

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

PROGRAMA DE BIOLOGIA CELULAR E PARASITOLOGIA

PAULO ROBERTO GONÇALVES DE FREITAS JUNIOR

EFEITOS DA MILTEFOSINA NA PROLIFERAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
BIOSSÍNTESE FOSFOLIPÍDICA DE *Crithidia deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO
QUE CONTÉM ENDOSIMBIONTE

RIO DE JANEIRO

MAIO / 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PAULO ROBERTO GONÇALVES DE FREITAS JUNIOR

EFEITOS DA MILTEFOSINA NA PROLIFERAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
BIOSSÍNTESE FOSFOLIPÍDICA DE *Crithidia deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO
QUE CONTÉM ENDOSIMBIONTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE
BIOLOGIA CELULAR E
PARASITOLOGIA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA), INSTITUTO
DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS
FILHO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Orientadora: Professora Dr^a Maria Cristina Machado Motta.

Rio de Janeiro

PAULO ROBERTO GONÇALVES DE FREITAS JUNIOR

EFEITOS DA MILTEFOSINA NA PROLIFERAÇÃO, ULTRAESTRUTURA E
BIOSSÍNTESE FOSFOLIPÍDICA DE *Crithidia deanei*, UM TRIPANOSOMATÍDEO
QUE CONTÉM ENDOSIMBIONTE

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA AO PROGRAMA DE
BIOLOGIA CELULAR E
PARASITOLOGIA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA), INSTITUTO
DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS
FILHO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO DE JANEIRO, COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

APROVADA EM: ____ DE _____ DE ____.

PROF^a DR^a MARIA CRISTINA MACHADO MOTTA, IBCCF

PROF DR EDNILDO DE ALCÂNTARA MACHADO, IBCCF

PROF^a DR^a GEÓRGIA CORREA ATELLA, IBCCF

PROF^a DR^a JENNIFER LOWE, IBCCF

PROF DR PAULO MARCIO FARIA E SILVA, UNIFAL

PROF^a DR^a MARTA HELENA BRANQUINHA DE SÁ, INSTITUTO DE
MICROBIOLOGIA

FREITAS-JUNIOR, PAULO ROBERTO GONÇALVES

Efeitos da miltefosina na proliferação, ultraestrutura e biossíntese fosfolipídica de *Crithidia deanei*, um tripanosomatídeo que contém endosimbionte, UFRJ, IBCCF, 2009. xiii. 89p.

Dissertação de Mestrado

1. *Crithidia deanei*

2. Miltefosina

5. Ultraestrutura

2. Endosimbionte

4. Proliferação celular

6. Composição fosfolipídica

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ

II. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar aqui.

Aos meus pais, Paulo Roberto Gonçalves de Freitas e Catia Sueli Fernandes de Freitas e minhas irmãs Carla Sueli Fernandes de Freitas e Tuka, por todo auxílio, compreensão, paciência, amizade e amor.

À minha orientadora, Dr^a Maria Cristina Machado Motta pela confiança, atenção, paciência, motivação e dedicação. Obrigado, Cristina, por me ensinar e ensinar aos seus alunos a fazer ciência.

A Iamara, pelo suporte nos fracionamentos e em vários outros momentos e Allan que foram sempre dispostos a ajudar e são como irmãos para mim.

A Carol pela companhia, ajuda nos experimentos e toda atenção.

Ao Rogério pelo auxílio e apoio em todos os momentos.

A Roberta pelos momentos de diversão, descontração e pelo carinho.

Ao Thiago Manchester pela companhia e disposição em ajudar, Danielle Cavalcanti, por toda ajuda e conselhos e Felipe e a Aline pela atenção, o carinho e a torcida.

Ao Bosco e a Neth que estiveram comigo todos os dias e pelos cafés da manhã juntos e a companhia.

Ao professor Dr. Marcelo Einicker Lamas, por sua colaboração neste projeto. Agradeço por todo incentivo e auxílio.

Ao professor Dr. Ronaldo Mohana Borges, por seu espírito prestativo e toda ajuda no desenvolver do pensamento da parte bioquímica desta dissertação.

A Ana Carolina, Ana Julia e Pedro Celso Braga Alexandre, pelo companheirismo e pelos momentos felizes em sua companhia.

A Maiza, por seu carinho e pela saudade.

Aos meus familiares pelo apoio de sempre.

Às professoras Narcisa, Márcia, Rossiane e Tecia. Agradeço pela amizade, atenção, apoio, conselhos, disposição em ajudar, por me auxiliar em minha formação.

A todos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer. Agradeço por todo altruísmo, pelos momentos alegres e pelo ambiente acolhedor que proporcionam aos recém chegados.

A Karine, Paulo André, Fernanda, Flávia, Andréia, Luzia, Gustavo, Vanessa, Jenifer e todos do Laboratório de Físico-Química Biológica.

ÍNDICE

Índice de Figuras e Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	x
Resumo	xi
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.2 Classificação Taxonômica e Caracterização Ultraestrutural	1
1.3 Endossimbiose em Tripanosomatídeos	6
1.4 O Papel dos Fosfolípidios na Atividade Celular	9
1.5 Síntese de Fosfatidilcolina.....	14
1.6 Ação dos Análogos de Fosfolípidios e do 22,26-azasterol na Síntese de Fosfatidilcolina em Tripanosomatídeos.....	17
2. Objetivos	28
3. Material e Métodos	29
3.1 Cultivo de Células	29
3.2 Curva de Proliferação Celular	29
3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	30
3.4 Incorporação de Traçadores Radioativos em <i>Crithidia deanei</i>	31
3.5 Fracionamento Celular de <i>Crithidia deanei</i> Crescidas em Meio Contendo Traçadores Radioativos	32
3.6 Extrações de Lipídios	34
3.7 Cromatografia em Camada Fina.....	35
4. Resultados	38
4.1 Efeitos da Miltefosina na Proliferação Celular das Cepas Normal e Curada de <i>Crithidia deanei</i>	38
4.2 Efeitos da Miltefosina na Ultraestrutura Celular de <i>Crithidia deanei</i>	43
4.3 Efeitos da Miltefosina na Composição Fosfolipídica de <i>Crithidia deanei</i> e nas Frações de Simbionte e Mitocôndria	49
5. Discussão	55
5. Conclusões	63
5. Bibliografia	64

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – <i>Crithidia denaei</i> . Desenho esquemático do tripanosomatídeo.....	2
Figura 2 – Vias metabólicas de colina.....	11
Figura 3 – Sítios de clivagem de fosfolipídios por fosfolipases.....	13
Figura 4 – Vias de síntese de fosfatidilcolina.....	15
Figura 5 – Via de síntese de fosfatidilcolina em procariotos intimamente associados a eucariotos.....	16
Figura 6 – Vias de síntese de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina em animais	17
Figura 7 – Estrutura química dos alquilphospholipídios sintéticos em comparação com a lisofosfatidilcolina natural	20
Figura 8 – Ligação e uptake de miltefosina em <i>Leishmania</i>	21
Figura 9 – Alvos dos alquilisofosfolipídios (APL) no metabolismo e vias de sinalização	25
Figura 10 – Estrutura do azasterol.....	26
Figura 11 – Efeito da miltefosina na proliferação da cepa normal de <i>Crithidia deanei</i>	40
-Tabela 1 – Ação da miltefosina na proliferação da cepa normal de <i>Crithidia deanei</i>	40
Figura 12 – Efeito da miltefosina na proliferação da cepa curada de <i>Crithidia deanei</i>	42
-Tabela 2 – Ação da miltefosina na proliferação da cepa curada de <i>Crithidia deanei</i>	42
Figura 13 – Porcentagem de inibição da proliferação de <i>C.deanei</i> normal e curada.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 14 – Ultraestrutura de <i>Crithidia deanei</i> normal.....	45
Figura 15 – Efeitos ultraestruturais de <i>Crithidia deanei</i> tratada com 25µM e 75µM de miltefosina.....	46
Figura 16 – Efeitos ultraestruturais de <i>Crithidia deanei</i> tratada com 100µM de miltefosina.....	47
Figura 17 – Efeitos ultraestruturais da miltefosina nos endosimbiontes.....	48
Figura 18 – Efeitos da miltefosina na síntese fosfolipídica de <i>Crithidia deanei</i> após 24h de tratamento.....	51
Figura 19 – Efeitos da miltefosina na síntese fosfolipídica de <i>Crithidia deanei</i> após 36h de tratamento.....	52
Figura 20 – Efeitos da miltefosina na síntese fosfolipídica de <i>Crithidia deanei</i> após 48h de tratamento.....	53
Figura 21 – Efeitos da miltefosina na síntese fosfolipídica das frações purificadas de endosimbiontes e de mitocôndria de <i>Crithidia deanei</i> isoladas de cepas tratadas por 24h.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

CTP = Citidina trifosfato

CL = Cardioplipina

CLS = Cardioplipina sintase

CMP = Citidina monofosfato

CPT = CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina fosfotransferase

CTP = CCT = fosfocolina citidililtransferase

DAG = Diacilglicerol

LPAs = Análogos de lisofosfolipídios; Alquil lisofosfolipídios

MET = Microscopia eletrônica de transmissão

PC = Fosfatidilcolina

Pcs = Fosfatidilcolina sintase

PE = Fosfatidiletanolamina

PG = Fosfatidilglicerol

PI = Fosfatidilinositol

PLA = Fosfolipase A

PLC = Fosfolipase C

PLD = Fosfolipase D

PAP = Fosfatidato fosforilase

SAM = S-adenosilmetionina

Resumo

Alguns protozoários da família Trypanosomatidae, como *Crithidia deanei*, apresentam uma bactéria intracelular obrigatória, a qual mantém uma relação mutualística com seu hospedeiro. O envoltório do endosimbionte não apresenta esteróis e a composição fosfolipídica é caracterizada por uma quantidade majoritária de cardiolipina (CL), seguida de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE). PC é o fosfolípido majoritário em eucariotos, sendo um componente essencial de membranas celulares. Contudo, em procariotos, PC está presente somente em espécies intimamente associadas com eucariotos, tanto em interações simbióticas quanto patogênicas. Neste estudo testamos os efeitos da miltefosina na proliferação de *C. deanei*, assim como em sua ultraestrutura e composição fosfolipídica, considerando que esta droga inibe a fosfolipina citidililtransferase (CTP), uma enzima chave na biossíntese de PC. Os resultados mostram um baixo efeito da miltefosina na proliferação celular, tanto na cepa normal quanto na cepa curada, quando comparada a outras drogas que perturbam vias de síntese de PC. Protozoários tratados com miltefosina apresentaram alterações ultraestruturais como shedding e blebbing da membrana plasmática, inchaço mitocondrial e convoluções do envoltório do endosimbionte. O uso do ^{32}P como traçador revelou que a síntese fosfolipídica dos protozoários tratados com 10 μM de miltefosina por 24 h foi alterada: houve queda na produção de PC, PE e CL, mas não de PI. De alguma maneira, o aumento na síntese de PI pode estar contribuindo para a manutenção de níveis satisfatórios de fosfolípidos durante o tratamento com a miltefosina. Mitocôndrias obtidas de protozoários tratados com 10 μM de miltefosina por 24 h apresentaram queda na produção de PC, PI e CL com manutenção dos níveis de PE. Simbiontes isolados de protozoários submetidos a esta mesma concentração de droga e neste mesmo tempo de tratamento, mostraram diminuição na formação de PC, PE e PI,

sem alteração na síntese de CL. Esses resultados reforçam a idéia de trocas metabólicas entre o tripanosomatídeo hospedeiro e suas estruturas de origem simbiótica.

Abstract

Some protozoa of the Trypanosomatidae family, as *Crithidia deanei*, present an obligatory intracellular bacterium, which maintains a mutualistic relationship with the host. The endosymbiont envelope lacks sterols and the phospholipid composition is characterized by a major quantity of cardiolipin (CL), followed by phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE). PC is the major phospholipid in eukaryotes, being an essential component of cell membranes for playing structural and physiological roles. However, in prokaryotes PC is present only in species closely associated with eukaryotes, either in symbiotic or pathogenic interactions. In this study, we tested the effects of miltefosine in *Crithidia deanei* proliferation, as well as, on the ultrastructure and phospholipid composition considering that this drug inhibits the phosphocholine-cytidyltransferase (CTP), a key enzyme in the PC biosynthesis. Results showed that miltefosine promoted a low effect on cellular proliferation, both in normal and aposymbiotic strains, when compared to other drugs that also disturb pathways of PC synthesis. Miltefosine treated protozoa presented ultrastructural alterations as plasma membrane shedding and blebbing, mitochondrial swelling and convolutions of the endosymbiont envelope. The use of ^{32}P as tracer revealed that the phospholipid synthesis of the protozoan treated with 10 μM of miltefosine was altered: we observed decreased on PC, PE and CL synthesis, while PI production was unaltered. Somehow, the increase of PI synthesis contribute to the maintenance of satisfactory levels of phospholipids during the miltefosine treatment. Mitochondria obtained from protozoa treated with 10 μM of miltefosine for 24 h presented a decrease in PC, PI and CL production, with maintenance of PE levels. Symbionts isolated from protozoa submitted to the same drug concentration and time of treatment, showed a diminished synthesis of PC, PE and PI, without alterations in CL synthesis. These results reinforce the idea that

an metabolic exchange occurs between the host trypanosomatid and structures of symbiotic origin.

1. Introdução

1.1 Classificação Taxonômica e Caracterização Ultraestrutural

Os tripanosomatídeos são protozoários que possuem representantes heteroxênicos e monoxênicos, os quais apresentam patógenos de invertebrados, vertebrados e de plantas (SIMPSON *et al.*, 2006, WALLACE, 1966; MOMEN, 2001). Os protozoários heteroxênicos necessitam de dois tipos distintos de hospedeiros, um invertebrado e outro vertebrado, para completar seu ciclo de vida. Já os protozoários monoxênicos são aqueles que necessitam de apenas um hospedeiro invertebrado, em geral um inseto, para completar seu ciclo de vida. Os tripanosomatídeos são classificados sistematicamente da seguinte forma (STORER AND USINGER, 1971; VICKERMAN AND PRESTON, 1976):

Reino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Super-Classe: Mastigophora

Classe: Zoomastigophorea

Ordem: Kinetoplastida

Sub-Ordem: Trypanosomatina

Família: Trypanosomatidae

Entre os representantes da família Trypanosomatidae mais estudados estão as espécies patogênicas do gênero *Trypanosoma*, como o *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de chagas, o *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono e as do gênero *Leishmania*, causadoras das leishmanioses (revisto por DE SOUZA, 1999). Entretanto,

a maioria dos gêneros abrigam espécies monoxênicas e não patogênicas a vertebrados como *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Proleptomonas*, e *Rhynchoidomona* (VICKERMAN AND PRESTON, 1976).

Entre as características morfológicas típicas destes protozoários podemos mencionar: a presença de um único flagelo, que se origina no corpo basal; o citoesqueleto composto de microtúbulos subpeliculares; o cinetoplasto, que corresponde à região mitocondrial que acumula DNA e o glicosomo, tipo especial de peroxisomo que possui diversas enzimas da via glicolítica (Figura 1) (revisto por DE SOUZA, 2002).

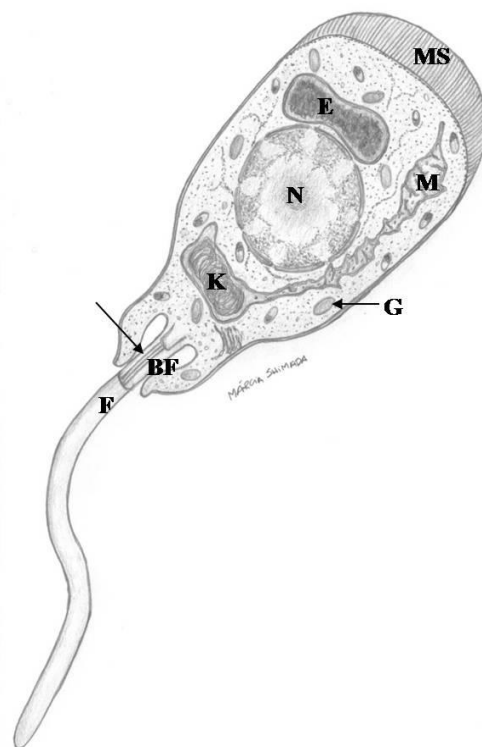


Figura 1: *Crithidia deanei*. Desenho esquemático do tripanosomatídeo *C. deanei*, por Márcia Shimada. Notar a presença do endosimbionte (E) próximo ao núcleo (N), na região posterior do protozoário. BF = Bolsa flagelar; F = flagelo; G = glicosomo; K = cinetoplasto e M = mitocôndria; MS = microtúbulos sub-peliculares.

Nesta família, o flagelo contém um axonema formado por microtúbulos, que são dispostos em nove pares periféricos e um central. Além disso, há uma estrutura peculiar da família denominada paraflagelar. Esta se encontra associada a alguns pares de microtúbulos do axonema, através de filamentos simples ou em forma de “Y” (FARINA *et al*, 1986). Estudos sugerem que esta estrutura estaria relacionada à motilidade dos protozoários e também à adesão ao intestino de insetos (BASTIN *ET AL.*, 1996-a, BASTIN AND GULL, 1996-b).

Os microtúbulos subpeliculares formam um citoesqueleto disposto logo abaixo da membrana plasmática. Há conexões entre os microtúbulos e entre estes e a membrana plasmática, através de proteínas associadas à microtúbulos (MACCIONI AND CAMBIAZO, 1995). Por microscopia eletrônica, observam-se os microtúbulos em todo corpo celular, exceto na região de ligação do flagelo ao corpo celular e na região da bolsa flagelar (GULL, 1999).

Outra característica que deve ser destacada nestes protozoários é a presença de uma mitocôndria única e ramificada, que se estende ao longo do corpo celular. Neste caso, a mitocôndria possui uma porção alargada que abriga o DNA mitocondrial (kDNA) e é denominada cinetoplasto. Esta estrutura é característica da ordem Kinetoplastida. Ela está conectada ao corpúsculo basal e o arranjo do k-DNA varia de acordo com o estágio evolutivo dos tripanosomatídeos, podendo apresentar forma de barra (mais comum) ou arredondada, característica de tripomastigotas de *T. cruzi* (revisto por DE SOUZA, 2002). A estrutura do k-DNA se apresenta de forma complexa e única na natureza, pois é formada por círculos catenados, os maxicírculos e minicírculos, sendo os últimos bem mais numerosos. Os maxicírculos contêm informações que resultam na formação de rRNA e de algumas proteínas envolvidas no sistema respiratório mitocondrial. Os minicírculos contêm informações para a

codificação de RNAs guias, que participam na editoração do mRNA mitocondrial produzido a partir dos maxicírculos (LIU *et al.*, 2005).

É interessante mencionar que as mitocôndrias são organelas encontradas na maioria das células eucariotas e que se originaram por endossimbiose de uma α -proteobactéria (GABALDÓN AND HUYNEN, 2007). Segundo análises dos genes mitocondriais, esta organela derivou de uma única bactéria ancestral, o que caracteriza um evento monofilético (GRAY *et al.*, 1999). Ao longo do processo evolutivo, a bactéria simbiótica perdeu a maioria de seu DNA, sendo a outra parte transferida para o núcleo da célula. Deste modo, ocorreram várias modificações no proteoma e no metabolismo das proto-mitocôndrias até que houvesse a formação da organela (KURLAND *et al.*, 2000; GRAY *et al.*, 2001). Contudo, segundo Gabaldón e Hunyen (2007), parte das vias de síntese protéica e àquelas que envolvem a conversão de energia, foram preferencialmente retidas nas mitocôndrias, enquanto as vias que envolvem a replicação, transcrição, divisão celular, transporte, regulação e transdução de sinais deram lugar à proteínas do eucarioto hospedeiro.

Outras estruturas especializadas dos tripanosomatídeos são os glicosomos, que foram inicialmente descritos no *Trypanosoma brucei*. Esta organela possui membrana única e matriz eletrondensa (OPPERDOES AND BORST, 1977). Estas organelas pertencem à família dos peroxisomos, não apresentam DNA e a catalase pode ser encontrada nos glicosomos de algumas espécies, como *Crithidia luciliae* (MICHELS *et al.*, 2006; HANNAERT AND MICHELS, 1994). Nos glicosomos são encontradas enzimas da via glicolítica envolvidas na conversão de glicose e glicerol em 3-fosfoglicerato, que é metabolizado no citosol, gerando ATP (MISSET *et al.*, 1986, PARSON *et al.*, 2001). Enzimas associadas à biossíntese de pirimidinas, fixação de dióxido de carbono e β -oxidação de ácidos graxos, também foram encontradas nesta

organela (OPPERDOES, 1987, MICHELS AND OPFERDOES, 1991). Dependendo do tripanosomatídeo, o seu ciclo de vida pode ser muito complexo e envolver adaptações morfológicas e metabólicas em resposta aos diversos ambientes em que se encontram. A compartimentalização da via glicolítica nos glicosomos representa uma adaptação metabólica, que otimiza a produção de ATP (MICHELS *et al.*, 2006). As formas sanguíneas de *T. brucei*, por exemplo, vivem às expensas do metabolismo glicosomal, sendo muito baixa a atividade de fosforilação oxidativa mitocondrial (BAKKER *et al.*, 1999). Deste modo, o metabolismo energético de tripanosomatídeos envolve duas organelas: a mitocôndria e o glicosomo.

Os acidocalcisomos são organelas presentes em diferentes tripanosomatídeos, apresentando-se como estruturas eletrondensas ao microscópio eletrônico de transmissão (VERCESI *et al.*, 1994; SCOTT *et al.*, 1997). Estas organelas estão envolvidas em funções biológicas, como o armazenamento de cálcio, a manutenção do pH intracelular e a osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 1995). A composição dos acidocalcisomos ainda é objeto de estudo, entretanto podem ser encontrados elementos como cálcio, fósforo, magnésio, sódio, zinco, além de pirofosfato e polifosfatos. Estes dois últimos elementos são utilizados como fonte energética alternativa à produção de ATP (DOCAMPO AND MORENO, 2001). A presença de próton ATPases vacuolares e pirofosfatases, que bombeiam H^+ para a matriz dos acidocalcisomos, garantem o caráter ácido destas organelas. Além disso, a concentração de H^+ pode aumentar nos acidocalcisomos pela ação de enzimas que fazem antiporte Ca^{2+}/H^+ , havendo entrada de H^+ com a concomitante saída de Ca^{2+} para o citoplasma (DOCAMPO *et al.*, 1995).

1.2 Endosimbiose em Tripanosomatídeos

Alguns protozoários da família Trypanosomatidae abrigam em seu citoplasma uma bactéria simbiótica, tais como *Crithidia deanei*, *Crithidia oncopelti*, *Crithidia desouzai*, *Blastocrithidia culicis* e *Herpetomonas roitmani* (revisito por DE SOUZA AND MOTTA, 1999). Estes microorganismos foram denominados inicialmente de diplosomos em *Blastocrithidia culicis* (NOVEY *et al.*, 1907) e corpos bipolares em *Crithidia oncopelti* (NEWTON AND HORNE, 1957) e *Crithidia deanei* (MUNDIM *et al.*, 1974). Estudos posteriores de bioquímica e ultraestrutura celular revelaram que os diplosomos e os corpos bipolares eram semelhantes, passando a serem denominados endosimbiontes (CHANG, 1975). Experimentos de Biologia Molecular revelaram que os endosimbiontes presentes nas diferentes espécies são semelhantes entre si e similares a bactérias do gênero *Bordetella* (DU *et al.*, 1994a e DU *et al.*, 1994b).

