de IC_{50} atingindo a faixa de submicromolar, e insensível às drogas relacionadas à esqualeno sintetase.
- Alterações no volume das vesículas periféricas e surgimento de estruturas autofágicas foram algumas das principais alterações morfológicas ultraestruturais causadas por esse grupo de drogas.
- O processo de diferenciação parece estar sendo induzido quando adicionamos azasteróis nas culturas, causando até mesmo aumento do tamanho das vesículas de encistamento nos parasitos tratados.
- Os resultados sugerem que não existe um alvo específico ainda conhecido para os azasteróis.
- Culturas de cepa P1 não sofrem efeitos quando alguns inibidores da esqualeno sintetase (BPQ-OH, E-5700, ER-119884 e WSP-1267) são adicionados ao sistema.

- Culturas de *Giardia lamblia* são sensíveis ao bisfosfonado risedronato, o qual deve estar atuando no processo de isoprenilação de proteínas do parasito.
- Intensa vacuolização celular e indução do encistamento são alguns dos principais efeitos derivados do tratamento com risedronato.
- A incubação com o análogo da poliamina putrescina acarretou diminuição da proliferação de trofozoítos em culturas, sendo que o encistamento foi induzido após o tratamento com composto.
- O co-tratamento do análogo com a droga disponível no mercado, o metronizadol, propiciou uma inibição de modo sinérgico das culturas.
- Os compostos usados neste trabalho necessitam de testes mais profundo para se possa averiguar a probabilidade de serem utilizados no futuro como drogas alternativas no tratamento da giardiase.

Referências

- Adam RD. **2001**. Biology of *Cryptosporidium parvum*. Clin Microbiol Rev. 14: 447-475.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Walter P. **2002**. Molecular Biology of the Cell. 4th ed., Garland, London, pp. 577-599.
- Andrews BJ, Mylvaganam H & Yule A. **1994**. Sensitivity of *Leishmania* spp. to bacitracin and its zinc salt. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 88: 704-706.
- Ankri S & Mirelman D. **1999**. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect. 1: 125-129.
- Aoyama Y, Yoshida Y, and Sato R. **1984**. Yeast cytochrome p-450 catalyzing lanosterol 24 - demetilation. J. Biol. Chem. 259:1661-1666.
- Arteaga-Nieto P, Villagomez-Castro JC, Calvo-Mendez C & Lopez-Romero E. **1996**. Partial purification and characterization of ornithine decarboxylase from *Leishmania* spp. Int. J. Parasitol. 26: 253-260.
- Ator MA, Schmidt J, Adams JL & Dolle RE. **1989**. Mechanism and inhibition of ²⁴-sterol methyltransferase from *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. Biochemistry, 28: 9633-9640.
- Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP & Sjoerdsma A. **1980**. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. Science. 210: 332-334.
- Bacchi CJ & Yarlett N. **2002**. Polyamine metabolism as a chemotherapeutic target in protozoan parasites. Mini Rev Med Chem. 2: 553-563. Review.
- Barret-Bee K, Lane AC & Turner RW. **1986**. The mode of antifungal action of tonalftate. J. Med. Vet. Mycol. 24: 155-160.
- Barret-Bee K & Ryder NS. **1992**. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibitors. Sutcliffe J., Georgopapadakou NH (ed): Emerging targets in Antibacterial and antifungal chemotherapy. New York, Chapman and Hall, pp. 410-436.

- Basu HS, Smirnov IV, Peng HF, Tiffany K & Jackson V. **1997**. Effects of spermine and its cytotoxic analogs on nucleosome formation on topologically stressed DNA . *Eur. J. Biochem.* 243: 247-258.
- Bauer B, Engelbrecht S, Bakker-Grunwald T & Scholze H. **1999**. Functional identification of alpha 1-giardin as an annexin of . *FEMS Microbiol. Lett.* 41: 147-53.
- Baveja UK, Bhatia VN & Warhurst DC. **1998**. : in vitro sensitivity to some chemotherapeutic agents. *J. Commun. Dis.* 30: 79-84.
- Becker B & Melkonian M. **1996**. The secretory pathway of protists: spatial and functional organization and evolution. *Microbiol. Rev.* 60: 697-721.
- Benchimol M. **1999**. Hydrogenosome autophagy: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell.* 91: 165-174.
- Benchimol M. **2002**. A new set of vesicles in . *Exp. Parasitol.* 102: 30-37.
- Benchimol M. **2004 a**. : behavior of the nuclear envelope. *Parasitol. Res.* 94: 254-264.
- Benchimol M. **2004 b**. Mitosis in : Multiple Modes of Cytokinesis. *Protist* 155: 33-44.
- Benchimol M. **2005**. The nuclei of : new ultrastructural observations. *Arch. Microbiol.* 183: 160-168.
- Benchimol M, Piva B, Campanati L and de Souza W. **2004**. Visualization of the funis of by high-resolution field emission scanning electron microscopy – new insights. *J. Struct. Biol.* 147:102-115.
- Bendesky A, Menéndez D, Ostrosky-Wegman P. **2002**. Is metronidazole carcinogenic? *Mut. Res.* 511: 133–144.
- Begstrom JD, Dufresne C, Bills G, Nallin-Omstead M & Byrne K. **1995**. Discovery, biosynthesis and mechanism of action of the zaragozic acids: Potent inhibitors of squalene synthase. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:607-639.
- Bingham AK & Meyer EA. **1979**. excystation can be induced in acidic solution. *Nature.* 227: 301-302.
- Bockman DE & Winborn WB. **1968**. Electron microscopic localization of exogenous ferritin with vacuoles of . *J. Protozool.* 15: 26-30.

- Boreham PFL; Philips RE & Shepherd RW. **1985**. A comparison of the in vitro activity of some 5-nitroimidazoles and other compounds against *Trichomonas vaginalis*. J. Antimicrob. Chemother. 14:449-461.
- Boreham PFL, Philips RE & Shepherd RW. **1987**. Heterogeneity in the responses of clones to anti-giardial drugs. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81: 406-407.
- Boreham PFL & Upcroft JA. **1991**. The activity of azitromycin against stocks of *Trichomonas vaginalis* in vitro and in vivo. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 85: 620-621.
- Braga MV, Urbina J & DeSouza W. **2004**. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trichomonas vaginalis*. Int. J. Antimicrob. Ag. 24: 72-78.
- Braga MV, Magaraci F, Lorente SO, Gilbert I & DeSouza W. **2005**. Effects of inhibitors of ²⁴⁽²⁵⁾-sterol Methyl transferase on the ultrastructure of epimastigotes of *Trypanosoma brucei*. Microsc. Microanal. 11: 506-515.
- Bremmer AF, Coombs GH & North, MJ. **1987**. Antitrichomonal activity of alpha-difluoromethylornithine. J. Antimicrob. Chemother. 20: 405-411.
- Brown DM, Upcroft JA & Upcroft P. **1996**. A H₂O-producing NADH oxidase from the protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. Eur. J. Biochem. 241: 155-161.
- Brunton VG, Grant MH & Wallace HM. **1990**. Spermine toxicity and glutathione depletion in BHK-21/C13 cells. Biochem Pharmacol. 40: 1893-900.
- Brunton VG, Grant MH & Wallace HM. **1991**. Mechanisms of spermine toxicity in baby-hamster kidney (BHK) cells. The role of amine oxidases and oxidative stress. Biochem. J. 280 (pt 1): 193-198.
- Cabello RR, Guerrero RL, Muñoz García MR & Geyne Cruz A. **1997**. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infection in Mexico. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91: 701-703.
- Calvo-Mendez C, Villagomez-Castro JC & Lopez-Romero E. **1993**. Ornithine decarboxylase activity in *Trichomonas vaginalis*. Int. J. Parasitol. 23: 847-52.
- Campanati L, Gadelha AP & Monteiro-Leal LH. **2001**. Electron and video-light microscopy analysis of the in vitro effects of pyrantel pamoate on *Trichomonas vaginalis*. Exp. Parasitol. 97: 9-14.
- Campanati L, Holloschi A, Troster H, Spring H, de Souza W & Monteiro-Leal LH. **2002**. Video-Microscopy observations of fast dynamic processes in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. Cell Mot. Cytoskel. 51:213-224.

- Carvalho TU & DeSouza W. **1987**. Effect of phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) on the fine structure of _____ and its interaction with activated and resident macrophages. *Parasitol. Res.* 74: 11-17.
- Casey PJ. **1995**. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem. Soc. Trans.* 23: 161-166.
- Coombs GH & Müller M. **1995**. Energy metabolism in anaerobic protozoa. : Marr, JJ., Müller, M. (Eds.) *Biochemistry and molecular Biology of Parasites*, Academic Press, New York, NY, pp. 33-47.
- Cooper GM. **2001**. *A Química das Células. A célula: uma abordagem molecular.* 2^a ed. Porto Alegre. Artmed Ed. pp. 65-112.
- Cohen, S. **1998**. *A Guide to the Polyamines.* Oxford University Press, Oxford, UK.
- Contreras LM, Vivas J & Urbina JA. **1997**. Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membranes from _____ epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 53: 697-704.
- Crossley R & Holberton DV. **1983**. Characterization of proteins from the cytoskeleton of _____. *J. Cell. Sci.* 59: 81-103.
- Dantas-Leite L, Urbina JA, DeSouza W & Vommaro RC. **2004**. Selective anti _____ activities of azasterols. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23: 620-626.
- Dantas-Leite L, Urbina JA, DeSouza W & Vommaro RC. **2005**. Antiproliferative synergism of azasterols and antifolates against _____. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 25: 130-135.
- Darbon A; Portal A, Girier L; Pantin J & Leclaire C. **1962**. Traitement de la giardiase (lambliase) par le métronidazole. Apropos of 100 cases. *Presse Med.* 70: 15-16.
- Das S, Castillo C & Stevens T. **2001**. Phospholipid remodeling/generation in _____ : the role of the Lands cycle. *Trends. Parasitol.* 17: 316-319.
- Das S, Stevens T, Castillo C, Vallaseñor A, Arredondo H & Reddy K. **2002**. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. *Int. J. Parasitol.*, 32: 655-675.
- Davidson NE, Hahm HA, McCloskey DE, Woster PM, Casero R A Jr. **1999**. Clinical aspects of cell death in breast cancer: the polyamine pathway as a new target for treatment. *Endocr. Relat. cancer*; 6: 69-73.