Hoje, se sabe que a maior similaridade molecular do endosimbionte é com a bactéria *Bordetella parapertusis* e que esta bactéria apresenta grande redução genômica em relação ao ancestral (PROBST *et al.*, 2006). Há uma perfeita sincronia de divisão entre o endosimbionte e o protozoário hospedeiro, de modo que ao final da citocinese, cada célula filha contém uma única bactéria simbiótica (MOTTA *et al.* 2006, BRUM DA SILVEIRA *et al.* 2008). Outro aspecto importante é a influência do endosimbionte na ultraestrutura do hospedeiro tripanosomatídeo, tais como: estrutura paraflagelar bastante reduzida (GADELHA *et al.*, 2005), citoesqueleto de microtúbulos ausente nos pontos em que os ramos mitocondriais tocam a membrana plasmática (FREYMÜLLER AND CAMARGO, 1981) e cinetoplasto apresentando arranjo da rede de kDNA mais largo e frouxo (FREYMÜLLER E CAMARGO, 1981; CAVALCANTI *et al.* 2008). É importante destacar, que esses efeitos ultraestruturais no hospedeiro não são reversíveis nas cepas curadas ou aposimbióticas (FREYMÜLLER AND CAMARGO, 1981).

A importância do endosimbionte para o metabolismo do protozoário hospedeiro tornou-se evidente, quando foram comparadas as exigências nutricionais entre as cepas normal e curada. Cabe esclarecer, que cepas curadas ou aposimbióticas podem ser obtidas após tratamento dos tripanosomatídeos com antibióticos dirigidos contra a síntese protéica procariota, como o cloranfenicol (CHANG, 1974). Cepas contendo o endosimbionte apresentam baixas exigências nutricionais, pois a bactéria simbiótica está envolvida na produção de elementos essenciais como hemina, purina, aminoácidos e vitaminas (CHANG AND TRAGER, 1974; CHANG, 1975; MUNDIM AND ROITMAN, 1977, SALZMAN *et al.*, 1985). Segundo Mundim e colaboradores (1975), *Crithidia deanei* requer apenas 2 aminoácidos, (metionina e a tirosina) e 4 vitaminas (ácido fólico, tiamina, biotina e nicotinamida), não exigindo hemina, nem purina para sua proliferação celular. Por outro lado, o simbiote deste protozoário parece beneficiar-se da produção de ATP que ocorre a partir do glicosomo do hospedeiro (MOTTA *et al.* 1997a). Juntos, estes dados indicam que uma intensa troca metabólica ocorre entre os dois seres simbioticamente associados.

A ultraestrutura do endosimbionte por microscopia eletrônica de transmissão revela que estes são delimitados por duas unidades de membrana, entretanto uma parede celular típica de Gram-negativos está ausente. O uso de antibióticos β -lactâmicos, mostrou que apesar de reduzida, a parede apresenta importante papel na forma e na divisão dos simbiossomas de tripanosomatídeos (MOTTA *et al.* 1997b). A largura dessas bactérias simbióticas está entre 0,3 e 1,0 μm e seu comprimento entre 1,3 e 2,3 μm (MOTTA *et al.*, 2001). O simbiote apresenta uma matriz citoplasmática composta de ribossomos e DNA e usualmente é observado junto ao núcleo ou aos glicosomos do protozoário hospedeiro. (MOTTA *et al.* 1997a).

Algumas questões levantaram controvérsias, como é o caso da natureza da membrana externa do endosimbionte de tripanosomatídeos. Durante muitos anos, acreditou-se que esta derivava da membrana plasmática da célula hospedeira, a qual teria sido capaz de formar um simbiosomo em torno da bactéria, durante seu englobamento (CHANG, 1974). Entretanto, outros autores mostraram que o número de proteínas integrais da membrana externa do endosimbionte é similar aquele encontrado em Gram-negativos e bastante diferente do descrito na membrana plasmática do tripanosomatídeo hospedeiro (MOTTA *et al.*, 1991; SOARES AND DE SOUZA, 1987). Mais recentemente, nosso grupo forneceu a prova definitiva da origem procariota da membrana externa: a presença de porinas no envoltório do endosimbionte (ANDRADE *et al.*, 2008). Além disso, o projeto genoma da bactéria simbiótica de *C.deanei* está em fase final e os resultados do seqüenciamento revelam a presença de diversos genes com alta homologia a da bactéria Gram negativa *Bordetella parapertussis* (PROBST *et al.*, 2006).

Quanto à composição lipídica do envoltório do endosimbionte, sabemos que nenhum tipo de esterol está presente. Já em relação à constituição fosfolipídica, predomina uma maior quantidade de cardiolipina (CL), seguida de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI) (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). Recentemente, nosso grupo mostrou que simbiosomas quando isolados de seu tripanosomatídeo hospedeiro são capazes de produzir fosfolipídios de modo independente. Após 1 h de fracionamento celular, PC é o fosfolipídeo predominante, sendo substituído por PE e PI, após 3 h de isolamento. Estes dados indicam que o simbiosoma é dependente, ao menos em parte, da célula hospedeira para a obtenção de fosfatidilcolina (AZEVEDO-MARTINS, 2007).

1.3 O Papel dos Fosfolipídios na Atividade Celular

Os fosfolipídios desempenham papel fundamental no estabelecimento da barreira de permeabilidade seletiva, além da bicamada lipídica abrigar várias enzimas e proteínas transportadoras (CRONAN, 2003). Além disso, os grupos polares ligados a fosfolipídios, tais como a colina, a serina, o inositol e seus derivados, participam de vias de sinalização celular (LENZ, 2000).

A fosfatidilcolina (PC) ou lecitina é um importante metabólito de colina, descrito como o fosfolipídio majoritário em células eucariotas, além de corresponder, quantitativamente, a aproximadamente metade do conteúdo lipídico total de membranas celulares. A PC desempenha ainda, um importante papel na transdução de sinais, sendo fonte de mensageiros secundários. (EXTON, 1994; ZEISEL, 1997). A colina por sua vez, além de utilizada para a síntese de PC e de esfingomielina, é recrutada para a produção do fator de ativação de plaquetas e da lisofosfatidilcolina (ZEISEL *et al.*, 1991; MICHEL *et al.*, 2006) (Figura 2).

O fosfatidilinositol (PI) é um fosfolipídio com papel estrutural na membrana plasmática. Além de ser utilizado para a síntese de fosfoinosítídeos e de inositol polifosfatos, ele pode ser catabolizado a glicerofosfoinositol (revisto por GARDOCKI *et al.*, 2005). PI e seus metabólitos são capazes de regular diversos processos celulares tais como: o ancoramento de glicolipídios a proteínas, transduções de sinais, exportação de mRNA do núcleo e tráfego de vesículas (revisto por GARDOCKI *et al.*, 2005). A síntese de PI ocorre através da ação da fosfatidilinositol sintase que converte CDP-diacylglicerol e inositol em PI e CMP (Figura5) (KENT, 1995).

Os aminofosfolipídios fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) são fosfolipídios metabolicamente relacionados. As sínteses de PE e PS estão interligadas,

podendo haver uma conversão entre elas (Figura 5 e 6) (VANCE AND VANCE, 2008). Uma das vias majoritárias de síntese de PE em eucariotos é a decarboxilação de PS pela fosfatidilserina sintase, que ocorre principalmente no folheto externo da membrana interna das mitocôndrias (Figuras 5 e 6) (VANCE AND VANCE, 2008). As outras duas vias de síntese de PE são a acilação da lisofosfatidiletanolamina (Número 7 da figura 6) e a via da CDP-etanolamina, que ocorrem no retículo endoplasmático (Números 1, 2 e 3 da figura 6) (VANCE AND VANCE, 2008). Já a fosfatidilserina é sintetizada pela fosfatidilserina sintase, a qual pode retirar a colina da fosfatidilcolina e inserir em seu lugar a serina (Figura 6) ou retirar a etanolamina da fosfatidiletanolamina e inserir a serina (Figuras 5 e 6) (VANCE AND VANCE, 2008). Esses fosfolipídios desempenham papéis em processos biológicos tais como apoptose e sinalização celular (VANCE, 2009). Além disso, PE possui papel estrutural e age em eventos de fusão e fissão de membranas (VERKLEIJ *et al.*, 1984).

Já a cardiolipina é um fosfolipídio característico de células procariotas e mitocôndrias. Outros fosfolipídeos compõem a membrana de bactérias, como a fosfatidiletanolamina (PE) e o fosfatidilglicerol (PG). A PC não é comum em procariotos, mas é encontrada no envoltório de bactérias fotossintéticas (que possuem amplas estruturas de membrana interna) e naquelas que vivem em associação estreita com eucariotos, sejam elas patogênica ou simbióticas (HINDAHL AND IGLEWSKI, 1984; MILLER *et al.*, 1990; BELISLE *et al.*, 1994; ABELO AND DOMENECH, 1997; RUDDER *et al.*, 1997).

O cloroplasto, cuja origem simbiótica parece derivar de cianobactéria, é delimitado por duas unidades de membrana. A membrana externa contém glicerolipídios tais como o mono e o digalactosildiácilglicerol, o sulfoquinovosildiácilglicerol, e também fosfolipídios, como fosfatidilglicerol e a

fosfatidilcolina. Já a membrana interna, é capaz de se invaginar e formar os tilacóides, que possuem complexos de pigmentos protéicos mergulhados numa matriz de glicerolípídios polares (os mesmos do envoltório externo). Cabe comentar a ausência de PE nas membranas que compõem os plastídios (CORSARO *et al.*, 1999; BENNING, 2008).

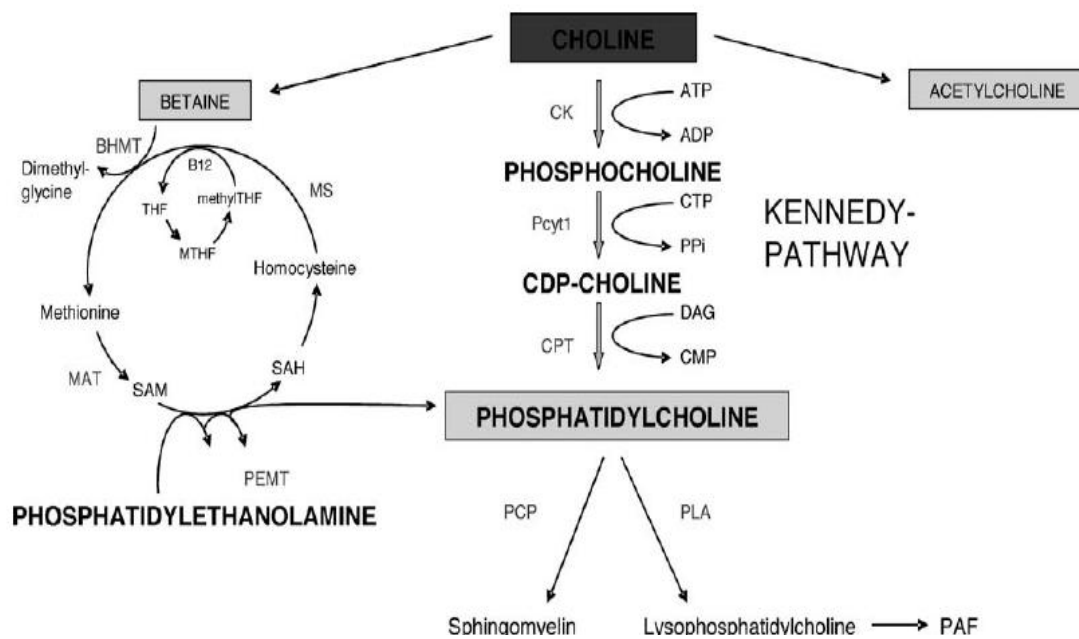


Figura 2: Vias metabólicas de colina. ADP, adenosina difosfato; ATP, adenosina trifosfato; BHMT, betaina: homocisteína metiltransferase; B12, vitamina B12; CDP, citidina difosfato; CK, colina cinase; CPT, CDP-colina: DAG colinafosfotransferase; CMP, citidina monofosfotransferase; DAG, diacilglicerol; MAT, metionina adenosiltransferase; methylTHF, 5-metil-tetraidrofolato; MS, metionina sintase; MTHF, 5,10-metileno-tetraidrofolato; PAF, fator ativador de plaquetas; PCP, fosfatidilcolina: ceramidacolina fosfotransferase; Pcyt1, CTP: fosfocolina citidililtransferase; PEMT, fosfatidiletanolamina, *N*-metiltransferase; PLA, fosfolipase A₂; PPI, pirofosfato; SAH, *S*-adenosilhomocisteína; SAM, *S*-adenosilmetionina; THF, tetraidrofolato. Retirado de Michel *et al.*, 2006.

Por outro lado, a mitocôndria, possui composição fosfolipídica caracterizada pela presença majoritária de fosfatidilcolina, seguida dos fosfolipídios fosfatidiletanolamina, cardiolipina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfático e outros fosfolipídios presentes em menor quantidade em células eucariotas (ZINSER *et*

al., 1991; PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). Em células eucariotas superiores, a cardiolipina é componente lipídico específico da mitocôndria, que é capaz de sintetizar este fosfolípido através de enzimas localizadas em sua membrana mitocondrial interna (SCHLAME *et al.*, 2000). Neste caso, a síntese de cardiolipina tem como precursores o ácido fosfatídico e o fosfatidilglicerol (Figura 5) (HOSTLER *et al.*, 1972; SCHLAME *et al.*, 2000).

Alguns papéis importantes são atribuídos a PC na sinalização celular. Alguns agonistas são capazes de promover a hidrólise de PC gerando diacilglicerol (DAG) o qual promove a ativação da proteína cinase C, que por sua vez regula o processo de transcrição, crescimento e diferenciação celular (EXTON, 1990). Além disso, PC é suscetível à ação de fosfolipases, que são capazes de hidrolisar fosfolípidios interferindo na estabilidade e estrutura das membranas, assim como em processos de sinalização (WANG, 1999). Neste caso, os efeitos na célula são os mais variados, tais como proliferação e diferenciação celular, organização do citoesqueleto e tráfego de membranas (COCKCROFT, 1997; COLLEY *et al.*, 1997; EXTON, 1997; ROSE *et al.*, 1995). Algumas classes de fosfolipases são capazes de gerar lipídios e mensageiros derivados de lipídios, como por exemplo, as fosfolipases A₂ (PLA₂), C (PLC) e D (PLD) (WANG, 1999) (Figura 3).

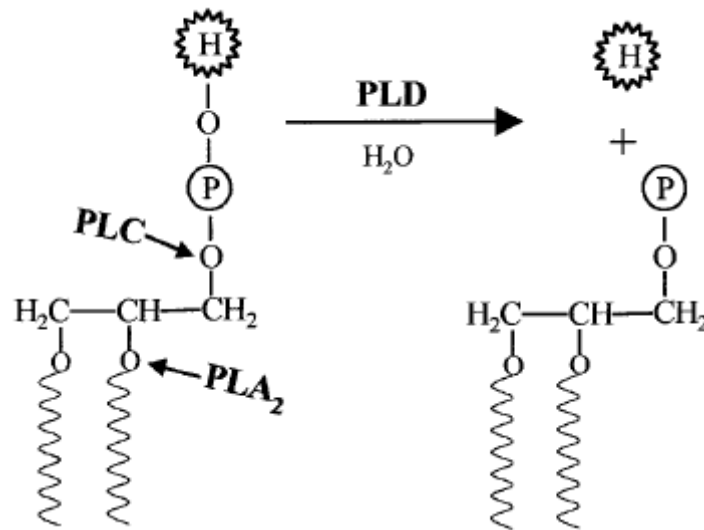


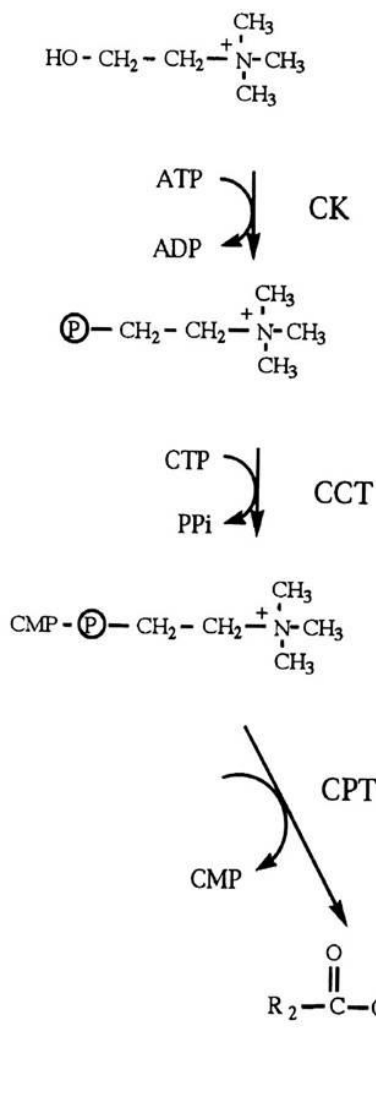
Figura 3: Sítios de clivagem de fosfolipídios por PLD, PLC e PLA₂ e os produtos de PLD, PA (ácido fosfatídico) e os grupos das cabeças dos fosfolipídios (H). Retirado de Wang, 1999.

A fosfolipase C é caracterizada por agir na formação de segundos mensageiros como DAG e inositol fosfato (IP₃). Já a fosfolipase A₂ hidrolisa fosfolipídios para a liberação de ácidos graxos, como o ácido aracdônico, o qual pode ser metabolizado por alguns tipos celulares para formar prostaglandinas, leucotrienos e lisofosfolipídios (WANG, 1999). Já a fosfolipase D é capaz de hidrolisar a PC em ácido fosfatídico (PA), que por sua vez sofre a ação da fosfatidato fosforilase (PAP) para a formação de DAG, além de formar grupos de colina livres (EXTON, 1990; WANG 1999).

1.4 Síntese de Fosfatidilcolina

Estudos genéticos e bioquímicos em vários organismos revelaram duas principais vias de sínteses de fosfatidilcolina (PC). Uma delas é denominada via de Kennedy (KENNEDY AND WEISS, 1956) e predomina em eucariotos superiores. Nesta via, a colina livre é convertida a fosfatidilcolina por intermediários de colina-fosfato e CDP-colina (Figura 4) (KENT, 1995, 1997; LÓPEZ-LARA AND GEIGER, 2001). A outra via de síntese de PC é conhecida como via de Greenberg (ROBSON *et al.*, 1990) ou via das metilações e predomina em eucariotos inferiores e bactérias (VANCE AND RIDGWAY, 1988). Neste caso, PC é gerada após três sucessivas metilações de fosfatidiletanolamina, através da ação de N-metil transferases (Figura 4). Muitos trabalhos descrevem que um grupo de bactérias que possui PC em seu envoltório é capaz de sintetizar este fosfolípido por uma terceira via. Nela, a enzima fosfatidilcolina sintase (Pcs) condensa colina livre com CDP-diacilglicerol formando a fosfatidilcolina (Figura 5) em um único passo metabólico. A importância de PC nesses procariotos está relacionada à manutenção de relações simbióticas, sejam elas mutualísticas ou parasitárias (GOLDFINE, 1982; RUDDER *et al.*, 1997, 1999; LÓPEZ-LARA AND GEIGER, 2001; MARTINEZ-MORALES, *et al.*, 2003; WESSEL *et al.*, 2006).

Via de Kennedy



Via de Greenberg

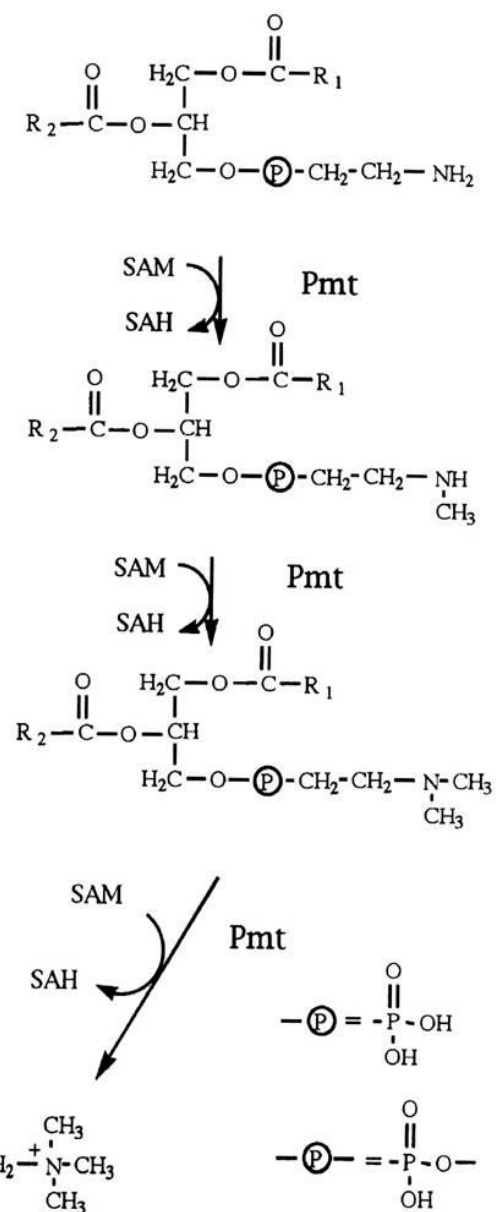


Figura 4 – Vias de síntese de fosfatidilcolina. CK = colina cinase; CCT = fosfocolina citidililtransferase; CPT = CDP-colina:1,2-diacilglicerol colina fosfotransferase; Pmt = fosfatidiletanolamina metiltransferase; SAM = S – adenosilmetionina; SAH = S – adenosilhomocisteína; R₁ e R₂ representam partes alquil dos resíduos acil de ácidos graxos (LÓPEZ-LARA AND GEIGER, 2001).