- De Mello, FG, Bachrach U & Nirenberg M. **1976**. Ornithine and glutamic acid decarboxylase activities in the developing chick retina. *J. Neurochem.* 27: 847-851.
- DeSouza W, Dantas-Leite L, Urbina JA & Vommaro RC. **2005**. Antiproliferative effects of azasterols on *Leishmania* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 25: 130-135.
- DeSouza W, Lanfredi-Rangel A & Campanati L. **2004**. Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Leishmania* spp. *Microsc. Microanal.* 10: 513-27.
- Docampo R & Moreno SN. **1986**. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed. Proc.* 45: 2471-2476.
- Docampo R & Moreno SJN. **2001 a**. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Curr. Drug. Targ.,* 1:51-61.
- Docampo R & Moreno SJN. **2001 b**. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:151-159.
- Edinger AL & Thompson CB. **2004**. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 663-669.
- Edlind TD. **1989**. Tetracyclines as antiparasitic agents: lipophilic derivatives are highly active against *Leishmania* spp. *in vitro*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 33: 2144-2145.
- Edlind TD, Hang TL & Chakraborty PR. **1990**. Activity of the antihelminthic benzimidazoles against *Leishmania* spp. *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 162:1408-1411.
- Edwards DI. **1983**. Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother.* 31:9-20.
- Ellis JE, Cole D & Lloyd D. **1992**. Influence of oxygen on the fermentative metabolism of metronidazole-sensitive and resistant strains of *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 56: 78-88.
- Ellis JE, Setchell KD & Kaneshiro ES. **1994**. Detection of ubiquinone in parasitic and free-living protozoa, including species devoid of mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* 65: 213-224.
- Ellis JE, Wyder MA, Jarroll EL & Kaneshiro ES. **1996**. Changes in lipid composition during *in vitro* encystation and fatty acid desaturase activity of *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 81:13-25.

- Emkey RD & Ettinger M. **2006**. Improving compliance and persistence with bisphosphonate therapy for osteoporosis. *Am J Med.*; 119 (4 Supl. 1): 18-24.
- Farriol M, Segovia-Silvestre T, Venereo Y & Orta X. **2003**. Antioxidant effect of polyamines on erythrocyte cell membrane lipoperoxidation after free-radical damage. *Phytother. Res.* 17: 44-47.
- Farthing MJG, Keusch GT & Carey MC. **1985**. Effects of bile and bile salts on growth and membrane lipid uptake by : Possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *J Clin Invest.*; 76: 1727-1732.
- Farthing MJG & Inge PMG. **1986**. Antigiardial activity of the bile salt-like solution antibiotic sodium fusidate. *J. Antimicrob. Chemother.* 17: 165-171.
- Farthing MJG. **1992**. comes of age: progress in epidemiology, immunology and chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 30: 563-566.
- Farthing MJG, Pereira MEA & Keusch GT. **1986**. Description and characterization of a surface lectin from . *Infect Immun.* 51: 661-667.
- Feely DE & Dyer JK. **1987**. Localization of acid phosphatase activity in and trophozoites. *J. Protozool.* 34: 80-83.
- Feely DE, Schollmeyer JV & Erlandsen SL. **1982**. spp.: Distribution of contractile proteins in the attachment organelle. *Exp. Parasitol.* 53:145-154.
- Fiedler K & Simons K. **1995**. Annexin homologues in . *Trends Biochem Sci.* 20: 177-178.
- Figueiredo RC & Soares MJ. **2000**. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in epimastigotes. *Parasitol. Res.* 86: 413-418.
- Filice FP. **1952**. Studies on the cytology and life history of from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 57:53-143.
- Friend DS. **1966**. The fine structure of . *J. Cell Biol.*, 29:317-332.
- Fryberg M, Avruch L, Oehlschlager AC & Unrau AM. **1975**. Nuclear demethylation and c-24 alkylation during biosynthesis in . *Can. J. Biochem.*, 53: 881-889.
- Gardner TB & Hill D. **2001**. Treatment of giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 114-128.

- Garzoni LR, Caldera A, Meirelles MNL, Castro SL, DoCampo R, Meints G, Oldfield E & Urbina J. **2004**. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on . *Int. J. Antimic. Agents*, 23: 273-285.
- Gillet JM, Charlier J, Bone G & Mulamba PL. **1983**. : inhibition of the sporogonous cycle by alpha-difluoromethylornithine. *Exp. Parasitol.* 56: 190-193.
- Gillin FD, Reiner DS & McCann PP. **1984**. Inhibition of growth of by difluoromethylornithine, a specific inhibitor of polyamine biosynthesis. *J. Protozool.* 31:161-163.
- Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ, Douglas H, Das S, Wunderlich A & Sauch JF. **1987**. Encystation and expression of cyst antigens by in vitro. *Science* 235: 1040-1043.
- Gillin FD, Reiner DS & McCaffery M. **1991**. Organelles of protein transport in . *Parasitol. Today.* 7: 113-116.
- Gillin FD, Reiner DS & McCaffery JM. **1996**. Cell biology of the primitive eukaryote . *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 679-705.
- Granger BL, Warwood SJ, Benchimol M & De Souza W. **2000**. Transient invagination of flagella by . *Parasitol. Res.* 86: 699-709.
- Granthon-Azevedo AC. **2006**. Efeitos de inibidores da biossíntese do ergosterol sobre a proliferação e ultraestrutura de . Dissertação de Mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Ha HC, Sirisoma NS, Kuppusamy P, Zweier JL, Woster PM & Casero RA Jr. **1998**. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 11140-11145.
- Haas IG. **1994**. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia.* 50:1012-1020.
- Hampel KJ, Crosson P & Lee JS. **1991**. Polyamines favor triplex formation at natural pH. *Biochemistry.* 30: 4455-4459.
- Harada J & Sugimoto M. **1997**. Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 753: 251-259.
- Hare DF, Jarrol EL & Lindmark DG. **1989**. : characterization of proteinase activity in trophozoites. *Exp. Parasitol.* 68: 168-175.

- Harris JC, Plummer S, Turner MP & Lloyd D. **2000**. The microaerophilic flagellate *Trichomonas vaginalis* (garlic) is an effective anti-giardial. *Microbiology*. 146: 3119-3127.
- Harris JC, Plummer S & Lloyd D. Anti-giardial drugs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001. 57: 614-619.
- Hebi O, Roberts SC & Ullman B. **2003**. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 415-419.
- Hill DR. **1993**. Giardiasis: Issues in management and treatment. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 7: 503-525.
- Hiyoshi H, Yanagimachi M, Masashi ITO, Ohtsuka I, Yoshida I, Sacki T & Tanaka H. **2000**. Effect of ER-27856, a novel squalene synthase inhibitor, on plasma cholesterol in *Macaca mulatta* monkeys: comparison with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors. *J. Lip Res.*, 41: 1136-1144.
- Holberton DV. **1974**. Attachment of *Giardia lamblia*: a hydrodynamic model based on flagellar activity. *J. Exp. Biol.* 60: 207-222.
- Igarashi K & Kashiwagi K. **2000**. Polyamines: Mysterious modulators of cellular functions. Breakthroughs and views. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 271: 599-564.
- Jarroll EL, Müller PJ, Meyer EA & Morse EA. **1981**. Lipid and carbohydrate metabolism of *Giardia lamblia*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2: 187-196.
- Johns T, Faubert GM, Kokwaro JO, Mahunnah RLA & Kimanani EK. **1995**. Anti-giardial activity of gastrointestinal remedies of the Luo of East Africa. *J. Ethnopharmacol.* 46: 17-23.
- Kaminska B, Kaczmarek L & Grzelakowska-Sztabert B. **1990**. The regulation of G0-S transition in mouse T lymphocytes by polyamines. *Exp. Cell. Res.* 191: 239-245.
- Kandpal, M & Tekwani, BL. **1997**. Polyamine transport systems of *Trypanosoma brucei* promastigotes. *Life Sci.* 60: 1793-1801.
- Kaneda Y, Torii M, Tanaka T, Aikawa M. **1991**. In vitro effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Giardia lamblia*, and *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85: 417-425.
- Keegan F & Blum JJ. **1990**. Effects of oxygen concentrations on the intermediary metabolism of *Giardia lamblia* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 39: 235-245.

- Keister DB. **1983**. Axenic culture of *Leishmania* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 77: 487-488.
- Khan AU, Di Mascio P, Medeiros MH & Wilson T. **1992 a**. Spermine and spermidine protection of plasmid DNA against single-strand breaks induced by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 89: 11428-11430.
- Khan AU, Mei YH & Wilson T. **1992 b**. A proposed protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 11426-11427.
- Kim BG, Sobota A, Bitonti AJ, McCann PP & Byers TJ. **1987**. Polyamine metabolism in *Leishmania*: polyamine content and synthesis of ornithine, putrescine, and diaminopropane. *J. Protozool.* 34: 278-284.
- Kramer MH, Herwaldt BL, Craun GF, Calderon RL & Juranek DD. **1996**. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1993-1994. *CDC Surveillance Summaries*, April 12, 1996. *Morb Mortal. Weekly Rep.* 45(SS-1):1-30.
- Kulda J & Nohynkova E. **1978**. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In: Kreier JP (ed.), *Parasitic Protozoa*, vol. II, Academic Press, New York, pp. 1-138.
- Lanfredi-Rangel A. **1997**. Contribuição ao estudo da organização celular de trofozoítos de *Leishmania*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense.
- Lanfredi-Rangel A, Attias M, de Carvalho TM, Kattenbach WM & DeSouza W. **1998**. The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Leishmania* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. *J. Struct. Biol.* 123: 225-235.
- Lanfredi-Rangel A, Diniz J A Jr. & DeSouza W. **1999**. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Leishmania*. *Parasitol Res.*; 85: 951-955.
- Lanfredi-Rangel A, Kattenbach WM, Diniz JA Jr. & DeSouza W. **1999**. Trophozoites of *Leishmania* may have a Golgi-like structure. *FEMS Microbiol. Lett.* 181: 245-251.
- Lanfredi-Rangel A, Attias M, Reiner DS, Gillin FD & DeSouza W. **2003**. Fine structure of the biogenesis of *Leishmania* encystation secretory vesicles. *J. Struct. Biol.* 143: 153-163.
- Lazardi K, Urbina J & De Souza W. **1990**. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Leishmania*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2097-2105.