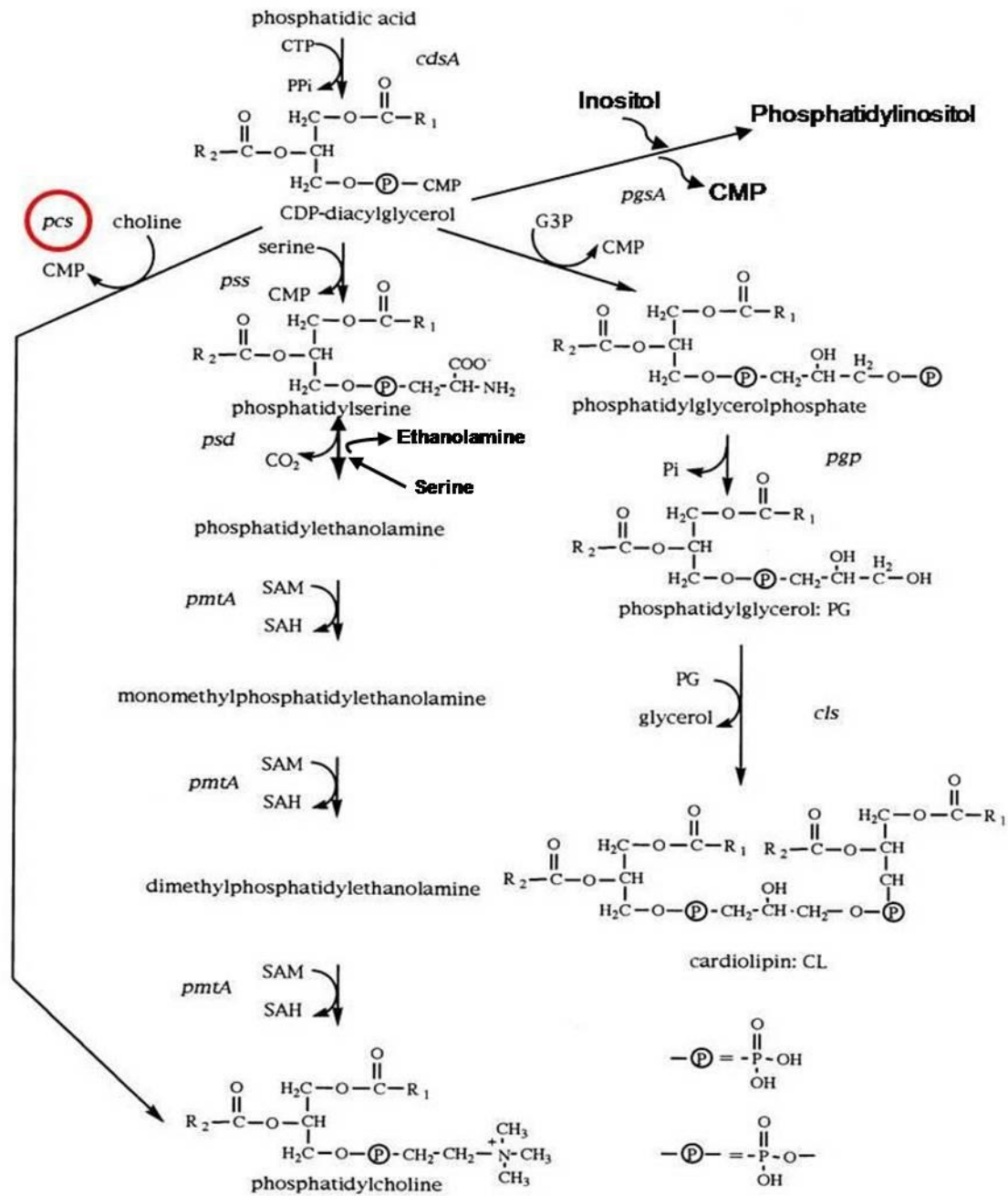


Figura 5: Via de síntese de fosfatidilcolina em procariotos intimamente associados a eucariotos. Pcs = fosfatidilcolina sintase. Em destaque a via da PC sintase. *pmt* = *N*-metiltransferase de fosfolipídios; SAM = S - adenosilmetionina; SAH = S - adenosilhomocisteína; R₁ e R₂ representam partes alquil dos resíduos acil de ácidos graxos; G3P = Glicerol 3-fosfato; CMP = citidina monofosfato; Cls = Cardiopina sintase; Pgp = fosfatidilglicerofosfatase. (Adaptado de LÓPEZ-LARA AND GEIGER, 2001).

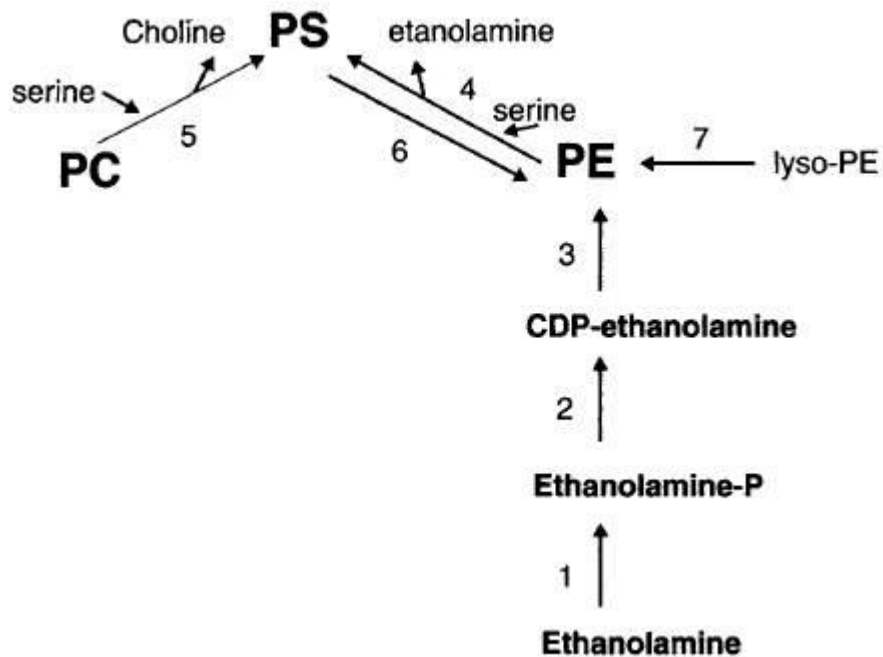


Figura 6: Vias de síntese de fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilserina (PS) em eucariotos superiores. Os números indicam as enzimas. 1 etanolamina cinase; 2 CTP: fosfatidiletanolamina citidililtransferase; 3, CDP-etanolamina: 1,2-diacilglicerol etanolaminafosfotransferase; 4, PS sintase-2; 5, OS sintase-1; 6, OS decarboxilase; 7, acil-CoA: liso-PE aciltransferase. PC, fosfatidilcolina (VANCE AND VANCE, 2008).

1.5 Ação dos Análogos de Fosfolípidos e do 22,26-azasterol na Síntese de Fosfatidilcolina em Tripanosomatídeos

Na década de 1980, alguns agentes quimioterápicos análogos a fosfolípidos foram descritos como inibidores da proliferação de protozoários (ACHTERBERG AND GERCKEN, 1987; CROFT *et al.*, 1987; TSUSHIMA *et al.*, 1982). As alquilglicerofosfolinas (AGPCs), também conhecidas como éteres de lípidos, têm sido usadas com sucesso no tratamento contra o câncer e também na quimioterapia anti-tripanosomatídeos. Tais drogas possuem um esqueleto de glicerol substituído na posição sn-2, como é o caso da edelfosina, ilmofofosina (Figura 7) e também das

alquilfosfocolinas (APCs). Estes compostos possuem a fosfocolina esterificada diretamente com álcoois de cadeia longa sem o esqueleto de glicerol. A miltefosina, também conhecida como hexadecilfosfocolina, foi identificada por Ebil e Unger na década de 1980 como um alquilfosfolípídio com atividade antitumoral (entre outros apresentados na figura 7) (BRACHWITZ AND VOLLGRAF, 1995; CROFT *et al.*, 2003, BLITTERSWIJK AND VERHEIJ, 2008).

A atividade antiparasitária destes compostos, principalmente contra tripanosomatídeos patogênicos, tais como *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (revisto por de CASTRO *et al.*, 2004), permitiram avanços nos estudos clínicos da administração oral da miltefosina. Os efeitos colaterais considerados relativamente brandos, têm levado alguns pesquisadores a acreditar que este seja um importante composto a ser utilizado no tratamento oral da leishmaniose cutânea. Justo por isso, alguns países como a Índia, Alemanha e Colômbia já utilizaram a miltefosina para o tratamento desta doença (CROFT *et al.*, 2003; DE CASTRO *et al.*, 2004; PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006, BLITTERSWIJK AND VERHEIJ, 2008).

A ação e a eficácia da miltefosina parecem estar relacionadas ao seu acúmulo intracelular (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). Algumas cepas de *Leishmania* que se mostraram resistentes a miltefosina, apresentaram menor acúmulo da droga, seja pela queda no uptake, pelo aumento de seu efluxo, pelo seu rápido metabolismo ou mesmo por alterações da permeabilidade da droga pela membrana plasmática (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

Foram sugeridos três passos para o acúmulo de fosfolípídios de cadeia curta e seus derivados, como a miltefosina (Figura 8) (PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006). No primeiro passo ocorre a ligação da droga ao folheto externo da membrana plasmática.

Ocorre então, um equilíbrio entre as moléculas de miltefosina que se ligam à albumina (BSA) presente no soro e àquelas que se ligam a membrana plasmática das células em cultura. Tal equilíbrio dependeria basicamente da concentração de BSA e da concentração de células no meio. O segundo passo envolve a internalização da miltefosina, na qual são considerados dois possíveis mecanismos. No primeiro, através da via endocítica, os monômeros de miltefosina integrados na membrana plasmática são internalizados como membros de vesículas. No caso da *Leishmania*, sua atividade endocítica está restrita a uma região específica da bolsa flagelar (MCCONVILLE *et al.*, 2002). No outro mecanismo esta molécula é internalizada pela via não endocítica ou através da ação da flipase. Neste caso, monômeros de miltefosina, ou outros análogos de fosfolipídios de cadeia curta, podem ser translocados do folheto externo para o interno da membrana plasmática pela ação de proteínas específicas (Figura 8B).

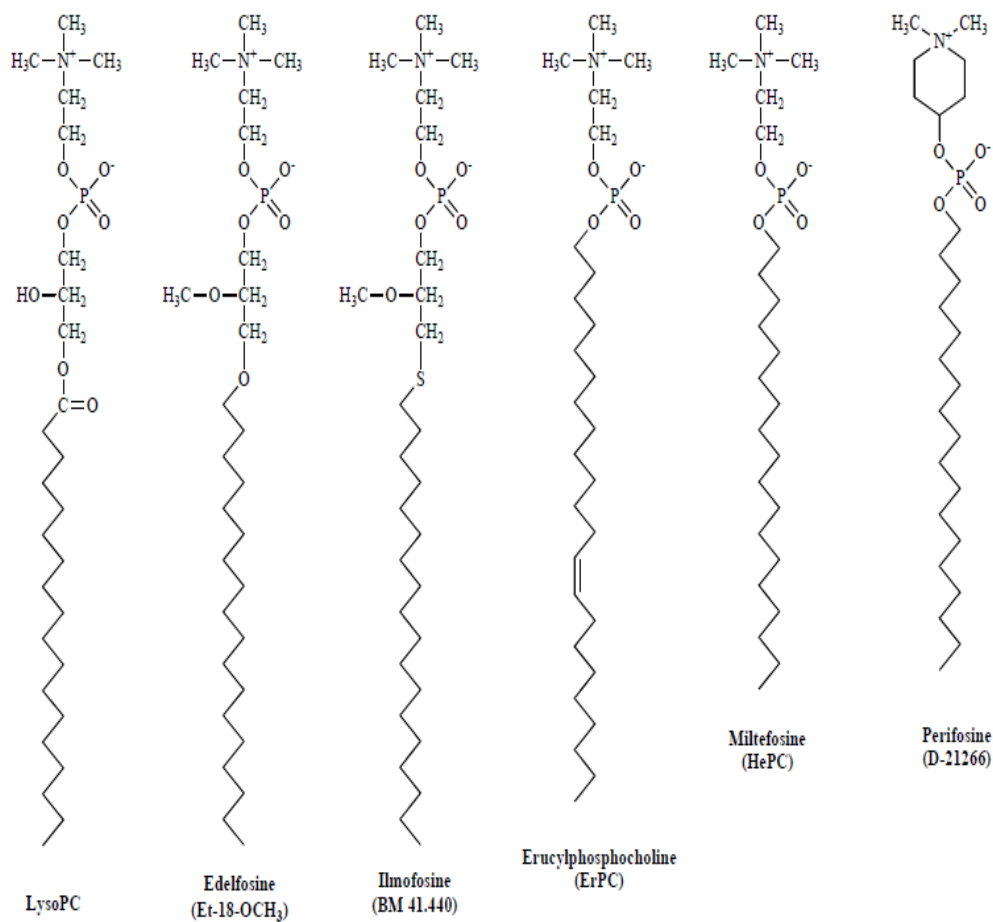


Figura 7: Estrutura química dos alquilfosfolipídios sintéticos em comparação com a lisofosfatidilcolina natural. Retirado de Blitterswijk and Verheij, 2008.

Este último mecanismo vem sendo descrito como o mais importante para internalização da miltefosina em *Leishmania* (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003a), o qual depende de duas proteínas que parecem formar um complexo na membrana plasmática: o transportador de miltefosina (*LdMT*) e sua subunidade beta *LdRos3* (PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2006; PÉREZ-VICTÓRIA *et al.*, 2003b).

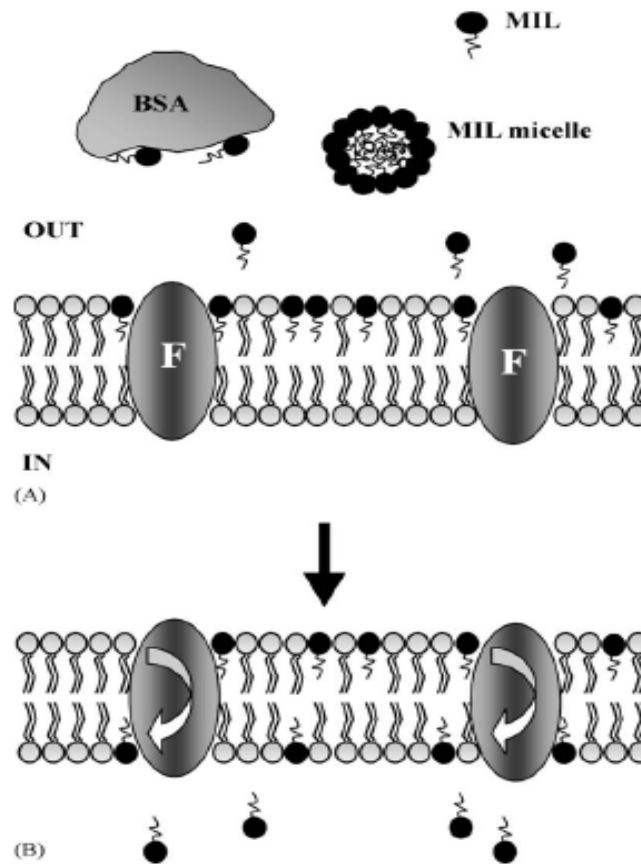


Figura 8: Ligação e uptake de miltefosina em *Leishmania*. Passos seqüenciais para o acúmulo de miltefosina: (A) Ligação da droga ao folheto externo da membrana plasmática. A miltefosina é recrutada pela albumina do soro bovino (BSA), a qual age como um reservatório para a droga. (B) A fração ligada à membranas celulares é internalizada através da ação de flipases (F) presentes na bicamada lipídica. Esta maquinaria de translocação inclui, no mínimo, duas proteínas da membrana plasmática: o transportador de miltefosina LdMT e sua subunidade beta LdRos3. Retirado de Pérez-Victoria *et al.*, 2006.

O terceiro passo envolve os alvos intracelulares da miltefosina e seu metabolismo. Neste caso, os monômeros de miltefosina presentes no folheto interno da membrana plasmática são capazes de se destacar e de se difundir nas membranas de organelas citoplasmáticas. Pouco se sabe sobre a distribuição intracelular da miltefosina e em quais organelas esta droga pode se acumular. No entanto, alguns estudos mostram que a miltefosina é capaz de promover alterações em membranas de organelas (CROFT, *et al.*, 2003; SANTA-RITA AND BARBOSA, 2000).

Os análogos de lisofosfolipídios (LPAs), como a miltefosina, edelfosina e ilmofosina, compreendem uma ampla classe de compostos metabolicamente estáveis que apresentam atividades antiparasitárias, principalmente contra tripanosomatídeos patogênicos como *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi* (revisito por DE CASTRO *et al.*, 2004). Dentre estas atividades, algumas podem ser destacadas, tais como efeitos anti-proliferativos, ultraestruturais, na diferenciação celular, além de serem capazes de promover alterações nos níveis de PC (SANTA-RITA AND BARBOSA, 2000; AZZOUZ *et al.*, 2005; LIRA *et al.*, 2001, CROFT *et al.*, 2003).

Os LPAs interagem com uma variedade de estruturas e enzimas subcelulares devido à sua natureza química e suas propriedades físico-químicas (URBINA, 2006). Além disso, sua natureza anfifílica, representada tanto por sua porção hidrofóbica quanto por sua porção hidrofílica, permite que os LPAs tenham alguns efeitos biológicos e fisicoquímicos, tais como (figura 9):

- a) Atividade citotóxica não específica: representada por sua característica surfactante, pois são moléculas anfifílicas. Esta citotoxicidade ocorre em concentrações iguais ou superiores à sua concentração micelar crítica (cmc), que é de aproximadamente 10 μM para LPAs farmacologicamente ativos (STARFFORD *et al.*, 1989). Os efeitos deste limiar de concentração dependem particularmente do tipo celular e da presença de componentes do soro que ligam a lipídios, os quais reduzem as concentrações de monômeros livres e eleva a cmc efetiva.
- b) Efeitos na imunomodulação: Alguns trabalhos mostram que os LPAs são capazes de ativar de forma não específica macrófagos (NEGWENYA *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 1987). Dados mais recentes mostraram que estes

compostos retêm sua atividade anti-leishmania em camundongos imunodeficientes (ESCOBAR *et al.*, 2001; MURRAY AND DELPH-ETIENNE, 2000). Os efeitos antiparasitários dos LPAs parecem resultar de ação direta no parasita, não requerendo células T do hospedeiro ou ativação dependente de macrófagos (URBINA, 2006).

c) Inibição do metabolismo lipídico: Os LPAs são considerados por alguns autores como sendo inibidores potenciais de enzimas envolvidas na síntese, quebra ou modificação de lipídios de membrana (WEIDER *et al.*, 1999; WRIGHT, *et al.*, 2004). O primeiro sítio de interação dos LPAs é a membrana celular – tanto em protozoários quanto em células cancerígenas (BRACHWITZ *et al.*, 1995; SANTA-RITA *et al.*, 2000). O efeito mais fortemente estudado dos LPAs é na síntese *de novo* de fosfatidilcolina (PC). Alguns trabalhos sugerem que a miltefosina é capaz de inibir a translocação da CTP:fosfolina-citidililtransferase – uma enzima chave na biossíntese de PC pela via de Kennedy (Figuras 4 e 9) – de sua forma citosólica inativa para sua forma ativa ligada a membrana (HAASE *et al.*, 1991; WIEDER, *et al.*, 1998). Além disso, vários estudos relatam a correlação entre a inibição da síntese de PC e o bloqueio da proliferação celular (WEIDER *et al.*, 1995a, 1999). Lira *et al.* (2001), sugerem que LPAs também induzam a modificações da composição de esteróis livres em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* através da inibição da esterol Δ^{22} desnaturase, muito provavelmente por um efeito secundário resultante da alteração fosfolipídica causada por estes compostos.

d) Apoptose: Muitos estudos vêm mostrando que é possível que a redução da síntese de PC possa disparar a apoptose (morte celular programada) em

várias linhagens celulares (CUI AND HOUWELING, 2002; WEIDER *et al.*, 1998, 1999; WRIGHT *et al.*, 2004). Isso porque, a diminuição da síntese de PC, pode levar a diminuição da síntese de esfingomiéline. Estas vias biossintéticas estão estreitamente ligadas, levando ao aumento dos níveis de ceramida, um conhecido indutor de apoptose (HAMPTON AND MORAND, 1989; HANNUN AND OBEID, 1995; WIEDER *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2004). Por outro lado, Van der Sanden *et al.* (2004) mostraram que a apoptose induzida pela miltefosina em células CHO-K1, difere daquela observada em células MT58 deficientes de CTP:fosfolina-citidililtransferase. Estes autores concluíram então, que a inibição da síntese de PC não é o primeiro mecanismo para indução da morte celular por miltefosina, sugerindo fortemente que este efeito está relacionado às consequências de ações citotóxicas não específicas por esta droga (VAN DER SANDEN *et al.*, 2004).

- e) Inibição da sinalização celular: Um dos efeitos nas vias de sinalização celular promovido por LPAs, envolve a inibição da fosfolipase D. Deste modo, ocorre a inibição da quebra de PC à ácido fosfatídico e diacilglicerol, os quais atuam na via das MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) que é a via de proliferação celular (Figura 9). A miltefosina foi capaz de inibir a atividade da fosfolipase D *in vitro*, porém não apresentou efeito nesta enzima em linhagens de células leucêmicas humanas, bem como não apresentou efeitos na atividade de esfingomiélinases nestes mesmos tipos celulares (BERKOVIC *et al.*, 2002). As LPAs agem também sobre fosfolipases do tipo C (ÜMBERALL *et al.*, 1991; NISHIZUKA, 1992; POWIS *et al.*, 1992; BERKOVIC *et al.*, 1996; BLITTERSWIJK AND VERHEIJ, 2008).

Contudo, em contraste com a inibição da biossíntese de PC, não existe correlação consistente entre a inibição da fosfolipase C e a queda da proliferação celular (WIEDER *et al.*, 1999).

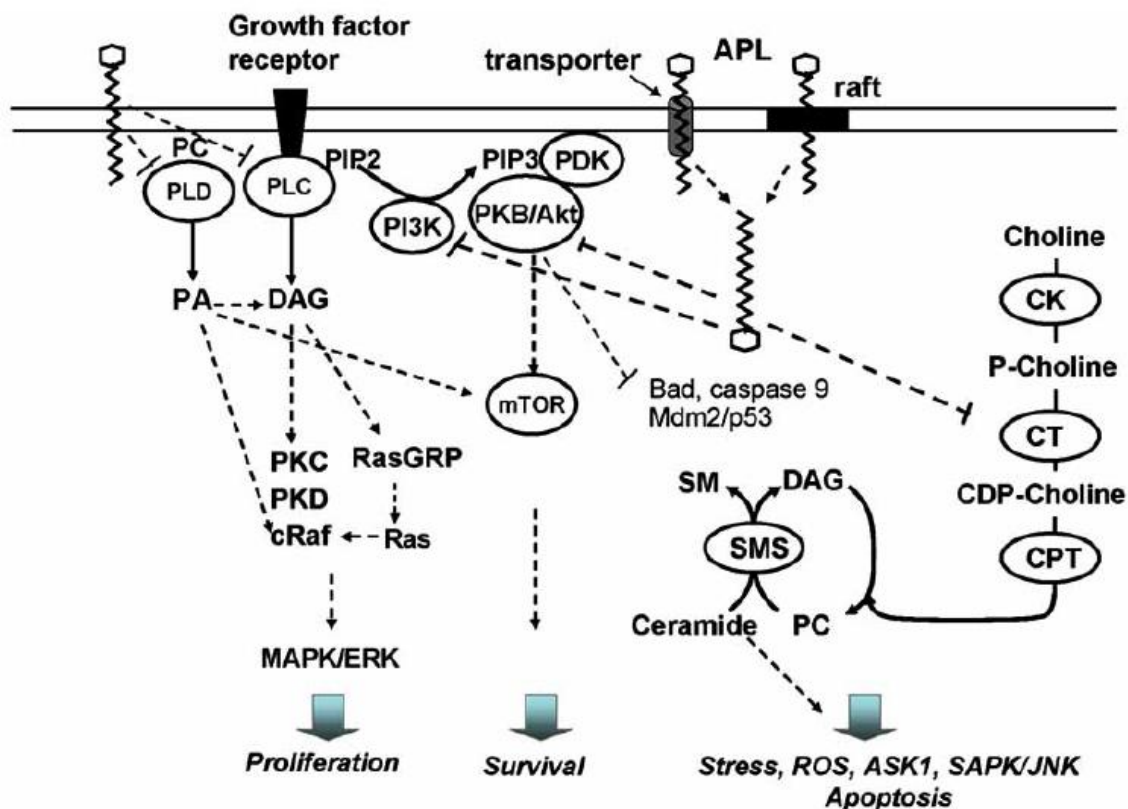


Figura 9: Alvos dos alquil lisofosfolípidios (APL) no metabolismo e vias de sinalização, resultando na supressão das vias proliferativas MAPK/ERK e de sobrevivência PI3K/Akt, e na ativação da via de estresse da SAPK/JNK e indução de apoptose. APLs são internalizados via lipid rafts e/ou via um transportador ATP dependente da membrana plasmática. As APLs têm efeito na inibição da CTP:fosfocolina citidililtransferase (CCT), na atividade da PI3K e na translocação de membrana PKB/Akt. Outros alvos das APLs são as fosfolipases PLC e PLD, cuja inibição afeta a via proliferativa de MAPK/ERK. Retirado de Blitterswijk and Verheij, 2006.