- Lazardi K, Urbina J & DeSouza. **1991**. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Leishmania*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 736-740.
- Lederer E. **1977**. Biological C-alkylation reactions. Salvatore, F., Borek, E., Zappia, V., Williams-Ashman, H. G. and Schlenk, F., (ed). *Biochemistry of S-adenosylmethionine*. Columbia University Press, New York, pp. 89-126.
- Liendo A, Visbal G, Piras R & Urbina JA. **1998**. Sterol composition and biosynthesis in amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 104:81-91.
- Lindmark DG. **1980**. Energy metabolism of the anaerobic protozoan *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1: 1-12.
- Lindmark DG. **1988**. Localization of hydrolases activities in lysosome-like organelles of trophozoites. *Exp. Parasitol.* 65: 141-147.
- Liu SM; Brown DM; O'Donoghue P; Upcroft P & Upcroft JA. **2000**. Ferredoxin involvement in metronidazole resistance of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:137-140.
- Lopes, CVS. **2004**. Efeitos dos análogos de poliaminas em *Leishmania*. Dissertação de mestrado. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade federal do Rio de Janeiro.
- Lorente SO, Jimenez CJ, Gros L, Yardley V, de Luca-Fradley K, Croft SL, A Urbina J, Ruiz-Perez LM, Pacanowska DG & Gilbert IH. **2005**. Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics. *Bioorg. Med. Chem.* 13: 5435-5453.
- Lorente SO, Rodrigues JC, Jimenez-Jimenez C, Joyce-Menekse M, Rodrigues C, Croft SL, Yardley V, de Luca-Fradley K, Ruiz-Perez LM, Urbina J, de Souza W, Gonzalez-Pacanowska D & Gilbert IH. **2004**. Novel azasterols as potential agents for treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2937-2950.
- Luján HD, Marotta A, Mowatt MR, Sciaky N, Lippincott-Schwartz J & Nash TE. **1995 a**. Developmental induction of Golgi structure and function in the primitive eukaryote *Leishmania*. *J Biol Chem.* 270: 4612-4618.
- Luján HD, Mowatt Mr, Chen GZ & Nash TE. **1995 b**. Isoprenylation of proteins in the protozoan *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72: 121-127.
- Luján HD, Mowatt MR, & Nash TE. **1996 a**. Lipid requirements and lipid uptake by trophozoites in culture. *J Euk. Microbiol.* 43: 237-242.

- Luján HD, Mowatt MR, Byrd LG & Nash TE. **1996 b**. Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite . Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 7628-7833.
- Luján HD, Mowatt MR & Nash TE. **1997**. Mechanisms of differentiation into cysts. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 294-304.
- Manning P, Erlandsen SL & Jarroll EL. **1992**. Carbohydrate and amino acid analyses of cysts. J. Protozool. 39: 290-296.
- Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, Rodrigues JC, Braga MV, Yardley V, DeLuca-Fradley K, Croft SL, DeSouza W, Ruiz-Perez LM, Urbina JA, Gonzalez-Pacanowska D & Gilbert IH. **2003**. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in species and . J. Med. Chem. 46: 4714-4727.
- Marti M & Hehl AB. **2003**. Encystation-specific vesicles in : a primordial Golgi or just another secretory compartment? Trends. Parasitol. 19: 440-446.
- Marti M, Regos A, Li Y, Schraner EM, Wild P, Müller N, Knopf LG, & Hehl AB. **2003a**. An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite . J Biol Chem. 278: 24837-24848.
- Marti M, Li Y, Schraner EM, Wild P, Kohler P & Hehl AB. **2003b**. The secretory apparatus of an ancient eukaryote: protein sorting to separate export pathways occurs before formation of transient Golgi-like compartments. Mol. Biol. Cell. 14: 1433-1447.
- Martin MB, Arnold W, Heath HT 3rd, Urbina JA & Oldfield E. **1999**. Nitrogen-containing bisphosphonates as carbocation transition state analogs for isoprenoid biosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 263: 754-758.

- McCammon M & Parks LW. **1981**. Inhibition of sterol transmethylation by S-adenosylhomocysteine analogs. *J. Bacteriol.*, 145:106-112.
- McTaggart F, Brown GR, Davidson RG, Freeman S, Holdgate GA, Mallion KB, Mirrlees DJ, Smith GJ & Ward WH. **1996**. Inhibition of squalene synthase of rat liver by novel 3' substituted quinuclidines. *Biochem. Pharmacol.* 51: 1477-1487.
- Menezes D, Valentim C, Oliveira MF & Vannier-Santos MA. **2005**. Putrescine analogue cytotoxicity against *Leishmania*. *Parasitol. Res.* 98: 99-105.
- Meyer, EA. **1994**. *Leishmania* as an organism. Thompson RCA, Reynoldson JA & Mendis AH (ed): *Leishmaniasis: from molecules to disease*. Cambridge, pp. 3-14.
- Mitchell MF, Tortolero-luna G, Lee JJ, Hittelman WN, Lotan R, Wharton JT, Hong WK & Nishioka K. **1998**. Phase I dose de-escalation trial of alpha-difluoromethylornithine in patients with grade 3 cervical intraepithelial neoplasia. *Clin. Cancer Res.* 4: 303-310.
- Moore JT & Gaylor JL. **1969**. Isolation and purification of an S-adenosyl-methionine: ²⁴-sterol methyltransferase from yeast. *J. Biol. Chem.*, 244: 6334-6340.
- Moore JT & Gaylor JL. **1970**. Investigation of an S-adenosyl-methionine: ²⁴-sterol methyltransferase in ergosterol biosynthesis in yeast: specificity of sterol substrates and inhibitors. *J. Biol. Chem.* 245: 4684-4688.
- Morgan DM. **1992**. Uptake of polyamines by human endothelial cells. Characterization and lack of effect of agonists of endothelial function. *Biochem. J.* 286 (Pt 2): 413-417.
- Müller, M. **1983**. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. *Surgery* 93:165-171.
- Müller S, Coombs GH & Walter RD. **2001**. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. *Trends Parasitol.*; 17: 242-249.
- Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N & Tanaka K. **2000**. Degradation of ornithine decarboxylase by 26S proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 167: 1-6.
- Muscari C, Guarnieri C, Stefanelli C, Giaccari A & Caldarera CM. **1995**. Protective effect of spermine on DNA exposed to oxidative stress. *Mol. Cell Biochem.* 144: 125-9.
- Nash TE. **1992**. Surface antigen variability and variation in *Leishmania*. *Parasitol. Today.* 8: 229-234.

- Nash, T & Rice WG. **1998**. Efficacies of zinc-finger-active drugs against .
Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1488-1492.
- Nash TE, Aggarwal A, Adam RD, Conrad JT & Merrit Jr JW. **1988**. Antigenic variation in
. J. Immunol. 141: 636-641.
- Nes WD, Janssen GG, Norton RA, Kalinowska M, Crumley FG, Tal B, Bergenstrahle A & Jonsson L.
1991. Regulation of sterol biosynthesis in sunflower by 24(R,S),25-epiminolanosterol, a novel
C-24 methyl transferase inhibitor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177: 566-574.
- Nes WD, Xu SH & Parish EJ. **1989**. Metabolism of 24(R,S),25-epiminolanosterol to 25-
aminolanosterol and lanosterol by . Arch. Biochem. Biophys. 272: 323-
331.
- Oehlschlager AC, Anugs RH, Pierce AM, Pierce HD & Srinivassan R. **1984**. Azasterol inhibition of
²⁴-sterol methyltransferase in . Biochemistry, 23: 3582-3589.
- Oehlschlager AC & Czyzewska E. **1992**. Rationally designed inhibitors of sterol biosynthesis. In
Sutcliffe J., Georgopapadakou NH (ed): Emerging targets in Antibacterial and antifungal
chemotherapy. New York, Chapman and Hall, pp. 410-436.
- Owen RL. **1980**. The ultrastructural basis of function. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:
429-433.
- Packham G & Cleveland JL. **1994**. Ornithine decarboxylase is a mediator of c-Myc-induced apoptosis.
Mol. Cell Biol. 14: 5741-5747.
- Paget A, Jarroll EL, Mannir P, Lindmark DG & Lloyd D. **1989**. Respiration in the cysts and
trophozoite of . J. Gen. Microbiol. 134: 145-154.
- Paget TA, Raynor MH, Shipp DW & Lloyd D. **1990**. produces alanine anaerobically
but not in the presence of oxygen. Mol. Biochem. Parasitol. 42: 63-67.
- Paget TA, Kelly ML, Jarroll EL, Lindmark DG & Lloyd D. **1993**. The effects of oxygen on
fermentation in . Mol. Biochem. Parasitol, 57:65-71.
- Palmié-Peixoto IV, Rocha MR, Urbina JA, DeSouza W, Einicker-Lamas M & Motta MC. **2006**.
Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS
Microbiol. Lett. 255: 33-42.
- Parish EJ & Nes WD. **1988**. Synthesis of new epiminoisopentenoids. Synthet. Commun. 18: 221-226.

- Peattie DA. **1990**. The giardins of : genes and proteins with promise. *Parasitol. Today*. 6: 52-56.
- Pegg AE. **1988**. Polyamine metabolism and its importance in neoplastic growth and a target for chemotherapy. *Cancer Res*. 48: 759-774.
- Pegg AE & McCann PP. **1982**. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol*. 243: C212-21.
- Pegg AE & McCann PP. **1992**. S-adenosylmethionine decarboxylase as an enzyme target for therapy. *Pharmacol. Ther*. 56: 359-377.
- Piva B & Benchimol M. **2004**. The median body of : an ultrastructural study. *Biol. Cell*. 96: 735-746.
- Ponce-Macotela M, Rufino-González Y, González-Maciél A, Reynoso-Robles R & Martínez-Gordillo MN. **2006**. Oregano () kills trophozoites : anti-giardiasis activity and ultrastructural damage. *Parasitol. Res*. 98: 557-560.
- Porter CW, Miller J & Bergeron RJ. **1984**. Aliphatic chain length specificity of the polyamine transport system in ascites L1210 leukemia cells. *Cancer Res*. 44: 126-128.
- Raipulis J, Toma MM & Semjonovs P. **2005**. The effect of probiotics on the genotoxicity of furazolidone. *Int J Food Microbiol*. 102: 343-347.
- Reis IA, Martinez MP, Yarlett N, Johnson PJ, Silva-Filho FC & Vannier-Santos MA. **1999**. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 43: 1919-1923.
- Ribeiro JM & Carson DA. **1993**. Ca²⁺/Mg⁽²⁺⁾-dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochemistry*. 32: 9129-9136.
- Rodrigues JC, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA & DeSouza W. **2002**. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of . *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46: 487-499.
- Rodrigues JC, Urbina J & DeSouza W. **2005**. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on . *Exp. Parasitol.*, 111: 230-238.

- Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS & DeCastro SL. **2004**. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 54: 704-710.
- Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA & de Castro SL. **2005**. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 780-784.
- Santoro, GF. **2002**. Papel funcional das poliaminas nas tricomoníases: um possível alvo para terapia antimicrobiana. Dissertação de Mestrado. Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz.
- Santos AB & DeSouza W. **1983**. Surface charge and ultrastructure of the cell surface of resident and thioglycolate-elicited mouse peritoneal macrophages. *J. Submicrosc. Cytol.*, 17: 406-412.
- Sheffield HG & Bjorvat B. **1977**. Ultrastructure of the cyst of *Leishmania* spp. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 23-30.
- Schipper RG, Penning LC & Verhofstad AA. **2000**. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? *Semin. Cancer Biol.* 10: 55-68.
- Schuber F. **1989**. Influence of polyamines on membrane functions. *Biochem. J.*; 260: 1-10.
- Schupp DG, & Erlandsen SL. **1987**. A new method to determine *Leishmania* cyst viability: correlation of fluorescein diacetate and propidium iodide staining with animal infectivity. *Appl Environ. Microbiol.* 53: 704-707.
- Seiler N, Delcros JG & Moulinoux JP. **1996**. Polyamine transport in mammalian cells. An update. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 843-861.
- Slavin I, Saura A, Carranza PG, Touz MC, Nores MJ & Luján HD. **2002**. Dephosphorylation of cyst wall proteins by a secreted lysosomal acid phosphatase is essential for excystation of *Leishmania* spp. *Mol. Biochem. Parasitol.* 122: 95-98.
- Smith NC, Bryant C & Boreham PFL. **1988**. Possible roles for pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thiol-dependent peroxidase and reductase activities in resistance to nitroheterocyclic drugs in *Leishmania* spp. *Int J Parasitol* 18:679-683.
- Soares MJ & DeSouza W. **1991**. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Leishmania* spp. *Parasitol. Res.* 77: 461-468.

- Sogayar, MITL. **1995**. . Neves, DP, Melo, AL, Genaro, O, Linardi, PM (ed): *Parasitologia Humana*. Ed. Atheneu, pp. 124-132.
- Solari AJ, Rahn MI, Saura A & Luján HD. **2003**. A unique mechanism of nuclear division in involves components of the ventral disk and the nuclear envelope. *Biocell*. 27: 329-346.
- Stevens TL, Gibson GL, Adam R, Maier J, Allison-Ennis M & Das S. **1997**. Uptake and cellular localization of exogenous lipids by , a primitive eukaryote. *Exp. Parasitol.* 86: 133-143.
- Stryer L. **1996**. *Biochemistry*. Third edition. Freeman ed.
- Sud I & Feingold DS. **1985**. Effect of ketoconazole in combination with other inhibitors of sterol synthesis on fungal growth. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28: 532-534.
- Szajman SJ, Bailey BN, Docampo R & Rodriguez JB. **2001**. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent growth inhibitors of Try . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 789-792.
- Szajman SJ, Montalvetti A, Wang Y, DoCampo R & Rodriguez J. **2003**. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of farnesil pyrophosphste syntase. *Bioorg Med. Chem. Lett.* 13: 3231-3235.
- Tabor CW & Tabor H. **1984**. Polyamines. *Annu Rev Biochem.* 53: 749-90.
- Tadolini B. **1988**. Polyamine inhibition of lipoperoxidation. The influence of polyamines on iron oxidation in the presence of compounds mimicking phospholipid polar heads. *Biochem. J.* 249: 33-36.
- Takeshige Baba M, Tsuboi S, Noda T & Ohsumi Y. **1992**. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119: 301-311.
- Takeuchi T, Kobayashi S, Tanabe M & T Fujiwara. **1985**. In vitro inhibition of and growth by bithionol, diclorophene, and hexachlorophene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 65-70.
- Thomas T, & Thomas TJ. **2001**. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Mol. Life. Sci.* 58: 244-258.
- Thompson RCA, Reynoldson JA & Mendis AH. **1993**. and giardiasis. *Adv Parasitol.* 32:71-160.