Outra droga que afeta o metabolismo lipídico é o 22,26 azasterol (Figura 10), um inibidor da $\Delta^{24(25)}$ esterol metiltransferase, enzima responsável pela síntese do fecosterol a partir do zimosterol, o qual é convertido em ergosterol (RODRIGUES *et al.*, 2002; HAUGHAN *et al.*, 1995). Além disso, esta droga também parece ser capaz de

alterar a conversão de fosfatidiletanolamina em fosfatidilcolina. Alguns trabalhos relatam alterações na composição fosfolipídica em tripanosomatídeos tratados com 22,26 azasterol, sugerindo uma inibição indireta da fosfatidiletanolamina N-metiltransferase para a formação de fosfatidilcolina (CONTRERAS *et al.*, 1997; URBINA, 1997; PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006).

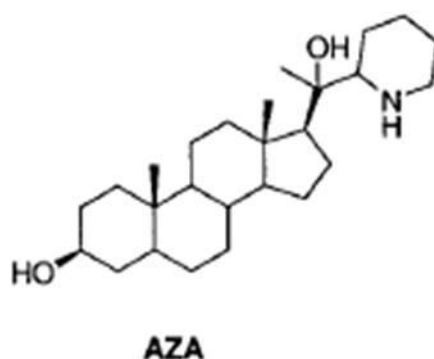


Figura 10: Estrutura do azasterol (LORENTE *et al.* 2004)

Em *C. deanei*, o 22,26 azasterol promoveu inibição da síntese de PC tanto na célula hospedeira quanto em sua bactéria simbiótica, resultando em menores quantidades de PC e maiores quantidades de PE (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006). Este resultado sugere que o 22,26 azasterol, exerce de fato uma inibição enzimática das PE/PC N-metiltransferases, descritas na via de Greenberg, como anteriormente proposto por Urbina (1997).

No presente trabalho, verificamos o efeito da miltefosina, na proliferação e ultraestrutura de *C. deanei*. Além disso, a composição fosfolipídica do protozoário, do endosimbionte e de frações mitocôndrias (modelo evolutivo de comparação) também foi avaliada após o tratamento com a droga. O uso de inibidores da síntese de fosfatidilcolina em tripanosomatídeos que contêm bactéria simbiótica pode não só

esclarecer qual é a principal via de síntese deste fosfolípídeo, mas também indicar a importância da fosfatidilcolina no estabelecimento da relação simbiótica.

2. Objetivos

Objetivo Geral:

Avaliar os efeitos da miltefosina na proliferação, ultraestrutura e biossíntese fosfolipídica de *Crithidia deanei*

Objetivos específicos:

- Comparar a proliferação celular das cepas normal e curada de *C. deanei* tratadas com miltefosina.
- Investigar os possíveis efeitos da miltefosina na ultraestrutura de *C. deanei* por microscopia eletrônica de transmissão.
- Avaliar os efeitos da miltefosina na biossíntese fosfolipídica de *C. deanei*, cepa contendo endosimbionte, crescida em meio contendo a droga e ^{32}Pi .
- Avaliar os efeitos da miltefosina na biossíntese fosfolipídica de frações de simbiontes e mitocôndrias obtidos por fracionamento celular de *C. deanei* crescida em meio contendo a droga e ^{32}Pi .

3 – Material e Métodos

3.1 Cultivo de Células

Crithidia deanei, cepas normal e curada, foi cultivada em meio de cultura Warren (WARREN, 1960) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab), e crescidas à temperatura de 28 °C por 24 h. Após esse período, as células foram retiradas da estufa e mantidas a 4 °C por um período de 1 semana. Os repiques foram feitos inoculando 10 % de cultura crescida a meio e soro frescos.

3.2 Curva de Proliferação Celular

A fim de verificar os efeitos da miltefosina sobre a proliferação celular das cepas normal e curada de *Crithidia deanei*, foram feitas curvas de proliferação celular utilizando-se as concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 µM de miltefosina. Essas concentrações de drogas foram obtidas através da diluição da solução estoque de miltefosina (100 mM) dissolvida em metanol absoluto. Foram utilizadas como controle células que não foram submetidas à ação da droga e células submetidas ao volume de metanol correspondente ao aplicado às culturas de 100 µM da droga, a fim de observar o efeito do veículo na proliferação. A droga foi adicionada após 12 horas de crescimento, que equivale a fase exponencial do cultivo.

Foram retiradas alíquotas das culturas, cujas concentrações iniciais no lançamento da curva eram de $1,0 \times 10^6$ células/mL num volume final de 7 mL de cada amostra. A cada 12 h de proliferação celular, parte da cultura foi diluída em solução de formaldeído 3,8 % e contada em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia óptica (Zeiss Axiostar Plus) e outra parte foi processada para microscopia eletrônica de

transmissão, como será descrito a seguir. Foram coletados pontos após 12, 24, 36, 48 e 60 h de tratamento com a droga. Cada experimento de curva de proliferação celular de *C. deanei* foi feito em duplicata e foram utilizados 7 tubos identificados, respectivamente como: Controle, Metanol 0,1% (células + o veículo da droga), 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 75 μ M e 100 μ M de miltefosina (células + respectivas concentrações de miltefosina no meio).

3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Utilizamos a microscopia eletrônica de transmissão como ferramenta para verificar os efeitos da miltefosina na ultraestrutura de *C. deanei*. Para tal, as amostras foram lavadas duas vezes em PBS e fixadas em glutaraldeído 2,5 % diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão e então fixadas por 1 hora com ferrocianeto de potássio 0,8 % e tetróxido de ósmio 1 % diluídos em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2. Após este período o material foi lavado no mesmo tampão, sendo em seguida desidratado em concentrações crescentes de acetona (50 %, 70 %, 90 % e duas vezes em 100 %). Ao final deste processo, o material foi infiltrado overnight em solução de acetona 100 % e resina epóxi (1:1). No dia seguinte, as amostras foram infiltradas em resina pura por cerca de 6 horas e depois emblocadas em forma de inclusão. A polimerização da amostra ocorreu a 60 °C por 48 h. Cortes ultrafinos (70 nm) foram obtidos em Ultramicrótomo Reichert Ultracuts (tipo 702501 – Leica), que foram coletados em grades de cobre de 400 mesh. Ao final de todo o procedimento, os cortes foram contrastados em acetato de uranila 5 % diluído em H₂O (por 45 min) e em citrato de

chumbo (5 min). O material foi observado no microscopia eletrônica de transmissão Zeiss 902 (BOZZOLA AND RUSSEL, 1992).

3.4 Incorporação de Traçadores Radioativos em *Crithidia deanei*

a) Curva de Crescimento: a incorporação de traçadores radioativos foi utilizada com o objetivo de analisar o perfil de síntese dos fosfolipídios de *C. deanei* durante a fase exponencial de crescimento celular. Foram feitas curvas de proliferação celular, como descrito anteriormente, porém neste caso usamos $1,0 \times 10^7$ células/mL em um volume final de 40 mL. Após 12 h de proliferação, foram aplicados a cultura 4 μ Ci de ^{32}Pi . Posteriormente, foram distribuídos 5 mL à 6 tubos de ensaio para cada tempo de cultivo: 12, 24, 36, 48 e 60 h. As amostras foram então, crescidas em estufa a 28 °C por 12 h. Após este tempo, foram aliqüotadas as amostras de 12 h em 12 h, e estas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7.2 para posterior extração lipídica. A fim de se normalizar os resultados posteriormente, foram aliqüotados 50 μ L de cada amostra em cada tempo considerado. Diluiu-se 500 vezes estas amostras e fixadas em 4 % paraformaldeído diluído PBS, pH 7,2 para posterior contagem em câmara de Neubauer.

b) Análise da Síntese Lipídica: Verificamos a incorporação do traçador radiativo ^{32}Pi em *C. deanei* crescida por 24, 36 e 48 h em meio de cultura contendo diferentes concentrações de miltefosina. Pretendemos deste modo, analisar o perfil de síntese fosfolipídico do protozoário frente a droga. Para esta finalidade, foram feitas curvas de proliferação celular como descrito no tópico anterior, mas neste caso foi lançada uma concentração de $1,0 \times 10^7$ células/mL num volume final de 100 mL. Após 12 h de proliferação, foram aplicados 4 μ Ci de ácido fosfórico marcado radioativamente (^{32}Pi)

na cultura. Subseqüentemente, foram distribuídos 5 mL em cada tubo de ensaio, considerando os diferentes tempos (24, 36 e 48 h) concentrações utilizadas de miltefosina (10, 25 e 50 μ M). As amostras foram crescidas a 28 °C por 12 h. Após este tempo, as amostras foram aliqüotadas a cada 12 h e lavadas em PBS, pH 7,2, para posterior extração lipídica. A fim de se normalizar posteriormente os resultados, parte do material foi fixado para contagem, como descrito anteriormente.

3.5 Fracionamento Celular de *Crithidia deanei* Crescidas em Meio Contendo

Traçadores Radioativos

O cultivo de *C.deanei* em meio contendo 32 Pi foi realizado com o objetivo de analisarmos a incorporação do traçador e a síntese fosfolipídica em endosimbiontes e mitocôndrias obtidos após fracionamento celular do protozoário. Para obter frações puras de endosimbionte, foi utilizada a técnica de fracionamento celular estabelecida por ALFIERI e col. (1978) com algumas modificações, como descrito a seguir. *C. deanei* foi crescida em meio Warren contendo 10% de soro fetal bovino, para um volume final entre 800 e 1.200 mL. Os protozoários foram lavados 2 vezes em PBS, pH 7,2 e centrifugados a 4.000 g por 10 minutos em centrífuga Sorvall (RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge – Du Pont Instruments). O sedimento obtido foi ressuspensão em 4 a 7 mL de água deionizada gelada onde foi mantido a 4 °C, em banho de gelo, por cerca de 35 minutos. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 4.000 g por 10 minutos na mesma centrífuga e ressuspensas em 10 a 13 mL de tampão tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M.

O rompimento celular foi realizado por ultra-som (Ultrasonic processor model GEX-600), onde foram aplicadas três sessões de três séries de pulsos de 15 s com

amplitude de 10 %. Entre cada série de pulsos, foi dado um intervalo de um minuto para promover a sedimentação das células inteiras persistentes, o que otimizou o rompimento. Em seguida, os protozoários foram incubados em proveta de 50 mL em estufa a 25 °C por 30 minutos com 25 µg/mL de DNase I (Sigma) diluída em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M, CaCl₂ 2 mM e MgCl₂ 10 mM. Após este período, foi adicionado 10 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 2 mM. O volume total de 30 mL foi homogeneizado e centrifugado a 5.000 g por 20 minutos em centrífuga Sorvall. O sedimento obtido foi ressuspensão em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e 0,5 mg/mL de protease tipo XIV de *Streptomyces griseus* (Krainsky, 1914). Em seguida, a solução foi centrifugada em centrífuga Sorvall por 20 minutos a 4.000 g e o sedimento formado foi ressuspensão em 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e EDTA 2 mM.

Com o objetivo de retirar as células inteiras persistentes, o homogeneizado foi colocado sob colchão de sacarose 0,5 M diluída em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 (proporção de 2,5 mL de homogeneizado celular para 2,5 mL de tampão contendo sacarose). Após centrifugação a 550 g por 10 minutos em centrífuga refrigerada (Spin IV – Incibrás), o sedimento contendo as células inteiras foi descartado e parte do sobrenadante contendo simbioses e mitocôndrias (a banda formada na parte superior de cada tubo) foi recolhida e centrifugada a 1.000 g por 10 minutos em centrífuga Sorvall. O sedimento obtido (rico em simbioses) foi separado e o sobrenadante, após centrifugação de 4.000 g por 10 minutos, deu origem a um novo sedimento, que equivale à fração de mitocôndrias. O sedimento rico em simbioses foi ressuspensão em 6 mL de tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,6 contendo sacarose 0,25 M e aplicado em gradiente de sacarose: cada um dos 6 tubos continha 1 mL de uma solução 0,88 M de

sacarose, 2 mL de solução 0,44 M de sacarose, e no topo 1 mL do homogeneizado celular. Após centrifugação a 1.740 g por 30 minutos em centrífuga Beckman (L8-70M ultracentrifuga, com rotor SW 50.1), foi obtido um pellet que equivale a fração purificada de simbiontes, após eliminação dos fragmentos mitocondriais contaminantes.

3.6 Extração de Lipídios

Extração de Lipídios

Foram utilizadas amostras congeladas de *C. deanei* normal, de frações enriquecidas de endosimbiontes e frações enriquecidas em mitocôndrias, nos experimentos de incubação com ^{32}Pi , como descrito anteriormente. As amostras foram ressuspensas em 1 mL de água destilada e transferidas para tubos de ensaio. A estes tubos, foram adicionados 2 mL de solução contendo clorofórmio:metanol:ácido clorídrico (200:100:0,75 V/V) e feita agitação vigorosa com o auxílio de um Vortex.. Ao final desta etapa, foram adicionados 0,3 mL de ácido clorídrico 0,6 N à mistura, a qual foi centrifugada a 600 g por 10 minutos em centrífuga clínica Excelsa Baby I 206 (FANEM). Ao final da centrifugação, houve a formação de duas fases distintas, sendo a fase inferior (clorofórmio), a qual possuía os fosfolipídios, recolhida em outro tubo e a fase superior descartada. Ao material recolhido, foram adicionados 2mL de solução de clorofórmio:metanol:H₂O (3:48:47 V/V) e este foi novamente vigorosamente agitado e posteriormente centrifugado a 600 g por 10 minutos na mesma centrífuga, resultando em uma nova separação de fases. A fase inferior, contendo os fosfolipídios, foi recolhida e a fase superior, contendo o resto de água da amostra, foi descartada. Ao final do procedimento, a fase inferior foi seca sob nitrogênio gasoso.

3.7 Cromatografia em Camada Fina

A cromatografia em camada fina foi realizada com o objetivo de separar os fosfolípidios de *C. deanei* presentes nas frações de simbionte e mitocôndria obtidos após extração lipídica. Este método foi realizado segundo o protocolo descrito por Einicker-Lamas *et al.* (1999). Os solventes e placas de cromatografia (Sílica Gel 60F254 da Merck) utilizados nesta etapa foram obtidos da Merck e os demais reagentes e padrões da Sigma.

Antes de iniciar a cromatografia foram delimitados os espaços nos quais iriam ser aplicadas as amostras na placa de sílica. Em seguida, colocou-se a placa de sílica na estufa a 110 °C por 10 minutos para que esta fosse ativada a partir da evaporação do vapor d'água adsorvido. Volumes de 60 µl das amostras correspondentes a extratos de lipídios de *Crithidia deanei* e das frações de simbionte e mitocôndria foram aplicados na placa de sílica. As amostras correspondem aos lipídios extraídos de *C. deanei* crescida por 12 h em meio de cultura contendo 4 µCi ³²Pi na presença de 10 µM, 25 µM e 50 µM de miltefosina, nos tempos de 24, 36 e 48 h. Células crescidas na presença do traçador radioativo, mas sem o uso da droga, foram utilizadas como controle. Além disso, foram aplicadas à placa de sílica as amostras de lipídios extraídos de simbiontes e mitocôndrias obtidas por fracionamento celular de protozoários crescido em meio contendo 4 µCi de ³²Pi e tratados com 10 µM de miltefosina por 24 h.

A mistura de clorofórmio:acetona:metanol:HCl:H₂O (120:45:39:36:24) foi utilizada como fase móvel da cromatografia, seguindo o método de Horwitz AND Perlman (1987). No final do processo (aprox. 1 h e 20 min), foi retirada a placa da cuba de corrida e foi evaporado o solvente por cerca de 12 h a temperatura ambiente, em uma capela de exaustão.

Como não foi utilizado padrões de fosfolipídios radioativos para identificar cada fosfolipídio, utilizamos a mobilidade relativa dos fosfolipídios de interesse em experimentos anteriores nos quais os padrões de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e cardiolipina (CL) foram aplicados na mesma placa contendo amostras de *C. deanei* não radioativa, e desta forma foi possível identificar nossos objetos de estudo. Neste caso, após correr a placa na mesma mistura de corrida já descrita e após haver evaporação desta mistura presente na placa, fez-se a revelação dos fosfolipídios numa cuba contendo iodo metálico, que sublima e passa rapidamente para o estado gasoso. Os vapores de iodo se ligam nas duplas ligações dos lipídios, permitindo assim a visualização dos fosfolipídios de interesse na amostra, possibilitando assim sua identificação.

A revelação das bandas referentes aos fosfolipídios marcados após a incubação com o ^{32}P foi feita com a utilização da malha sensível à radiação de ^{32}P (Care of Molecular Dynamics Storage Phosphor Screen GP), a qual foi exposta a placa de sílica contendo os fosfolipídios marcados. Após exposição por 24 h, foi procedida a revelação das bandas marcadas através da utilização do equipamento Storm 860 (Molecular Dynamics – divisão da Amesham Pharmacia Biotech), utilizado para *escanear* a placa (com o auxílio do software Storm Scanner Control). Depois deste procedimento, foi feita a densitometria das bandas correspondentes aos fosfolipídios PI, PC, PE e CL. A quantificação da densitometria foi realizada com o auxílio do programa Image Quant. Posteriormente, as imagens digitais das placas de sílica escaneadas foram impressas a fim de sobrepor as impressões às placas para a identificação das respectivas bandas dos fosfolipídios. Esta etapa foi realizada com o auxílio de um transiluminador (Brave aparelhos eletrônicos). Em seguida, as bandas de interesse, correspondentes aos fosfolipídios já mencionados, foram raspadas com auxílio de um bisturi, a sílica

recolhida em vials contendo líquido de cintilação, e a radiação presente foi quantificada por cintilografia líquida em cintilador (TRI-CARB 2100TR – Packard Bioscience), que forneceu valores em cpm (cintilações por minuto).

4. Resultados

4.1 Efeitos da Miltefosina na Proliferação Celular das Cepas Normal e Curada de *Crithidia deanei*

Adicionou-se miltefosina às culturas de *C. deanei*, cepas normal e curada, após 12 h de cultivo, o que equivale à fase exponencial de crescimento do protozoário (Figura 11, a seta indica o ponto de adição da droga). Os tripanosomatídeos tratados com miltefosina mostraram queda dose dependente na proliferação celular quando comparados com aqueles não tratados com a droga (controle). Já o metanol, que é o diluente da miltefosina, não influenciou na proliferação celular das cepas normal e curada de *Crithidia deanei* (Figura 11).

Em relação a cepa contendo endosimbionte, observamos que após 12 h de ação da droga, que equivale a 24 h de cultivo, houve uma queda na proliferação celular de aproximadamente 6 %, 15 %, 13 %, 34 % e 64 % para as respectivas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 μM de miltefosina, quando comparado ao controle. Após 24 h de tratamento, a porcentagem de queda foi de aproximadamente 17 %, 24 %, 21 % 48 % e 80 %, para as mesmas concentrações de droga, respectivamente (Tabela 1).

É interessante notar que após 36 h de tratamento (tempo de 48 h na curva de crescimento), houve um aumento de 5 % na proliferação das culturas tratadas com 10 μM de miltefosina. No entanto, para as outras concentrações neste mesmo tempo houve uma queda dose dependente na proliferação celular de aproximadamente 6 %, 16 %, 38 % e 64 % após tratamento com 25, 50, 75 e 100 μM da droga, respectivamente (Tabela 1).

A cultura de células tratadas por 48 h com 10 μM de miltefosina manteve o mesmo nível de proliferação, quando comparada às células controle. No entanto, para as concentrações de 25, 50, 75 e 100 μM , as porcentagens de queda na proliferação foram de 20 %, 17 %, 32 % e 65 %, aproximadamente.

Tempo (horas)	Controle (10^6 células/ ml)		Tratamento com a miltefosina (10^6 células/ml)				
	Crithidia deanei	Crithidia deanei + 7 μ L de Metanol	10 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
0	1	1	1	1	1	1	1
12	4,85	4,67	4,54	4,46	4,59	4,49	4,49
24	27,53	27,62	25,92	23,38	23,75	17,95	9,95
36	103,75	92,15	86,01	79,23	82,06	54,15	20,5
48	175,62	173,74	184,48	165,44	146,88	109,68	62,83
60	178,72	178,92	179,36	143,19	149,19	121,49	61,99
72	140,92	144,25	115,23	128,35	110,27	93,07	48,26

Tabela 1: Ação da miltefosina na proliferação da cepa normal de *Crithidia deanei*

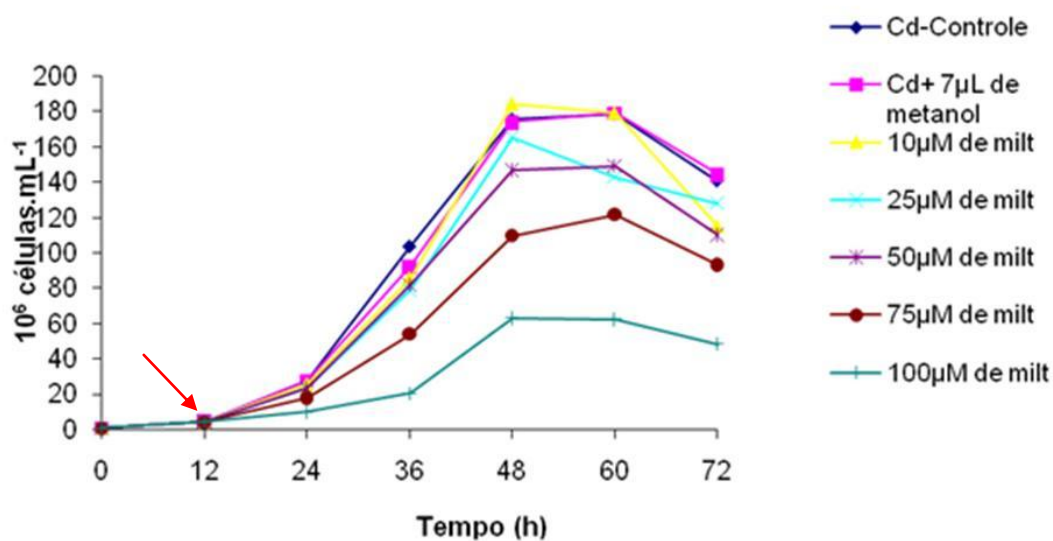


Figura 11: Efeito da miltefosina na proliferação da cepa normal de *Crithidia deanei*. A seta indica o momento de adição da miltefosina nas culturas. Resultados representativos de 4 duplicatas.

O efeito da miltefosina também foi verificado na cepa curada de *C.deanei*, um modelo comparativo que permite avaliar a influência do simbionte no processo de proliferação celular. Estes protozoários foram tratados com as mesmas concentrações da droga aplicadas aos protozoários portadores de endosimbionte (Tabela 2 e Figura 12).

Após 12 h de ação da miltefosina, as células tratadas com 10 μM e 25 μM apresentaram um aumento na proliferação de aproximadamente 11 % e 7 %, respectivamente, quando comparadas ao controle. De outro modo, o tratamento com 50 μM e 100 μM da droga promoveu uma queda de aproximadamente 6 % e 22 % no crescimento celular, respectivamente. Já a proliferação das células tratadas com 50 μM de droga, não foi praticamente alterada. Por outro lado, após 24 h de tratamento, a proliferação das células curadas tratadas com 10, 25, 50, 75 e 100 μM da droga apresentaram queda na proliferação de aproximadamente, 23 %, 18 %, 14 %, 31 % e 43 %, respectivamente. Depois de 36 h de ação da miltefosina, as células tratadas com 10 μM mantiveram sua proliferação, quando comparada ao controle, enquanto os protozoários tratados com as concentrações crescentes da droga tiveram queda dose dependente na proliferação de respectivamente, 5 %, 23 %, 31 % e 44 %.

A porcentagem de queda na proliferação de células da cepa curada após 48 h de tratamento foi de 15 % com 10 μM , 26 % com 25 μM , 29 % com 50 μM e 75 μM e 52 % para os protozoários tratados com 100 μM de miltefosina.

Tempo (horas)	Controle (10^6 céls/ ml)		Tratamento com a miltefosina (10^6 células/ml)				
	Crithidia deanei	Crithidia deanei + metanol	10 μ M	25 μ M	50 μ M	75 μ M	100 μ M
0	1	1	1	1	1	1	1
12	5,77	5,81	6,02	5,14	5,82	5,83	5,66
24	24,32	22,26	26,88	25,94	22,82	24,44	19,00
36	70,00	70,07	53,69	57,57	60,19	48,00	39,82
48	118,63	121,13	119,44	112,50	91,25	82,32	66,76
60	101,82	95,88	86,38	75,75	72,00	71,94	49,32
72	74,07	74,63	61,13	61,94	58,07	62,19	46,94

Tabela 2: Ação da miltefosina na proliferação da cepa curada de *Crithidia deanei*. Resultados representativos de três duplicatas.

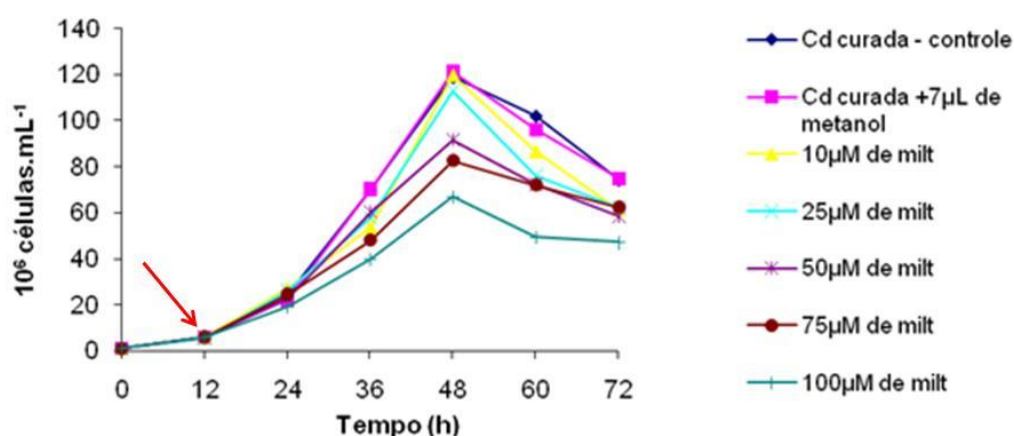


Figura 12: Efeito da miltefosina na proliferação da cepa curada de *Crithidia deanei*. A seta indica o momento de adição da miltefosina nas culturas.

É interessante notar, que após 48 h de cultivo observa-se uma taxa de crescimento bastante reduzida das células controle da cepa normal e uma queda de quase 10 % na proliferação da cepa curada. Já o tempo de 72 h de cultivo mostra uma queda acentuada na proliferação dos protozoários, tanto das células controle, como

daquelas tratadas com a droga. Concluímos deste modo, que o melhor período para avaliar o efeito da miltefosina na proliferação de *C.deanei* é durante a fase exponencial de crescimento, ou seja, utilizando protozoários com até 48 h de cultivo. Após este tempo, observamos um menor efeito da droga, especialmente na cepa contendo endosimbionte.

Outro ponto importante a destacar é o menor efeito da miltefosina na proliferação celular da cepa curada em relação à cepa que contém simbionte. A concentração inibitória de 50 % (IC₅₀) de *C. deanei* com simbionte é aproximadamente de 85 μ M e dos protozoários aposimbóticos é superior a 100 μ M no tempo de 24h. Quando comparamos a maior concentração de droga administrada em ambas cepas, observamos a diferença de sensibilidade à droga em relação às duas cepas (Figura 13).

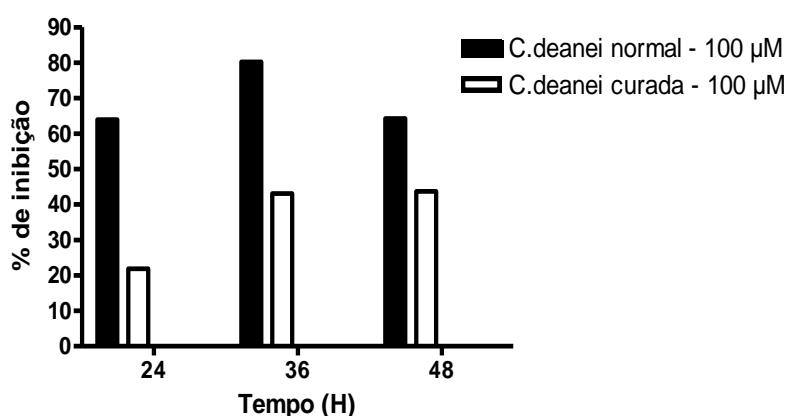


Figura 13: Porcentagem de inibição da proliferação celular de *C. deanei* normal e curada após 24, 36 e 48h de tratamento com 100 μ M de miltefosina.

4.2 Efeito da Miltefosina na Ultraestrutura Celular de *Crithidia deanei*

Os efeitos da miltefosina na ultraestrutura de *C.deanei*, foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Este tipo de análise foi importante não somente para observar quais estruturas e organelas foram afetadas pela miltefosina, mas

inclusive para a escolha do tempo e da concentração ideal de droga que possibilitassem a obtenção de frações celulares contendo endosimbiontes sem danos ao seu envoltório (preservação das duas unidades de membrana da bactéria).

As células tratadas com miltefosina, cepas normal e curada, apresentaram alterações ultraestruturais em relação às células controle (Figura 14 A-D células controle). Após 24 h de tratamento com 25 μM da droga, foram observadas alterações na membrana plasmática, como “blebbing” e “shedding” (Figuras 15 A, C e D). Foram vistos também, perfis de membrana na bolsa flagelar (Figura 15 B) e inchaço da mitocôndria e suas cristas (Figura 16 B).

Os protozoários apresentaram-se bastante vacuolizados após tratamento com a concentração mais elevada da miltefosina (100 μM), mesmo nos tempos mais baixos (Figuras 16).

Análises ultraestruturais revelaram que o tratamento com 10 μM de miltefosina por 24 h, representa a situação limite para a obtenção de frações de simbiote. Neste caso, o envoltório da bactéria ainda mostra-se íntegro apesar da presença da droga no meio de cultura. Na cepa contendo endosimbionte, observou-se que as maiores concentrações de miltefosina afetaram fortemente o envoltório da bactéria, que apresentou convoluções de membrana (Figura 17 A-D).

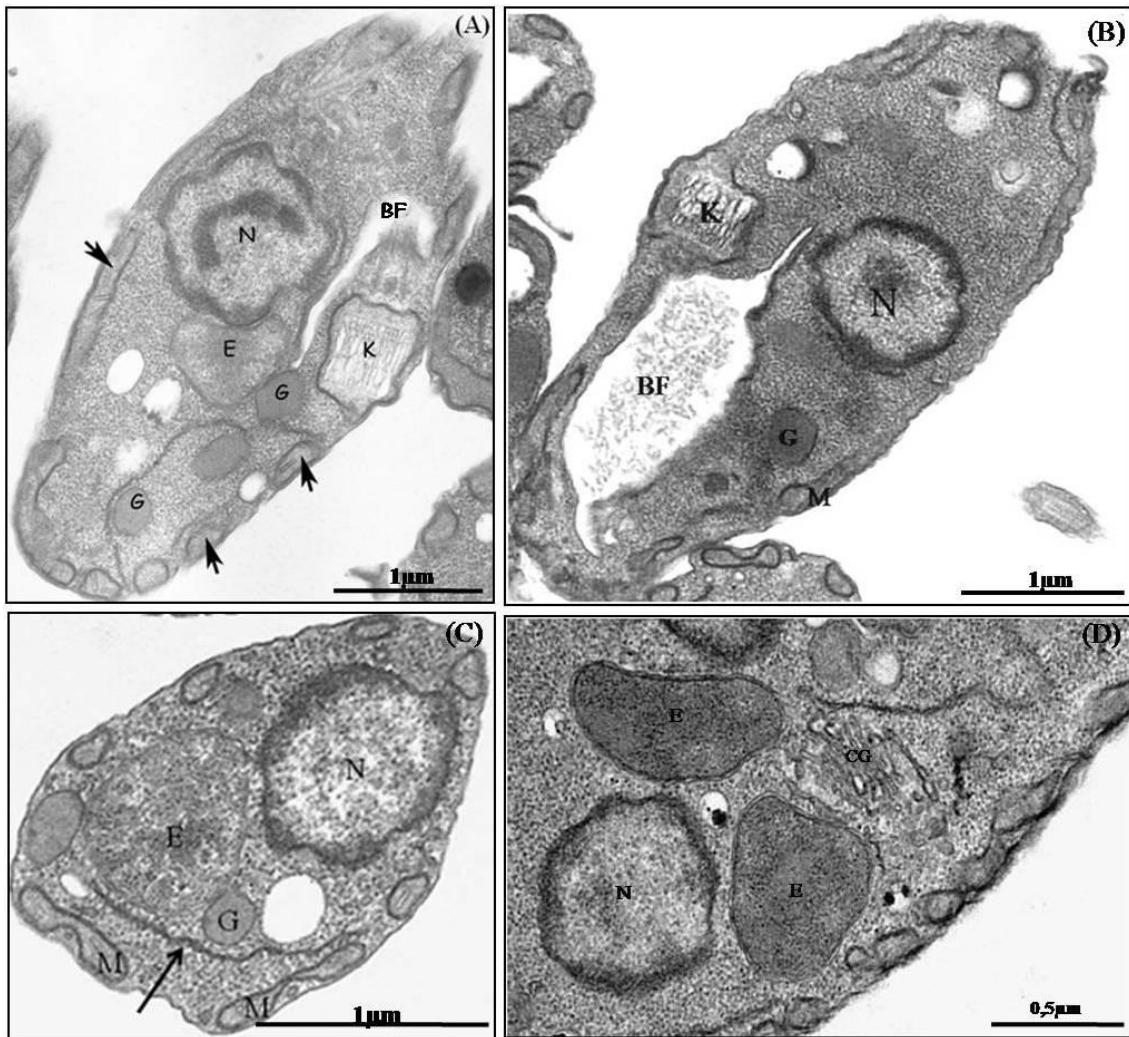


Figura 14: Ultraestrutura de *Crithidia deanei* normal (células controle), em (A), (C) e (D). Em (B) célula curada. Imagens de MET, em que são indicados: endosimbionte (E), bolsa flagelar (BF), cinetoplasto (K), glicosomos (G), mitocôndria (M) e núcleo (N). As setas curtas indicam os ramos mitocôndriais e a seta longa o retículo endoplasmático. Notar a proximidade do simbionte em relação ao núcleo, glicosomos (A e C) e ao complexo de Golgi e retículo endoplasmático (C e D).

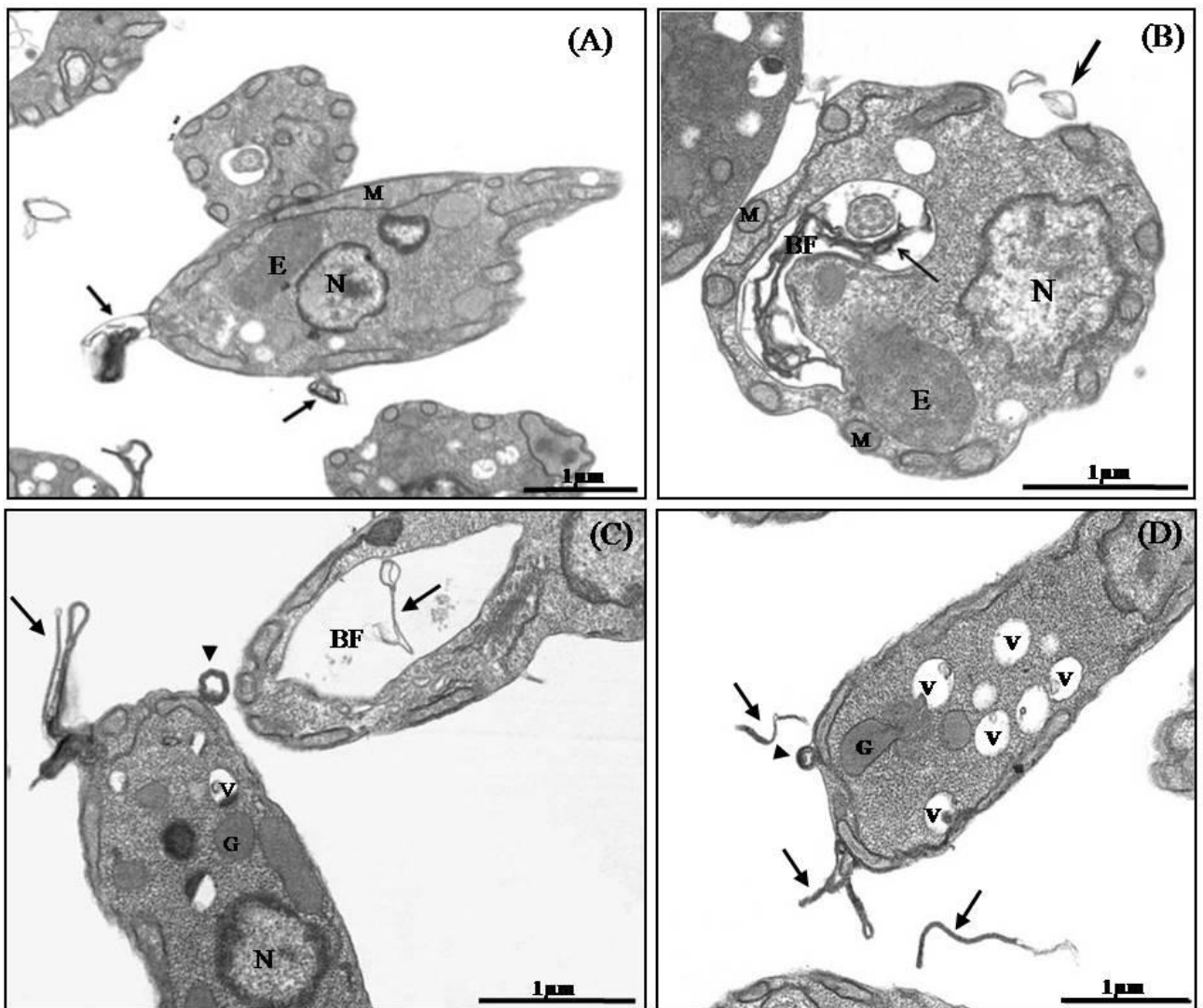


Figura 15: *C. deanei*, cepa normal, tratada com 25 μ M de miltefosina em (A), e 75 μ M em (B) após 24 h. Em (C) e (D), imagens da cepa curada tratada com 25 μ M por 24 h. Observar o “shedding” (indicado pelas setas) e “blebbing” (indicado pela ponta de seta) de membrana plasmática em (A), (B) e (C) e os perfis de membrana na bolsa flagelar (indicados pela seta fina em B) e de “shedding” da membrana plasmática (indicado pela seta grande) (B). Endosimbionte (E), bolsa flagelar (BF), glicosomos (G), mitocôndria (M), núcleo (N), vacúolo (V).

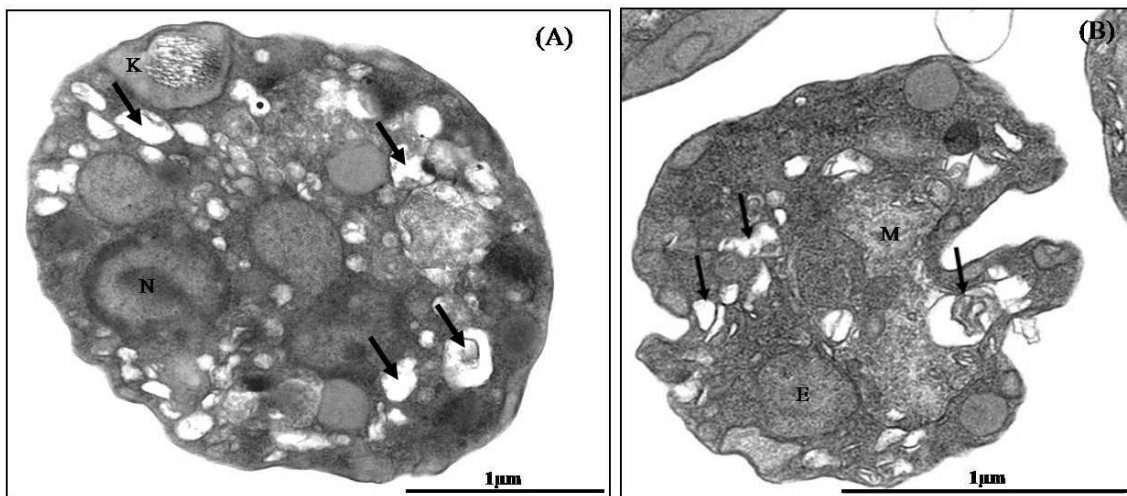


Figura 16: *C.deanei*, cepa normal, tratada com 100 μ M da droga por 24h, onde se observa inchaço mitocondrial e intensa vacuolização (setas). Endosimbionte (E), cinetoplasto (K), mitocôndria (M), núcleo (N).

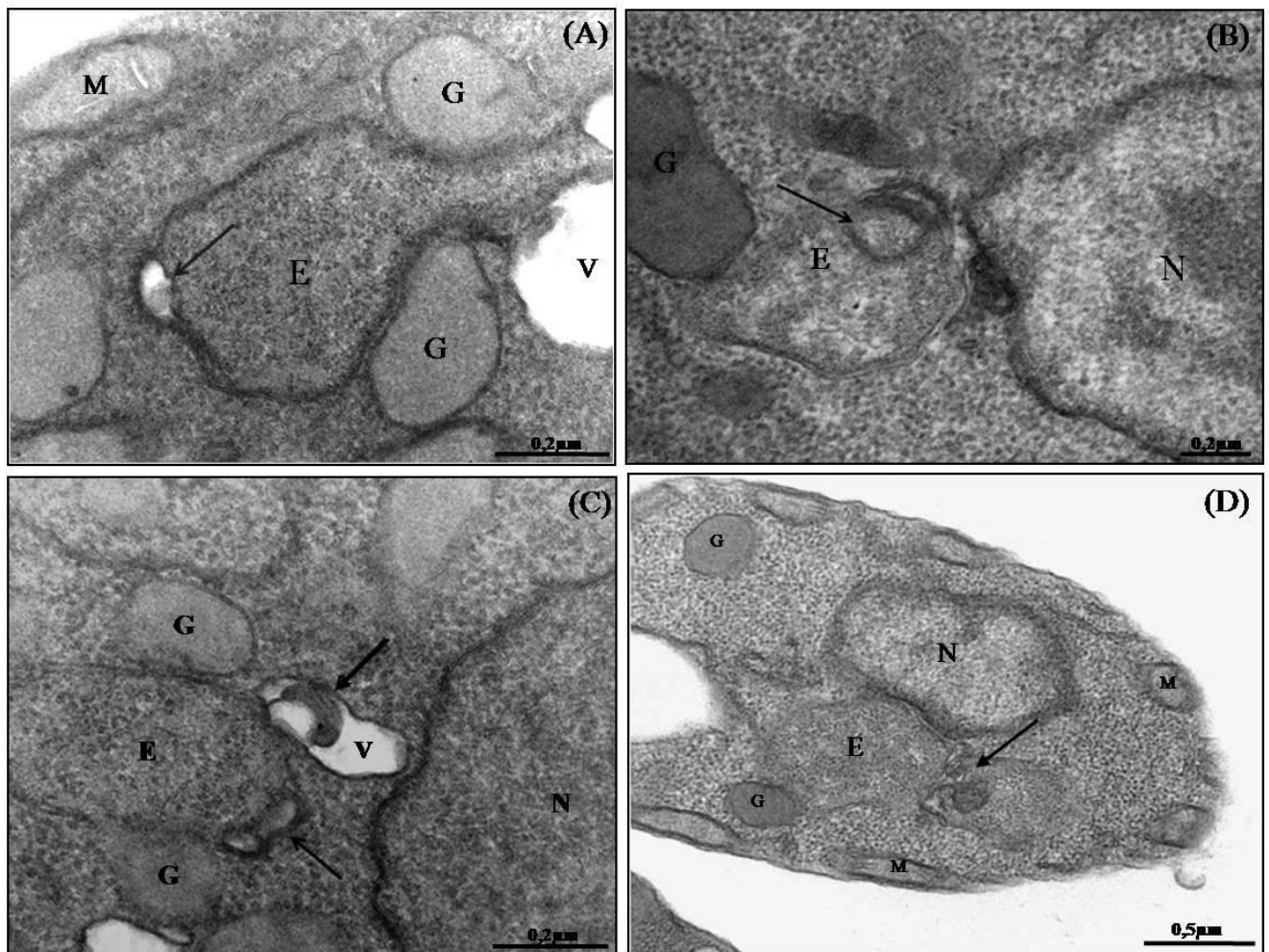


Figura 17: Cepa normal de *Crithidia deanei*, tratadas com 25 μM de miltefosina de (A) à (C) e 75 μM em (D), por 24 h. Observar na figura (A) o afastamento entre as duas membranas que compõem o envoltório do endosimbionte (seta). Notar na figura C que parte do envoltório da bactéria simbiótica, encontra-se no interior de um vacúolo (seta maior). Endosimbionte (E), bolsa flagelar (BF), glicosomos (G), mitocôndria (M), núcleo (N), vacúolo (V).