- Tkachenko AG & Nesterova LY. **2003**. Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Leishmania*. *Biochemistry*. 68: 850-856.
- Touz MC, Nores MJ, Slavin I, Carmona C, Conrad JT, Mowatt MR, Nash TE, Coronel CE & Lujan HD. **2002**. The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 277: 8474-8481.
- Tovar J, Fischer A & Clark CG. **1999**. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* 32:1013-1021.
- Tovar J, León-Avila G, Sánchez LB, Sutak R, Tachezy J, Giezen M, Hernández M, Müller M & Lucocq JM. **2003**. Mitochondrial remnant organelles of *Leishmania* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426: 712-716.
- Tracy JW & Webster LT. **1996**. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections, JG Hardman and LOE Limbird (ed.) *The pharmacological basis of therapeutics*, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, NY. p. 987-1008.
- Upcroft JA, Campbell RW & Upcroft P. **1996**. Quinacrine-resistant *Leishmania*. *Parasitol. Today* 9: 187-190.
- Upcroft JA, Upcroft P & PFL Boreham. **1990**. Drug resistance in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 20: 489-496.
- Upcroft JA & Upcroft P. **1993**. Drug resistance and *Leishmania*. *Parasitol. Today*. 9: 187-190.
- Upcroft JA & Upcroft P. **1998**. My favorite cell: *Leishmania*. *Bioessays* 20: 256-263.
- Urbina JA. **1997**. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology*. 7; 114 (Suppl:S): 91-99.
- Urbina J, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T & Hiyoshi H. **2004**. *Leishmania* and activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Leishmania*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 2379-2387.
- Urbina JA, Concepcion JL, Ragel S, Visbal G & Lira R. **2002**. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Leishmania* and *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 125: 35-45.
- Urbina JA, Lazardi K, Marchan E, Visbal G, Agurre T, Piras M, Piras R, Maldonado RA, Payares G & De Souza W. **1993**. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of *Leishmania*.

- ketoconazol and terbinafine against : and studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 580-591.
- Urbina JA, Moreno B, Vierkotter S, Oldfield E, Payares G & Sanoja C. **1999**. contains major pyrophosphate stores, and its growth and is blocked by pyrophosphate analogues. *J. Biol. Chem.* 274: 33609-33615.
- Urbina JA, Visbal G, Contreras LM, McLaughlin G & Docampo R. **1997**. Inhibitors of delta24(25) sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in . *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 1428-1432.
- Urbina JA, Vivas J, Lazardi K, Molina J, Payares G, Piras MM & Piras R. **1996**. Antiproliferative effects of ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase inhibitor on : in vitro and in vivo studies. *Chemotherapy (Tokyo)* 42: 294-307.
- Urbina JA, Vivas J, Visbal G & Contreras LM. **1995**. Modification of the sterol composition of epimastigotes by ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 73: 199-210.
- van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Lowik C & Papapoulos S. **1999**. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 108-111.
- Vannier-Santos MA, Urbina J, Martiny A, Neves A & De Souza W. **1995**. Alteration induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in . *J. Euk. Microbiol.* 42: 337-346.
- Venkatesan P. **1998**. Albendazole. *J. Antimicrob. Chemother.* 41: 145-147.
- Vivas J, Urbina J & DeSouza W. **1996**. Ultrastructural alterations in () induced by ²⁴⁽²⁵⁾-sterol methyltransferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 7: 235-240.
- Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. **2003**. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 376: 1-14.
- Wallace HM & Caslake R. **2001**. Polyamines and colon cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13: 1033-1039.
- Weeks RS, Vanderwerf SM, Carlson CL, Burns MR, O'Day CL, Cai F, Devens BH & Webb HK. **2000**. Novel lysine-spermine conjugate inhibits polyamine transport and inhibits cell growth when given with DFMO. *Exp. Cell Res.* 261: 293-302.

- Werries E, Franz A, Hippe H & Acil Y. **1991**. Purification and substrate specificity of two cysteine proteinases of *Leishmania*. *J Protozool.* 38: 378-383.
- Whaun JM & Brown ND. **1985**. Ornithine decarboxylase inhibition and the malaria-infected red cell: a model for polyamine metabolism and growth. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 233: 507-511.
- Williams K. **1997**. Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* 325(Pt 2): 289-297.
- Wright PS, Byers TL, Cross-Doersen DE, McCann PP & Bitonti AJ. **1991**. Irreversible inhibition of S-adenosylmethionine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes: growth inhibition by polyamine analogues. *Biochem. Pharmacol.* 41: 1713-1718.
- Yarlett, N & Bacchi, CJ. **1994**. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. *Biochem. Soc. Trans.* 22: 875-879.
- Yarlett N, Goldberg B, Moharrami MA & Bacchi CJ. **1993**. Ornithine decarboxylase in *Plasmodium falciparum*: characterization of ornithine decarboxylase. *Biochem. J.* 293 (Pt 2): 487-493.
- Yarlett N. **1988**. Polyamine biosynthesis and inhibition in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Today.* 4: 357-360.
- Yeagle PL, Martin RB, Lola HK, Lin HK & Bloch K. **1977**. Differential effects of cholesterol and lanosterol on artificial membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 4924-4926.
- Youssef MYM, Essa MM, Sadaka HAH, Eissa MM & Rizk AM. **1996**. Effect of ivermectin on combined intestinal protozoal infection (giardiasis and cryptosporidiosis). *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 26: 543-553.
- Zhu C, Lang DW & Coffino P. **1999**. Antizyme2 is a negative regulator of ornithine decarboxylase and polyamine transport. *J. Biol. Chem.* 274: 26425-26430.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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