4.3 Efeitos da Miltefosina na Composição Fosfolipídica de *Crithidia deanei* e nas Frações de Simbionte e Mitocôndria

Verificamos o efeito da droga em até 36 horas de tratamento, tempo que equivale à fase exponencial de crescimento. A miltefosina apresentou variados efeitos na síntese fosfolipídica de *C.deanei*, tanto em relação às concentrações da droga utilizadas, quanto aos tempos analisados. Após tratamento por 24 h com a concentração de 10 μM , a síntese de PC sofreu uma redução de 23 % e PE redução de 26 %, em relação as células controle (Figura 18). Após 36 h de cultivo nesta mesma concentração, os protozoários apresentaram síntese de PI aumentada em 21 %, enquanto os valores de PC e PE praticamente não foram alterados (Figura 19). Após 48 h de tratamento, houve queda de 16 % na produção de PC e a manutenção dos níveis de PE, enquanto PI sofreu aumento de 23 % em sua síntese (Figura 20).

As alterações mais marcantes na síntese de PI foram observadas nos tempos de 24 h e 48 h em células tratadas com 25 μM de miltefosina, quando houve um aumento de 39 % e 41 % deste fosfolipídio, respectivamente (Figuras 18 e 20). Do mesmo modo, PC e PE tiveram um aumento de 49 % e 94 %, respectivamente, em protozoários tratados com 25 μM por 36 h (Figura 19). É importante destacar que a CL teve um aumento de 139 %, nestas condições.

A concentração mais alta utilizada (50 μM), não alterou tanto a síntese fosfolipídica, quando comparada à concentração de 25 μM , nos tempos de 24, 36 e 48 h (Figuras 18, 19 e 20). Neste caso, as alterações mais significativas foram observadas no tempo de 36 h, quando houve aumento de 32 % de PE e a manutenção dos níveis de PC (Figura 19). Já em 48 h, houve aumento de 15 % de PC, 25 % de PE, 30 % de PI e 29 % de CL (Figura 20).

É interessante verificar que no tempo de 24 h, a concentração de 10 μM de miltefosina foi a que levou as maiores quedas na síntese de PC e PE (23 % e 26 %, respectivamente). Por outro lado, a concentração de 25 μM no tempo de 36 h aumentou em cerca de 2 vezes a síntese de PC e PE, quando comparados aos valores destes fosfolipídios em protozoários tratados com 10 μM de miltefosina pelo mesmo tempo.

Outro fato que deve ser destacado é o aumento de PI em todas as situações analisadas, exceto naquelas relativas aos tempos de 24 h e de 36 h, de células tratadas com 50 μM de miltefosina, em que os valores desses fosfolipídios não foram alterados.

As frações purificadas de simbiote e mitocôndria, obtidas de células tratadas com 10 μM de miltefosina por 24 h, também apresentaram alterações na síntese de fosfolipídios (Figura 21). Tanto nas frações de simbiote, quanto nas de mitocôndria, houve queda na produção de todos os fosfolipídios, exceto a CL nas frações de simbiote e a PE nas frações de mitocôndria, que se mantiveram inalteradas. No caso do simbiote, PC, PE e PI tiveram queda de 23 %, 38 %, 25 %, respectivamente (Figura 21). Já a mitocôndria, apresentou queda na formação de PC, PI e CL equivalente a 64 %, 52 % e 63 %, respectivamente (Figura 21).

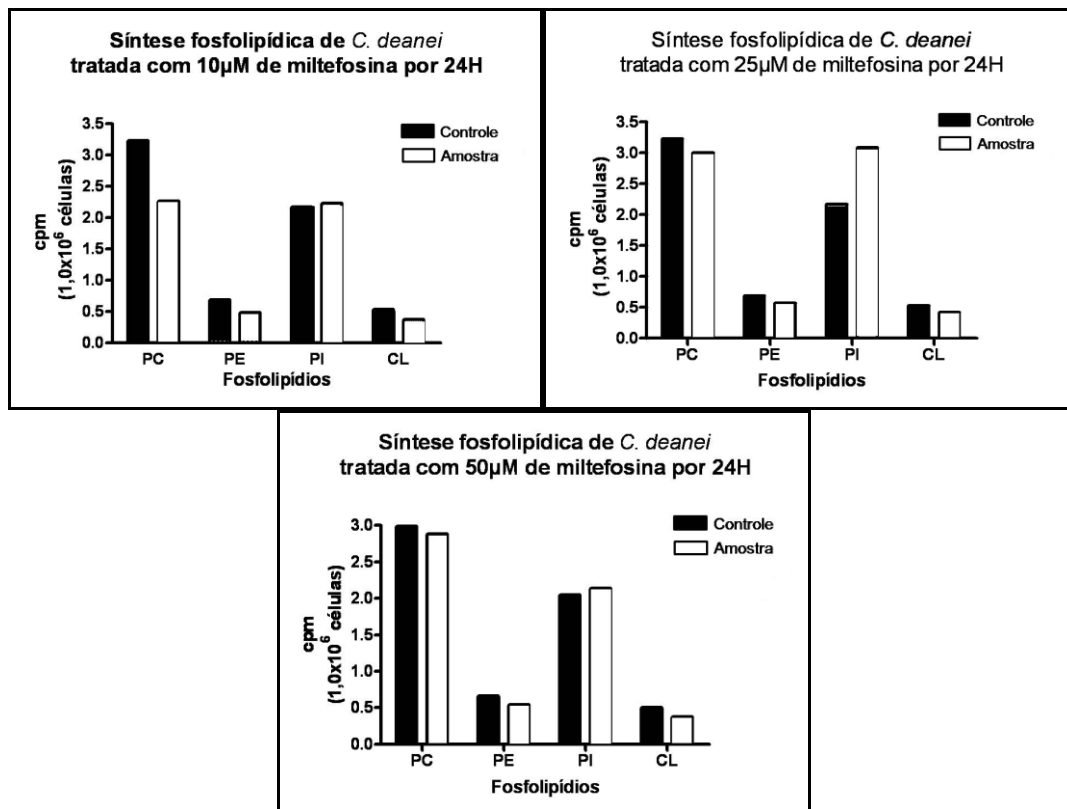


Figura 18: Os valores representados no eixo y correspondem às cintilações por minuto referente a $1,0 \times 10^6$ células. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

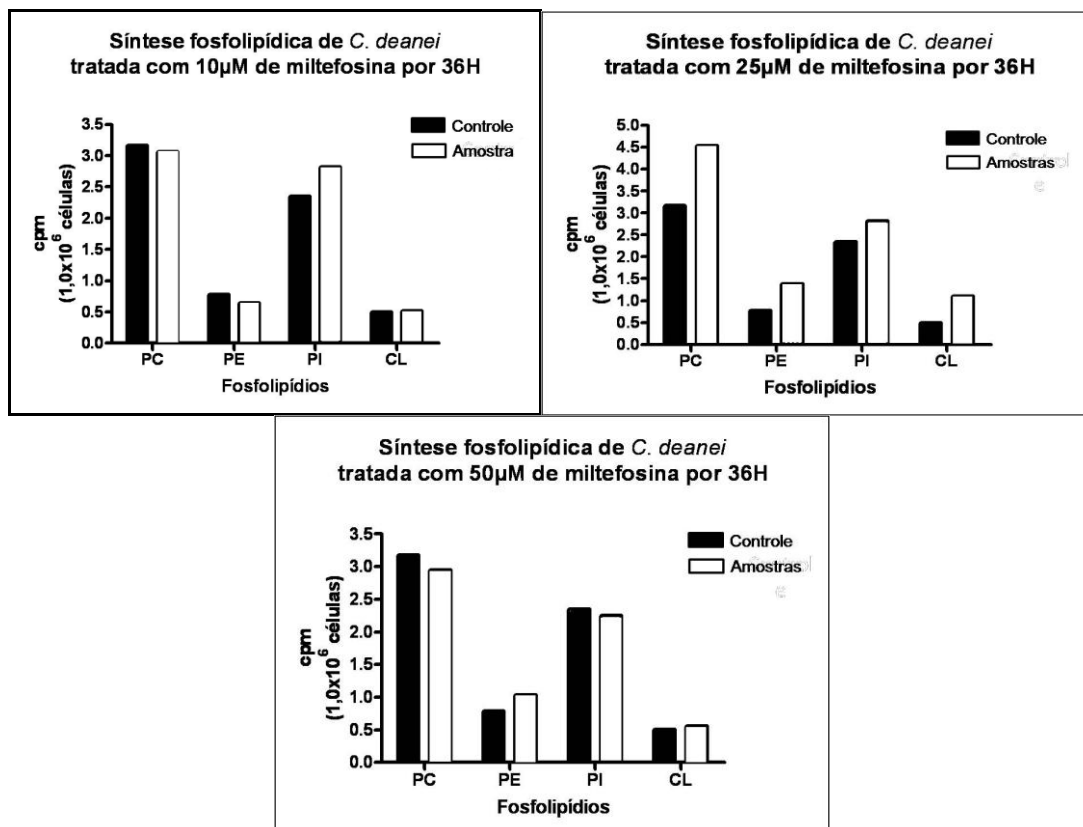


Figura 19: Os valores representados no eixo y correspondem às cintilações por minuto referente a $1,0 \times 10^6$ células. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

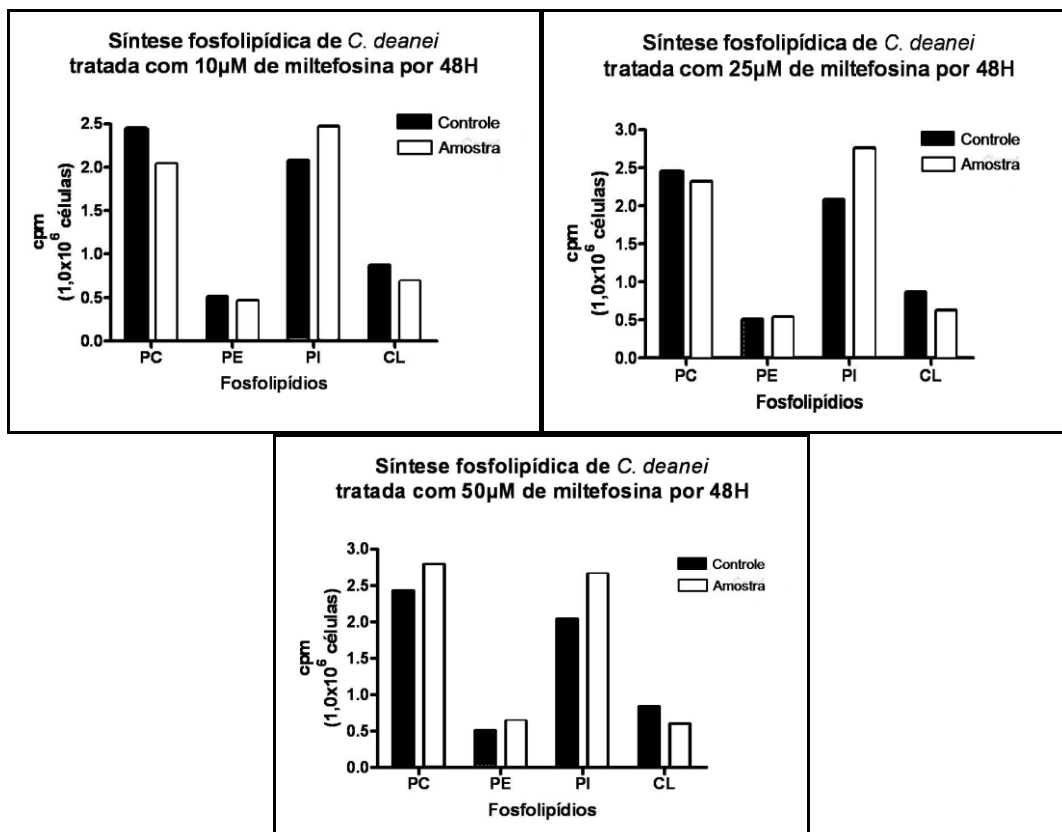


Figura 20: Os valores representados no eixo y correspondem às cintilações por minuto referente a $1,0 \times 10^6$ células. Resultados representativos de 2 experimentos independentes.

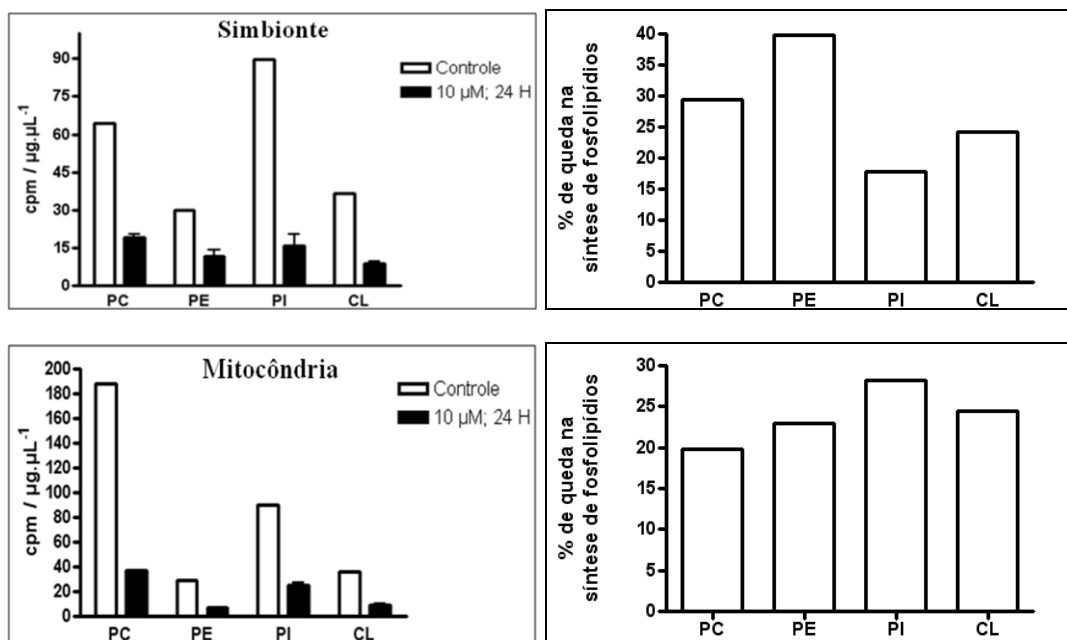


Figura 21: Alterações fosfolipídicas de frações enriquecidas de simbiote e mitocôndria. Os dois gráficos superiores se referem às amostras de simbiotes isolados de células tratadas por 24h com 10μM de miltefosina e 10μCi de ³²Pi. Os dois gráficos inferiores se referem aos resultados das frações de mitocôndria obtidas das mesmas células utilizadas para obtenção das frações de simbiotes. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

5. Discussão

Segundo Lewin (1982) simbiose é uma palavra de origem grega que significa viver juntos. Quando o organismo simbiote e seu respectivo hospedeiro se beneficiam a tal ponto de não poderem viver isoladamente, há uma simbiose mutualística (DOUGLAS, 1994). *Crithidia deanei* possui uma bactéria simbiótica em seu citoplasma que mantém uma relação mutualística com seu hospedeiro, em que o procarioto fecha vários ciclos metabólicos essenciais, do ponto de vista nutricional, com o protozoário (MUNDIM *et al.*, 1974; CHANG *et al.*, 1975; CAMARGO *et al.*, 1977; GALINARI *et al.*, 1978; SALZMAN *et al.*, 1985). Em contrapartida, o simbiote parece beneficiar-se com a produção de ATP via glicosomos da célula hospedeira (MOTTA *et al.*, 1997). Além disso, mostramos que a bactéria simbiótica de *Crithidia deanei* possui fosfatidilcolina (PC) em seu envoltório, sugerindo que parte deste fosfolípídeo pode ser obtido, através de trocas metabólicas com o protozoário hospedeiro (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.*, 2006; AZEVEDO-MARTINS *et al.*, 2007).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um alquil-lisofosfolípídeo utilizado no tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, tais como a leishmaniose visceral e cutânea (SUNDAR *et al.*, 2000; SOTO *et al.*, 2006). Os mecanismos de ação da miltefosina e de outros análogos de lisofosfolípídios foram propostos por vários trabalhos (revisto por URBINA 2006). Os dados da literatura indicam que em células de mamífero, a miltefosina atua sobre a enzima fosfocolinacitidiltransferase, inibindo a síntese de PC através da via de Kennedy (GEILEN *et al.*, 1992; WIEDER *et al.*, 1995). No presente trabalho, utilizamos a miltefosina com o objetivo de perturbar a relação mutualística, a nível metabólico, entre o protozoário e sua bactéria simbiótica. Nossos dados mostraram que a miltefosina tem

efeito não só na proliferação celular de *C.deanei* e em sua ultraestrutura, como também na produção de PC, PE, CL e PI. Além disso, a composição fosfolipídica de frações de simbiontes e mitocôndrias, também se mostrou alterada, após o tratamento com a droga. Ensaio anteriores mostraram que o 22,26-azasterol, um inibidor da via de síntese de esteróis e também da produção de fosfolipídeos, foi capaz de alterar a síntese de ergosterol em *C. deanei* e também de inibir a síntese de PC a partir de PE, provavelmente pela via de Greenberg (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.* 2006).

Assim como a miltefosina, outros derivados de alquil-lisofosfolipídios como a edelfosina vêm sendo utilizados em tripanosomatídeos causadores de doenças. Nas formas promastigotas de *Leishmania mexicana*, por exemplo, a miltefosina e a edelfosina causaram perturbações no metabolismo de éter-lipídios (pela inibição do metabolismo de fosfolipídios), e na transdução de sinais (LUX *et al.*, 1996). Além disso, essas drogas inibiram, de maneira dose dependente, a ação de enzimas específicas encontradas nos glicosomos e que são responsáveis pelo remodelamento lipídico (LUX *et al.*, 2000). Ensaio comparativos feitos com miltefosina, edelfosina e ilmofosina (outro derivado de alquil-lisofosfolipídios) em *Leishmania donovani*, *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* mostraram que estes três compostos inibem a proliferação celular destes tripanosomatídeos (CROFT *et al.*, 1987; 1993 and 1996; LIRA *et al.*, 2001; SANTA-RITA *et al.*, 2004, AZZOUZ *et al.*, 2005). Além disso, estas drogas foram capazes de inibir a síntese de DNA, RNA e proteínas na forma promastigota de *Leishmania donovani* (AZZOUZ, *et al.*, 2005).

A proliferação celular de *C.deanei* foi afetada de forma dose-dependente pela ação da miltefosina. Em concentrações mais altas, como a de 100 µM, a inibição na proliferação foi de 64 % já nas primeiras 12 h de tratamento e de 80 %, nas primeiras 24 h de tratamento. A queda na proliferação destes protozoários, após o uso de elevada

concentração da droga, pode estar relacionado à inibição da síntese de RNA, entre outros fatores. Azzouz e colaboradores (2005) descreveram um forte efeito da inibição de síntese de RNA em formas promastigotas de *Leishmania donovani* após tratamento com 95 μM de miltefosina por 30 minutos. Por outro lado, não se pode descartar a possibilidade da inibição da síntese de PC e de esfingomielina, uma vez que estas vias estão interligadas (WEIDER *et al.*, 1999). Há relatos de que a diminuição da síntese de PC pode promover a diminuição da síntese de esfingomielina e o concomitante aumento de ceramida, que está envolvida em eventos apoptóticos (HAMPTON AND MORAND, 1989; HANNUN AND OBEID, 1995; WEIDER *et al.*, 1999). Por outro lado, é interessante destacar que em concentrações mais baixas como 10 μM e 25 μM as quedas na proliferação celular não passaram de 24 %, mesmo após 36 h de tratamento. A inibição da proliferação promovida por esta droga na cepa curada de *C.deanei* foi menos acentuada quando comparada a da cepa normal. A maior inibição nos protozoários aposimbóticos foi de 52 %, após 48 h tratamento com 100 μM de miltefosina. Este resultado pode estar relacionado ao fato da cepa portadora de simbionte apresentar metabolismo mais acelerado e menor tempo de geração (MUNDIM *et al.* 1977).

A microscopia eletrônica de transmissão de *Crithidia deanei* mostra células com a ultraestrutura característica, revelando a presença da bactéria simbiótica próxima ao núcleo e aos glicosomos do protozoário hospedeiro. Já as células tratadas com miltefosina, inclusive as da cepa curada, apresentaram alterações ultraestruturais como “blebbing” e “shedding” de membrana plasmática, perfis de membrana na bolsa flagelar e inchaço da mitocôndria e de suas cristas. Tais alterações foram anteriormente descritas para outros protozoários desta família (SANTA-RITA *et al.*, 2000, 2004, 2005). Além disso, o endosimbionte também foi afetado pela ação da droga, já que observamos

convoluções e perda de membrana em seu envoltório. As alterações observadas na membrana plasmática e naquelas que compõem o envoltório do simbionte, podem estar diretamente relacionadas à mudança da composição fosfolipídica dos protozoários submetidos ao tratamento com a miltefosina. É necessário considerar a ação desta droga sobre PC, um fosfolípideo com marcante papel estrutural, sobre PI, que assim como PC é um fosfolípido com importante papel na sinalização celular, e também em outros fosfolípidos. Neste contexto, as alterações na síntese de fosfolípidos, assim como na produção de CDP-diacilglicerol, poderiam promover a instabilidade de membranas e das proteínas nela inseridas (BERRIDGE, 1987, ZINSER *et al.*, 1991). Contribuem para a aceitação desta idéia, os efeitos da miltefosina na enzima Na^+ ATPase e proteína cinase C (PKC) de *Trypanosoma cruzi*, que apresentam redução da atividade após tratamento com a droga (Saraiva *et al.* 2009).

Crithidia deanei apresentou alterações na síntese fosfolipídica após tratamentos com a miltefosina. Após 24 h de tratamento com 10 μM desta droga, houve a redução da síntese de PC (queda de 23 %) e de PE (queda de 26 %), no entanto após 36 h de tratamento nesta mesma concentração houve a manutenção dos níveis de síntese de PC e queda de 19 % na síntese de PE. No primeiro caso, se acreditarmos que o protozoário possui apenas a via das metilações, a queda na formação de PC pode estar relacionada à redução da síntese de PE. Por outro lado, caso o protozoário apresente também a via de Kennedy, a diminuição da síntese de PC pode estar ligada à inibição da fosfocolinacitidililtransferase (CCT). Já no segundo caso, a queda na síntese de PE pode ser resultado de sua transformação em PC, cujo nível é mantido semelhante ao das células controle. Precisamos considerar neste caso, a importância de PC na célula eucariota. Lira e colaboradores (2001) observaram queda na síntese de PC e aumento na síntese de PE, após a administração de miltefosina 1 μM por 120 h em formas

epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, sugerindo uma inibição da via de Greenberg nestes protozoários. Resultado semelhante, foi observado após o tratamento de *C. deanei* com o 22,26-azasterol (PALMIÉ-PEIXOTO *et al.* 2006).

É interessante destacar, que diferentemente dos outros fosfolipídios analisados, a síntese de PI mostrou-se aumentada ou mantida, em protozoários tratados com miltefosina em diferentes tempos e concentrações. Células tratadas com 25 μM por 36 h apresentaram aumento na síntese de PI e de todos os outros fosfolipídios analisados. Já o tratamento prolongado com doses mais elevadas (50 μM), manteve os níveis de PI mais altos, enquanto o de PC tornou-se similar ao das células controle. PI é um fosfolipídio de membrana que pode sofrer fosforilações pela ação das enzimas fosfatidilinositol cinase e fosfatidilinositol fosfocinase, havendo formação de vários fosfoinositídeos (BALLA, 2001). Um destes fosfoinositídeos gerados é o fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, que pode ser hidrolisado por fosfolipases C (PLC) ativadas por receptores de membrana. Desta reação resultam segundos mensageiros como o inositol 1,4,5-trifosfato e o diacilglicerol (DAG) (BALLA, 2001). O inositol 1,4,5-trifosfato pode atuar em vias de sinalização através do aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular, já o DAG é capaz de regular diferentes vias celulares através da ativação de proteínas cinase C (PKC) (BERRIDGE, 1987; BALLA, 2001). Pawelczyk e Lowenstein (1993) demonstraram a inibição de fosfolipase C (PLC) pela miltefosina, resultando em inibição indireta da ativação de proteína cinase C (PKC) pela redução de DAG. Segundo Weider e colaboradores (1999), a inibição da PKC e conseqüente redução do crescimento celular promovido pela miltefosina, parecem depender do quão essencial é esta proteína para a proliferação de cada tipo celular, além da especificidade da ação destes análogos de fosfolipídios a distintas PKC.

Várias organelas atuam na biossíntese de fosfolipídios, como o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi e a mitocôndria. A mitocôndria responde pela síntese de níveis significantes de fosfolipídios, tais como ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e cardiolipina (MEER *et al.*, 2008). No presente trabalho, mostramos que frações de mitocôndria obtidas de protozoários tratados com 10 μM de miltefosina por 24 h apresentaram diminuição da síntese ou da reciclagem dos fosfolipídios analisados: houve queda de PC, PI, PE e CL. Foi reportado em *Leishmania donovani* que a miltefosina é capaz de inibir a atividade da citocromo C oxidase, possivelmente por mudanças da composição lipídica que afetariam a conformação da enzima (LUQUE-ORTEGA AND RIVAS 2007). Este relato explicaria parcialmente a queda na síntese de CL que observamos no presente trabalho, uma vez que as enzimas da biossíntese deste fosfolipídio encontram-se na membrana interna da organela (SCHLAME *et al.*, 2000).

O endosimbionte de *C. deanei* é capaz de sintetizar fosfolipídios independentemente do protozoário mesmo após 3 h de fracionamento, entretanto, a composição fosfolipídica é modificada, já que PE é o fosfolipídio majoritariamente produzido, enquanto PC é encontrada em menores concentrações. Estes dados sugerem certa autonomia da bactéria simbiótica quanto à síntese fosfolipídica, no entanto a dependência do aporte de PC a partir do protozoário hospedeiro torna-se evidente. Em contrapartida, as frações de mitocôndria não são capazes de sintetizar fosfolipídios (AZEVEDO-MARTINS *et al.*, 2007). Neste estudo, mostramos que frações de simbiote obtidas de protozoários tratados com 10 μM de miltefosina por 24 h apresentaram queda na síntese de PC, PE, PI e CL.

Acreditava-se que a única via para a síntese de PC em procariotos era a das metilações (via de Greenberg) (ROCK *et al.*, 1996). Em 1997, Rudder e colaboradores

publicaram um trabalho em que mutantes de *Rhizobium meliloti*, deficientes da enzima *N*-metiltransferase, ainda continham fosfatidilcolina. Dois anos depois, este grupo descreveu a presença de uma segunda via de biossíntese de PC envolvendo uma nova atividade enzimática, a da enzima fosfatidilcolina sintase, capaz de formar PC diretamente de colina e de CDP-diacilglicerol (RUDDER *et al.*, 1999; LÓPEZ-LARA AND GEIGER, 2001; MARTÍNEZ-MORALES *et al.*, 2003). A atividade da PC sintase foi observada em outras bactérias tais como no simbiote *Bradyrhizobium japonicum* e nas bactérias patogênicas *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila* e *Borrelia burgdorferi* (MARTÍNEZ-MORALES *et al.*, 2003). Estudos recentes envolvendo bactérias patogênicas intracelulares facultativas como as do gênero *Brucella*, têm mostrado que estes procaríotos são capazes de sintetizar PC única e exclusivamente pela via da PC sintase (COMERCI *et al.*, 2006, WILDERMAN *et al.*, 2002; SHERR AND LAW, 1965; WANG *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-MORALES *et al.*, 2003). Consultas ao genoma do endosimbionte de *C. deanei*, não revelaram a presença de seqüência envolvida na síntese da PC sintase ou de enzimas da via de Greenberg (FREITAS-JUNIOR *et al.* 2008). Neste caso, devemos considerar a perda dos genes que codificam enzimas que participam da síntese de PC, já que adaptações fisiológicas em relações mutualistas envolvem dramáticas reduções do conteúdo genômico (GOEBEL AND GROSS, 2001; CORSARO *et al.*, 1999).

Ressalto novamente o efeito da miltefosina na composição fosfolipídica, especialmente pela inibição da síntese de PC. Isto porque, há vários relatos na literatura mostrando a importância de PC para o estabelecimento de relações simbióticas. Minder e colaboradores (2001) mostraram a importância da síntese de PC para a manutenção da simbiose de *Bradyrhizobium japonicum* com plantas leguminosas. Neste caso, eles observaram uma redução no número de bactérias mutantes, que não apresentam o gene

da metiltransferase, nas raízes das plantas quando comparadas às células de cepas selvagens. Neste contexto, discute-se a participação de PC na formação de oligossacarídeos cíclicos importantes para a manutenção osmótica dessas bactérias, que passam a viver livres no citoplasma do hospedeiro (MINDER *et. al.*, 2001). Além disso, *Rhodobacter sphaeroides*, uma bactéria fotossintética, necessita de PC para a formação de complexos intracitoplasmáticos de membrana e para a correta montagem de complexos ligados à fotossíntese (EUI-JIN *et al.*, 2007).

A mitocôndria e o endosimbionte de protozoários tratados com a droga também foram afetados. As alterações da composição fosfolipídica indicam a presença de uma via de síntese de PC, que é alternativa a via de Greenberg e reforça a idéia de que existe uma intensa troca metabólica entre o protozoário e as estruturas de origem simbiótica.

6 Conclusões

- O tratamento de *Crithidia deanei* com miltefosina promoveu queda na proliferação celular tanto na cepa normal quanto na cepa curada, especialmente quando concentrações mais elevadas da droga foram utilizadas.
- A miltefosina promoveu alterações ultraestruturais em ambas cepas de *C. deanei*: a membrana plasmática foi afetada, assim como as membranas que compõem o envoltório do endosimbionte. Perfis de membrana foram flagrados na bolsa flagelar e foi observado também inchaço mitocondrial. Maiores concentrações da droga promoveram acentuada vacuolização celular. Estes efeitos podem estar relacionados à mudança na composição fosfolipídica do protozoário, após tratamento com a droga.
- Análises bioquímicas mostraram modificações na composição fosfolipídica de *C. deanei* após tratamento com a miltefosina. No entanto, não houve queda na síntese de PI, mas sim na formação de PC, PE e CL. As frações de mitocôndria obtidas de células tratadas com miltefosina apresentaram queda na síntese de PC, PE, PI e CL.
- Endosimbiontes isolados de protozoários tratados com miltefosina mostraram menor produção de PC, PI, PE e CL.
- Considerados em conjunto, os resultados indicam que a miltefosina foi capaz de alterar a síntese fosfolipídica de *C. deanei*, que parece possuir uma via alternativa à das metilações para a síntese de PC. Além disso, observamos que alterações no metabolismo lipídico de *C. deanei* estão diretamente relacionadas à composição fosfolipídica da mitocôndria e do endosimbionte, reforçando a idéia de que intensas trocas metabólicas ocorrem entre o protozoário hospedeiro e as estruturas de origem simbiótica.

7. Bibliografia

- ABELO, S.T. AND SOMENECH, C.E. Carbons from choline present in the phospholipid of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiology Letters. 156: 271-274. 1997.
- ACHTERBERG, V AND GERCKEN, G., Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. Mol Biochem Parasitol. 23: 117-22, 1987.
- ALFIERI, S.C., CAMARGO, E.P. Trypanosomatidae: isoleucine requirement and threonine deaminase in species with and without endosymbionts. Exp. Parasitol. **53**: 371-380, 1982.
- ANDRADE, I.S., PROBST, C.M., KRIEGER, M.A., DE SOUZA, W., MOHANABORGES, R., MOTTA, M.C.M. The presence of a porin-like protein reveals the origin of the endosymbiont envelope in *Crithidia deanei*. Annals of the XXXVII Annual Meeting of SBBq. BM059, 2008
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W., LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**: 403-10.
- ARDAIL, D., PRIVAT, J.P., EGRET-CHARLIER, M., LEVRAT, C., LERME, F. AND LOUISOT, P. Mitochondrial contact sites lipid composition and dynamics. The Journal of Biological Chemistry. 265(31): 18797-18802, 1990.
- ARONDEL, V., BENNING, C AND SOMERVILLE, C.R. Isolation and functional expression in *Escherichia coli*, of a gene encoding phosphatidylethanolamine methyltransferase (EC 2.1.1.17) from *Rhodobacter sphaeroides*. J. Biol. Chem. 268: 16002-16008, 1993.
- AZEVEDO-MARTINS, A.C., FROSSARD, M.L., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. AND MOTTA, M.C.M. Phosphatidylcholine synthesis in *Crithidia*

deanei: the influence of the endosymbiont. FEMS Microbiol Lett. 275: 229-236, 2007.

AZEVED-MARTINS, A.C. **Síntese de fosfatidilcolina em *Crithidia deanei*: a influência do endosimbionte.** Rio de Janeiro. UFRJ, 2008, 85p. Tese – Mestrado em Ciências biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

AZZOUZ, S., MAACHE, M., GARCIA, R.G. AND OSUNA, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. Pharmacology AND Toxicology. 96: 60-65, 2005).

BAKKER, B.M., MENSONIDES, F.C., TEUSINK, B., HOEK, P.V., MICHELS, P.A.M. AND WESTERHOFT, WESTERHOFT, H.V. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. PNAS. 97(5): 2087-2092, 1999.

BALLA, T. Pharmacology of phosphoinositides, regulators of multiple cellular functions. Current Pharmaceutical Desingn. 7: 475-507, 2001.

BARON, S., PEAKE, R.C., JAMES, D.A., SUSMAN, M., KENNEDY, C.A., SINGLETON, M.J.D., SCHUENKE, S. Hemoflagellates. In: Medical Microbiol. 4th ed. – sec. 4, 1996.

BASTIN P, MATTHEWS, KR AND GULL, K. The paraflagellar rod of kinetoplastida solved and unsolved questions. Parasitol. Today. 12: 302-307, 1996-a.

BASTIN P AND GULL, K. Assembly and function of complex flagellar structures illustrated by the paraflagellar rod of Trypanosomes. Protist. 150: 113-123, 1996-B.

- BELISLE, J.T., BRANDT, M.E., RADOLF, J.D. AND NORGDARD, M.V. Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. J. Bacteriol. 176: 2151-2157. 1994.
- BENNING, C. A role lipid trafficking in chloroplast biogenesis. Progress in Lipid Research. 47: 381-389, 2008.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. Ann. Rev. Biochem. 56: 159-93, 1987.
- BERKOVIC, D., BERKOVIC, K., BINDER, C., HAASE, D. AND FLEER, E.A.M. Hexadecylphosphocholine does not influence phospholipase D and sphingomyelinase activity in human leukemia cells. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology. 2: 213-218, 2002.
- BEROVIC, D. GOECKENJAN, M. LÜDERS, S., HIDDMANN, W., FLEER, E.A.M. Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylinositol and phosphatidylcholine specific phospholipase C in human leukemia cells. J. Exp. Ther. Oncol. 1: 302-11. 1996.
- BERKOVIC, D., BERKOVIC, K., BINDER, C., HAASE, D. AND FLEER, E.A.M. Hexadecylphosphocholine does not influence phospholipase D and sphingomyelinase activity in human leukemia cells. Journal of Experimental Therapeutics and Oncology. 2: 213-218. 2002.
- BLITTERSWIJK, W.J.V. AND VERHEIJ, M. Anticancer alkylphospholipids: Mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. Current Pharmaceutical Design. 14: 2061-2074, 2008.
- BOZZOLA, J.J. AND RUSSEL, L.D. Electron microscopy, principles and techniques for biologists. Jones and Bartlett Publi., Boston. 1992.

- BRACHWITZ, H. AND VOLLGRAF, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. Pharmacology and Therapeutics. 66: 39-82, 1995.
- BRUM DA SILVEIRA, F.L., CAVALCANTI, D.P., DE SOUZA, W., SCHENKMAN, S. ELIAS, M.C., MOTTA, M.C.M. Division synchrony between the symbiotic bacterium, the nucleus and the kinetoplast of trypanosomatids, Annals of the XXXV Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. **BC30**, 2008.
- CABEEN, M.T., JACOBS-WAGNER, C., Bacterial cell shape. Nat. Rev. Microbiol. **3**: 601-10, 2005.
- CAMARGO, E.P., FREYMÜLLER, E. Endosymbiont as supplier of ornithine carbamoyltransferase in a trypanosomatid. Nature. **270**: 52-3, 1977.
- CAMPBELL, D.A., THOMAS, S., STURM, N. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? Microbes Infect. 5: 1231-1240.
- CAVALCANTI, D.P., THIRY, M, DE SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. The kinetoplast ultrastructural organization of endosymbiont-bearing trypanosomatids as revealed by deep-etching, cytochemical and immunocytochemical analysis. Histochem. Cell Biol. (no prelo), 2008.
- CHANG, K.P.. Reduced growth of *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti* freed of intracellular symbiotes by chloramphenicol. J. Protozool.; 22:271-276, 1975.
- CHANG, K.P. Ultrastructure of symbiotic bacteria in normal and antibiotic-treated *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia oncopelti*. J. Protozool. **21**: 699-07, 1974.
- CHANG, KP AND TRAGER, W. Nutritional significance of symbiotic bacteria in two species of hemoflagellates. Science, 183: 531-532, 1974.
- COCKCROFT, S. Phospholipase D: regulation by GTPases and protein kinase C and physiological relevance. Prog. Lipid. Res. 35: 345-370, 1997.

- COLLEY, W.C.; SUNG, T.; ROLL, R. JENCO, J.; HAMMOND, S.M.;
ALTSHULLER, Y.; BAR-SAGI, D.; MORRIS, A.J.; FROHMAN, M.A.
Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory
properties that provokes cytoskeletal reorganization. Curr. Biol. 7: 191-201, 1997.
- COMERCI, D.J., ALTABE, S., DE MENDOZA, D., UGALDE, R.A. *Brucella abortus*
synthesizes phosphatidylcholine from choline provided by the host. J. Bacteriol.
188: 1929-34, 2006.
- CONTRERAS, L.M., VIVAS, J. AND URBINA, J.A. Altered lipid composition and
enzyme activities of plasma membranes from *Trypanosoma* (Schizotrypanum)
cruzi epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors.
Biochem Pharmacol. 53: 697-704, 1997.
- CORSARO, D., VENDITTI, D., PADULA, M. AND VALASSINA, M. Intracellular
life. Critical Reviews in Microbiology. 25(1): 39-79, 1999.
- CROFT, S.L., SEIFERT, K. AND DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of
phospholipid analogues. Molecular AND Biochemical Parasitology. 126: 165-172,
2003.
- CROFT, S.L.; SNOWDON, D. AND YARDLEY, V. The activities of four anticancer
alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and
Trypanosoma brucei. J. Antimicrob. Chemotherap. 38:1041-1047, 1996.
- CROFT, S.L.; NEAL, R.A.; THORNTON, E.A. AND HERRMANN, D.B.J.
Antileishmanial activity of ether phospholipids ilmofosine. Transact. Royal Soc.
Tropical Med. Hyg. 87:217-219, 1993.

- CROFT, S.L., NEAL, R.A., PENDERGAST, W., CHAN, J.H. The activity of alkyl phosphocholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochem Pharmacol. 36: 2633-6, 1987.
- CRONAN, J.E. Bacterial membrane lipids: Where do we stand? Annu. Rev. Microbiol. 57: 203-24, 2003.
- CUI, Z., HOUWELING, M. Phosphatidylcholine and cell death. Biochim. Biophys. Acta. 1585: 87-96, 2002.
- CUI, Z., VANCE, J.E., CHEN, M.H., VOELKER, D.R., VANCE, D.E. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. J. Biol. Chem. 268: 16655-16663, 1993.
- DE CASTRO, S.L., SANTA-RITA, R., URBINA, J.A., CROFT, S.L. Antiprotozoal lysophospholipid analogues: a comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. Mini. Revs. Med. Chem. 4:139-148, 2004.
- DE RUDDER, K.E., LÓPEZ-LARA, I.M., GEIGER, O. Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. Mol. Microbiol. 37: 763-72, 2000.
- DE RUDDER, K.E., SOHLENKAMP, C., GEIGER, O. Plant-exuded choline is used for rhizobial membrane lipids biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. J. Biol. Chem. 274: 20011-6, 1999.
- DE SOUZA, W., MOTTA, M.C.M. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiol. Letters 173: 1-8, 1999.
- DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid. Biol. Dis. 1: 3, 2002.

- DOCAMPO, R.; SCOTT, D.A.; VERCESI, A.E. AND MORENO, S.N.J. Intracellular Ca⁺⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. J. 310:1005-1012, 1995.
- DOCAMPO, R AND MORENO, NJ. The acidocalcisome. Mol. Biochem. Parasitol. 33:151-159, 2001.
- DOUGLAS, A.E. Symbiotic interactions. Oxford University Press. New York, 1994.
- DORNE, A.J., JOYARD, J., DOUCE, R. Do thylacoids really contain phosphatidylcholine? Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 71-74, 1990.
- DOWHAN, W. Molecular basis for membrane phospholipids diversity: Why are there so many lipids? Annu. Rev. Biochem. 66: 199-232, 1997.
- DU, Y., MASLOV, D.A., CHANG, K.P. Monophyletic origin of β -division proteobacterial endosymbionts and their coevolution with insect trypanosomatid protozoa *Blastocrithidia culicis* and *Crithidia* spp. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 8437-41, 1994a.
- DU, Y., MCLAUGHLIN, G., CHANG, K.P. 16S Ribosomal DNA Sequence identities of β -proteobacterial endosymbionts in three *Crithidia* species. J. Bacteriol. 176: 3081-4, 1994b.
- EINICKER-LAMAS, M., MALAQUIAS, A.T., CASTRO, S.L., SMITH, G.A., OLIVEIRA, M.M. Effects of fluorinated inositols on the phosphoinositide metabolism and the proliferation of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 85: 232-8, 1999.
- ERDMANN, R., VEENHUIS, M., KUNAU, W.H. Peroxisomes: organelles at the crossroads. Trends Cell Biol. 7: 400-407. 1997.

- ESCOBAR, P., YARDLEY, V. AND CROFT, S.L. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), Ambisome and sodium immunodeficient scid mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45:1872-1875, 2001.
- EXTON, J.H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys Acta.* 1212: 26-42, 1994.
- EXTON, J.H. Signalling through phosphatidylcholine breakdown. *The Journal of Biological Chemistry.* 265(1): 1-4, 1990.
- EUI-JIN, K, KIM, MI-SUN AND LEE, J.K. Phosphatidylcholine is requires for the formation of photosynthetic membrane and B800-850 light-harvesting complex in *Rhodobacter shaeroides*. *J.Microbiol Biotechnol.* 17(2): 373-377, 2007.
- FAMPA, P., CORRÊA-DA-SILVA, M.S., LIMA, D.C., OLIVEIRA, S.M.P., MOTTA, M.C.M, SARAIVA, E.M.B. Interaction of insect trypanosomatids with mosquitoes, sand fly and the respective insect cell lines. *Int. J. Parasitology.* 33: 1019-26, 2003.
- FARINA, M., ATTIAS, M. SOUTO-PADRON, T. AND DE SOUZA, W. Further studies on organization of paraxial rod of Trypanosomatids. *J. Protozool.* 33(4): 552-557, 1986.
- FARRÉ, J.C. AND SUBRAMANI, S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process of a versatile cell oraganelle. *Trends Cell Biol.* 14: 515-523. 2004.
- FLORIN-CHRISTENSEN, J., SUAREZ, C.E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., HINES, S.A., MCELWAIN, T.F., PALMER, G.H. Phosphatidylcholine formation is the predominant lipid biosynthetic event in the hemoparasite *Babesia bovis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 106: 147-56, 2000.

- FREITAS-JUNIOR, P.R.G., AZEVEDO-MARTINS, A.C.A., CAVALCANTI, D.P., CATA-PRETA, C.M.C., PROBST, C., KREIGER, M.A., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. AND MOTTA, M.C.M. Miltefosine as a tool to study phospholipid biosynthesis in endosymbiont-bearing trypanosomatids. Annals of the XXXVII Annual Meeting of SBBq. BQ-24, 2008
- FREYMÜLLER, E., CAMARGO, E.P. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbionts. J. Protozool. 28: 175-82, 1981.
- FROSSARD, M., SEABRA, S.H., DaMATTA, R.A., DE SOUZA, W., DE MELLO, F.G., MOTTA, M.C.M. An endosymbiont positively modulates ornithine decarboxylase in host trypanosomatids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 343: 443-9, 2006.
- GABALDÓN, T., HUYNEN, M.A. From endosymbiont to host-controlled organelle: the hijacking of mitochondrial protein synthesis and metabolism. Plos Computational Biology. (3) 2209-2218, 2007.
- GADELHA, C., WICKSTEAD, B., DE SOUZA, W., GULL, K., CUNHA-E-SILVA, N. Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. Eukariot. Cell. 4: 516-25, 2005.
- GALINARI, S. AND CAMARGO, E.P. Trypanosomatid protozoa: survey of acetylornithinase and ornithine acetyltransferase. Exp. Parasitol. 46: 277-282, 1978.
- GARDOCKI, M. E., JANI, N. AND LOPES, J.M. Phosphatidylinositol biosynthesis: Biochemistry and regulation. Biochemica et Biophysica Acta. 1735: 89-100. 2005.
- GEILEN, C., WEIDER, T AND REUTTER, W. Hexadecylphosphocholine inhibits translocation of CTP: choline-phosphate cytidyltransferase in Madin-Darby

- Canine kidney cells. The Journal of Biological Chemistry. 267 (10): 6719-6724, 1992.
- GOEBEL, W., GROSS, R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. TRENDS in Microbiology. 9(6): 267-273, 2001.
- GOLDFINE, H., JOHNSTON, N.C., BISHOP, D.G. Ether phospholipid asymmetry in *Clostridium butyricum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108: 1502-7, 1982.
- GONÇALVES, G.R., **Caracterização de proteínas da maquinaria de divisão do endossimbionte do protozoário tripanosomatídeo *Crithidia deanei***. Orientador: Stenio Perdigão Fragoso. Curitiba, 2008. 110 f. Dissertação. (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)-Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2008.
- GRAY, M.W., BURGER, G., LANG, B.F. Mitochondrial evolution. Science. 283: 1476-1481, 1999.
- GRAY, M.W., BURGER, G., LANG, B.F. The origin and early evolution of mitochondria. Genome Biol. 2: 1018.1-1018.5. 2001.
- GULL, K. The cytoskeleton of Trypanosomatid parasites. Annu Rev. Microbiol. 53:629-655, 1999.
- HAASE, R., WIEDER, T., GEILEN, C.C. AND REUTTER, W. The phospholipid analogue hexadecylphosphocholine biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. FEBS Lett. 288:129-132, 1991.
- HACKER, S., GÖDEKE, J., LINDEMANN, S.M., PESSI, G. AND NARBERHAUS, F. Global consequences of phosphatidylcholine reduction in *Bradyrhizbium japonicum*. Mol. Genet. Genomics. 280: 59-72, 2008.
- HAMPTON, R.Y. AND MORAND, O.H. Sphingomyelin synthase and PKC activation. Science. 246(4933): 1050, 1989.

- HANNAERT, V., BRINGAUD, F., OPPERDOES, F. AND MICHELS, P.A.M.
Evolution of energy metabolism and its compartmentation in kinetoplastida.
Kinetoplastid Biol. Dis. 2: 11-42, 1994.
- HANNUN, Y.A. AND OBEID, L.M. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis.
Elsevier Science. 20: 73-77, 1995.
- HAUGHAN, P.A., CHANCE, M.L. AND GOAD, L. Effects of an azasterol inhibitor of
24-transmethylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani*
promastigotes. Biochem. J. 308: 31-38, 1995.
- HERBY, O., PERSSON, L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic
cells. Trends Biochem. Sci. 15: 153-8, 1990.
- HINDAHL, M.S. AND IGLEWSKI, H. Isolation and Characterization of the *Legionella*
pneumophila outer membrane. Journal of Bacteriology. 159(1): 107-113, 1984.
- HOSTLER, K.Y., VAN DEN BOSCH, H. Subcellular and submitochondrial
localization of the biosynthesis of cardiolipin and related phospholipids in rat
liver. Biochim Biophys Acta. 260: 380-386, 1972.
- KANESHIRO, T., LAW, J.H. Phosphatidylcholine synthesis in *Agrobacterium*
tumefaciens. I. Purification and properties of a phosphatidylethanolamine *N*-
methyltransferase. J. Biol. Chem. 239: 1705-1713, 1964.
- KENNEDY, E.P. AND WEISS, S.B. The function of cytidine coenzymes in the
biosynthesis of phospholipids. J Biol Chem 222:193-214, 1956.
- KENT, C. CTP:phosphocholine cytidyltransferase. Biochimica et Biophysica Acta.
1348: 79-90, 1997.
- KENT, C. Eukariotic phospholipids biosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 64: 315-43,
1995.

- KURLAND, C.G., ANDERSON, S.G. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. Microbiol Mol. Biol Rev. 64: 786-820, 2000.
- LEWIN, R.A. Symbiosis and parasitism – Definitions and evaluations. Bioscience. 32(4): 254-260. 1982.
- LENZ, G. **Mecanismos de transdução de sinal ativados por purinas, pirimidinas e fatores de crescimento em culturas de astrócitos.** Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000, 164p. Tese – Doutorado em Bioquímica.
- LIRA, R., CONTRERAS, M., SANTA-RITA, R.M., URBINA, J. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of *in vitro* activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 47: 537-546, 2001.
- LISCOVITCH, M., CZARNY, M., FIUCCI, G. AND TANG, X. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. Biochem. J. 345: 401-415, 2000.
- LIU, B., LIU, Y., MOTYKA, S.A., AGBO, E.E.C. AND ENGLUND, P.T. Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. Trends Parasitol. 21: 363-369, 2005.
- LÓPEZ-LARA, I.M., GEIGER, O. Novel pathway for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria associated with eukaryotes. J. Biotechnol. 91: 211-21, 2001.
- LUQUE-ORTEGA, J.R. AND RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(4): 1327-1332, 2007.
- LUX, H., HEISE, N., KLENNER, T., HART, D., OPPERDOES, F.R. Ether—lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether—lipid analogs in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 111: 1-14, 2000.

- LUX, H; HART, DT; PARKER, PJ AND KLENNER, T. Ether-lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkylphospholipid analogues. Adv. Exp. Med. Biol.416:201-211, 1996.
- MACCIONI, RB AND CAMBIAZO, V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. Physiol. Rev. 75:835-64, 1995.
- MCCONVILLE, M., MULLIN, K., ILGOUTZ, S., TEASDALE, R. D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 122–154, 2002.
- MARTÍNEZ-MORALES, F., SCHOBERT, M., LÓPEZ-LARA, I.M. AND GEIGER, O. Pathways for phosphatidylcholine biosynthesis in bacteria. Microbiology. 149: 3461-3471, 2003.
- MATSUMOTO, K., KUSADA, J., NISHIBORI, A., HARA, H. Lipid domains in bacterial membranes. Mol. Microbiol. **61**: 1110-7, 2006.
- MCCONVILLE, M.J., MULLIN, K.A., ILGOUTZ, S.C., TEASDALE, R.D. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66: 122-154, 2002.
- MCMASTER, C.R. AND BEE, R.M. CDP-ethanolamine: 1,2 diacylglycerol ethanolaminephosphotransferase. Biochemica et Biophysica Acta. 1348: 117-123, 1997.
- MEER, G.V., VOELKER, D. AND FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. Nat Rev Mol Cell Biol. 9(2): 112-124, 2008.
- MCGHEE, R.B., COSGROVE, W.B. Biology and Physiology of the Lower Trypanosomatidae. Microbiological Reviews 44: 140-73, 1980.

- MICHEL, V., YUAN, Z., RAMSUBIR, S. AND BAKOVIC, M. Choline transport for phospholipid synthesis. Exp. Biol. Med. 231: 490-504, 2006.
- MICHELS, P.A.M., BRINGAUD, F., HERMAN, M., HANNAERT, V. Metabolic functions of glycosome in trypanosomatids. Biochimica et biophysica Acta. 1763: 1463-1477. 2006.
- MICHELS, P.A.M. AND OPPERDOES, F.R. The evolutionary origins of glycosomes. Parasitol. Today. 7(5):105-109, 1991.
- MILLER, K.J., SHON, B.C., GORE, R.S. AND HUNT, W.P. The phospholipid composition of *Bradyrhizobium* spp. Current Microbiology. 21: 205-210. 1990.
- MINDER, A.C., DE RUDDER, K.E., NARBERHAUS, F., FISCHER, H.M., HENNECKE, H., GEIGER, O. Phosphatidylcholine levels in *Bradyrhizobium japonicum* membranes are critical for an efficient symbiosis with the soybean host plant. Mol. Microbiol. 39: 1186-98, 2001.
- MISSET, O., BOS, O.J.M., OPPERDOES, F.R. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*: simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. Eur. J. Biochem. 157:441-453, 1986.
- MOMEN, H. Some current problems in the systematic of Trypanosomatids. Int. J. Parasitol. 31: 640-642, 2001.
- MOTTA, M.C.M., GONÇALVES, R.G., YIM, L., FRAGOSO, S.P., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M., DE SOUZA, W., SCHENKMAN, S., ELIAS, M.C. From bacterium to organelle: co-ordination of division between the endosymbiont and the host trypanosomatid. Annals of the XXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology. BC11, 2006.
- MOTTA, M.C.M., PICCHI, G.F., PALMIÉ-PEIXOTO, I.V., ROCHA, M.R., DE CARVALHO, T.M., MORGADO-DIAZ, J., DE SOUZA, W., GOLDENBERG,

- S., FRAGOSO, S.P. The microtubule analog protein, FtsZ, in the endosymbiont of trypanosomatid protozoa. J. Eukaryot. Microbiol. 51: 394-401, 2004.
- MOTTA, M.C.M., DE SOUZA, W., THIRY, M. Immunocytochemical detection of DNA and RNA in endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol. Lett. 221: 17-23, 2003.
- MOTTA, M.C.M.; DE SOUZA, W. AND CHANG, K.P. Endosymbiosis of Beta-Proteobacteria in Trypanosomatid Protozoa. J. Seckbach (ed.), Symbiosis, 465-473, 2001.
- MOTTA, M.C.M., SOARES, M.J., ATTIAS, M., MORGADO, J., LEMOS, A.P., SAAD-NEHME, J., MEYER-FERNANDES, J.R., DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical analysis of the relationship of *Crithidia deanei* with its endosymbiont. Euro. J. Cell. Biol. 72: 370-7, 1997a.
- MOTTA, M.C.M., MONTEIRO-LEAL, L.H., DE SOUZA, W., ALMEIDA, D.F. AND FERREIRA, L.C.S. Detection of penicillin-binding proteins in endosymbionts of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. J. Euk. Microbiol. 44: 492-6, 1997b.
- MOTTA, M.C.M., SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Freeze-fracture study of endosymbiont-bearing trypanosomatids of the *Crithidia* genus. Micr. Electr. Biol. Cel. 15: 131-44, 1991.
- MUNDIM, M.H., ROITMAN, I., HERMANS, M.A., KITAJIMA, E.W. Simple nutrition of *Crithidia deanei*, a reduviid trypanosomatid with an endosymbiont. J. Protozool. 21: 518-21, 1974.
- MUNDIM, M.H. **Estudo nutricional de *Crithidia luciliae* e *Crithidia deanei* isoladas de *Zelus leucogrammus*.** Rio de Janeiro. UFRJ, 1975, 80p. Tese (Mestrado em microbiologia). Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- MUNDIM, M.H. AND ROITMAN, I. Extra nutritional requirements of artificially aposymbiotic *Crithidia deanei*. J. Protozool. 24: 329-31, 1977.
- MURRAY, H.W. AND DELPH-ETIENE, S. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. J. Infect. Dis. 181: 795-799, 2000.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
www.ncbi.nlm.nih.org/sites/entrez, 2007.
- NEGWENYA, B.Z., FIAVEY, N.P. AND MOGASHOA, M.M. Anti-neoplastic action of peritoneal macrophages following oral administration of ether analogues of lysophospholipids. Eur. J. Cancer. 28A:1637-1642, 1992.
- NEWTON, B.A. AND HORNE, R.W. Intracellular structures in *Strigomonas oncopelti*. Exp. Cell Res. 13: 563-574, 1957.
- NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science. 258: 607-614, 1992.
- NOVAK, E., HAAPALAINEN, E.F., SILVA, S., SILVEIRA, J.F. Protein synthesis in isolated symbionts from the flagellate protozoan *Crithidia deanei*. J. Protozool. 35: 375-8, 1988.
- NOVEY, F. G., MCNEAL, W. J. AND TORREY, H. N. The trypanosomes of mosquitoes and other insects. J. Infect. Dis. 4: 223-276, 1907.
- OPPERDOES, F.R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Annu. Rev. Microbiol. 41:128-151, 1987.
- OPPERDOES, F.R. AND BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: glycosome. FEBS Lett. 80: 360-364. 1977.

- PAWELCZYK, T AND LOWENSTEIN, J.M. Inhibition of phospholipase C δ by hexadecylphosphorylcholine and lysophospholipids with antitumor activity. Biochemical Pharmacology. 45(2) 493-497, 1993.
- PALMIÉ-PEIXOTO, I., ROCHA, M., URBINA, J., DE SOUZA, W., EINICKER-LAMAS, M. AND MOTTA, M.C.M. Effects of sterol biosynthesis inhibitors on endosymbiont-bearing trypanosomatids. FEMS Microbiol Lett. 255: 33-42, 2006.
- PALMIÉ-PEIXOTO, I. **Caracterização ultraestrutural e bioquímica do endosimbionte de *Crithidia deanei*: Análise da composição lipídica**. Rio de Janeiro. UFRJ, 2002, 125p. Tese – Mestrado em Ciências biológicas (Biofísica). Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PARSON, M., FURUYA, T., PAL, S. AND KESSLER, P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. Molecular AND Biochemical Parasitology. 115: 19-28, 2001.
- PAYS, E., VANHAMME, L., PÉ REZ-MORGA, D. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. Curr. Opin. Microbiol. 7: 369-374.
- PAWELCZYK, T. AND LOWENSTEIN, J.M. Binding of phospholipase C51 to phospholipid vesicles. Biochem. J. 291: 693-696, 1993.
- PEGG, A.E., SHANTZ, L.M., COLEMAN, C.S. Ornithine decarboxylase: structure, function and translational regulation. Biochem. Soc. Trans. 22: 846-52, 1995.
- PÉREZ-VICTORIA, F.J., SÁNCHEZ-CAÑETE, M.P., KARIN, S., CROFT, S.L., SUNDAR, S., CASTNAYS, S., GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. Drug Resistance Updates. 9: 26-39, 2006.

- PÉREZ-VICTORIA, F.J., CASTANYS, S., GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. Antimicrob. Agents. Chemother. 47: 2397-2403, 2003a.
- PÉREZ-VICTORIA, GAMARRO, F, OUELLETTE, M., CASTANYS, S. Functional Cloning of the Miltefosine Transporter. The Journal of Biological Chemistry. 50: 49965-49971, 2003b.
- PESSI, G., KOCIUBINSKI, G., MAMOUN, C.B. A pathway phosphatidylcholine biosynthesis in *Plasmodium falciparum* involving phosphoethanolamine methylation. Proc. Natl. Acad Sci. U. S. A. 101: 6206-11, 2004.
- POWIS, G., SEEWALD, M.J., GRATAS, C., MILDNER, D.C., REIBOW, J., MODEST, E.J. Selective inhibition of phosphatidylinositol phospholipase C by cytotoxic ether lipid analogues. Cancer Res. 52: 2835-2840. 1992.
- PROBST, C.M., LEONE, L.N.Y., FOTI, L., UMAKI, A.C.S., GONÇALVES, R.E., SATAKE, T.S., MOTTA, M.C.M, FRAGOSO, S.P., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A. Structural and functional genomics of endosymbiotic process: *Crithidia deanei* as a model. Annals of the XXII Meeting of the SBPZ and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. **BM163**, 2006.
- RAETZ, C.R., DOWHAN, W. Biosynthesis and function of phospholipids in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 165: 1235-8, 1990.
- ROBSON, G.D., WIEBE, M., KUHN, P.J. AND TRINCI, A.P.J. Inhibitors of phospholipids biosynthesis. *Biochemistry of Cell Walls and Membranes in Fungi* (Kuhn PJ, Trinci APJ, Jung MJ, Goosey MW AND Copping LG, eds), pp.245-281. Springer Verlag, Berlin, 1990.

- ROCK, C.O., JACKOWISKI, S. AND CRONAN, J.E. Lipid metabolism in prokaryotes. In *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. Edited by D.E. Vance and J. Vance. Amsterdam: Elsevier, pp 35-74, 1996.
- RODRIGUES, J.C., ATTIAS, M., RODRIGUEZ, C., URBINA, J.A., DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a beta (24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms *Leishmania amazonensis*. Antimicrob. Agents. Chemother. 46: 487-99, 2002.
- ROSE, K., RUDGE, S.A., FROHMAN, M.A., MORRIS, A.J., ENGBRECHT, J. Phospholipase D signaling is essential for meiosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 12151-12155, 1995.
- RUDDER, K.E.E., LÓPEZ-LARA, I.M. AND GEIGER, O. Inactivation of the gene for phospholipid *N*-methyltransferase in *Sinorhizobium meliloti*: phosphatidylcholine is required for normal growth. Molecular Microbiology. 37(4): 763-772, 2000.
- RUDDER, K.E.E., SOHLENKAMP, C., GEIGER, O. Plant-exuded choline is used for Rhizobial membrane lipid biosynthesis by phosphatidylcholine synthase. J. Biol. Chem. 274: 20011-6, 1999.
- RUDDER, K.E.E., THOMAS-OATES, J.E., GEIGER, O. *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipids *N*-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. J. Bacteriol. 179: 6921-8, 1997.
- RUIZ, N., KAHNE, D., SILHAVY, T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. Nat. Rev. Microbiol. 4: 57-66, 2006.
- SALZMAN, T.A, BATLLE, A.M., ANGLUSTER, J., DE SOUZA, W. Heme synthesis in *Crithidia deanie*: influence of the endosymbiote. Int. J. Biochem. 17: 1343-7, 1985.

- SANTA-RITA, R.M., LIRA, R., BARBOSA, H.S., URBINA, J.A. AND CASTRO, S.L. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 55: 780-784, 2005.
- SANTA-RITA, R.M., HENRIQUES-PONS, A., BARBOSA, H.S. AND DE CASTRO, S.L. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004.
- SANTA-RITA, R.M. AND BARBOSA, H.S. Effect of the alkyl-lysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. 75: 219-228, 2000.
- SARAIVA, V.B., WENGERT, M., GOMES-QUINTANA, E., HEISE, N., CARUSO-NEVES, C. Na⁺ - ATPase and protein kinase C are targets to 1-O-hexadecylphosphocholine (miltefosine) in *Trypanosoma cruzi*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 481(1): 65-71, 2009.
- SASAKI, T., SASAKI, J., SAKAI, T., TAKASUGA, S. AND SUZUKI, A. The physiology of phosphoinositides. Biol. Pharm. Bull. 30: 1599-604, 2007.
- SCHLAME, M., RUA, D. AND GREENBERG, M.L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. Progress in Lipid Research 39: 257-288, 2000.
- SCOTT, D.A.; DOCAMPO, R.; DVORAK, J.A.; SHI, S. AND LEAPMAN, R.D. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. 272:28020-28029, 1997.

- SHERR, S.I. AND LAW, J.H. Phosphatidylcholine synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. The Journal of Bacteriological Chemistry. 240 (10): 3760-3764, 1965.
- SIMÕES, A.P., MOLL, G.N., SLOTBOOM, A.J., ROELOFSEN, B., OP DEN KAMP, J.A. Selective internalization of choline-phospholipids in *Plasmodium falciparum* parasitizes human erythrocytes. Biochim. Biophys. Acta. 1063: 45-50, 1991.
- SIMPSON, A.G.B., STEVENS, J.R. AND LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends in Parasitology. 22(4): 168-174, 2006.
- SHOJI, M., RAYNOR, R.L., FLEER, E.A.M., EBIL, H., VOLGER, W.R. AND KUO, J.F. Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL 60 cells. Lipids. 26: 145-149, 1988.
- SOARES, M.J., MOTTA, M.C.M, DE SOUZA, W., Bacterium-like endosymbiont and virus-like particles in the trypanosomatid *Crithidia desouzai*. Microbios Lett **41**: 137-144, 1989.
- SOARES, M.J., DE SOUZA, W. Fine structures of *Blastocrithidia culicis* as seen in the sections and freeze-fracture replicas. Biol. Cell. 61: 101-8, 1987.
- SOTO, J AND BERMAN, J. Treatment of new world cutaneous leishmaniasis with miltefosine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 100S: S34-S40, 2006.
- SOUZA, W. AND MOTTA, M.C.M. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. FEMS Microbiology Letters. 173: 1-8, 1999.
- STARFFORD, R.E., FANNI, T., DENNIS, E.A. Interfacial properties and critical micelle concentration of lysophospholipids. Biochemistry. 28:5113-5120, 1989.
- STORER, T.I. AND USINGER, R.L. Zoologia Geral Comp. Ed. Nacional, SP, 1971.

- SUNDAR, S., MORE, D. K., SINGH, M. K., SINGH, V. P., SHARMA, S., MAKHARIA, A., KUMAR, P. C. AND MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis. 31: 1104–1106, 2000.
- TIMMIS, J.N., AYLIFFE, M.A., HUANG, C.Y., MARTIN, W. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. Nat. Rev. Genet. 5: 123-35, 2004.
- TSUSHIMA, S., YOSHIOKA, Y., TANIDA, S., NORMURA, H., NOJIMA, S., HOZUMI, M. Syntheses and antimicrobial activities of alkyl lysophospholipids. Chem Pharm Bull (Tokyo). 30: 3260-70, 1982.
- ÜBERALL, F., OBERHUBER, H., MALY, K., ZAKNUN, J. DEMUTH, L., GRUNICKE, H.H. Hexadecylphosphocholine inhibits inositol phosphate formation and protein kinase C activity. Cancer Res. 51: 616-618, 1991.
- URBINA, J.A. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. Royal of Tropical Medicine and Hygiene. 105: S9-S16, 2006.
- URBINA, J.A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic target in kinetoplastid parasites. Parasitol. 114 Suppl: S91-9, 1997.
- VANCE, J.E. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: Two metabolically-related aminophospholipid. Journal of lipid research. Accepted manuscript version. 48p, 2009.
- VANCE, E AND VANCE, J.E. Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, Elsevier 5ª edição. 213-245. 2008.

- VANCE, D.E., WALKEY, C., AND CUI, Z. Phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase from liver. Biochimica et Biophysica Acta. 1348: 142-150, 1997.
- VANCE, D.E. AND RIDGWAY, N.D. The methylation of phosphatidylethanolamine. Prog. Lipid. Res. 27: 61-79, 1988.
- VAN DER SANDEN, M.H., HOUWELING, M., DUIJSINGS, D., VAANDRAGER, A.B. AND VAN GOLDE, L.M. Inhibition of phosphatidylcholine synthesis is not the primary pathway in hexadecylphosphocholine-induced apoptosis. Biochim. Biophys. Acta. 1636, 99–107, 2004.
- VERCESI, A.E., MORENO, S.N.J. AND DOCAMPO, R. Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles in *Trypanosoma brucei*. Biochem. J. 304:227-233, 1994.
- VERKLEIJ, A.J., LEUNISSEN-BIJVELT, J., DE KRUIJFF, B., HOPE, M. AND CULLIS, P.R. Non-bilayer structures in membrane fusion. Ciba Found Symp. 103: 45-59, 1984.
- VICKERMAN, K. AND PRESTON, T.M. Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In Biology of the kinetoplastida. 1: 35-129, 1976.
- WALLACE, F.G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. Exp. Parasitol. 18: 124-193, 1996.
- WANG, X., SCAGLIOTTI, J.P. AND HU, L.T. Phospholipid synthesis in *Borrelia burgdorferi*: *BB249* and *BB0721* encode functional phosphatidylcholine synthase and phosphatidylglycerolphosphate synthase proteins. Microbiology. 150: 391-397, 2004.
- WANG, X. The role of phospholipase D in signaling cascades. Plant Physiology. 120: 645-651, 1999.

- WARREN, L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Protozool. **5**: 529-39, 1960.
- WESSEL, M., KLÜSENER, S., GÖDEKE, J., FRITZ, C., HACKER, S., NARBERHAUS, F. Virulence of *Agrobacterium tumefaciens* requires phosphatidylcholine in the bacterial membrane. Mol. Microbiol. **62**: 906-15, 2006.
- WIEDER, T., REUTTER, W., ORFANOS, C.E., GEILEN, C.C. Mechanism of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. Prog. Lipid. Res. **38**: 249-59, 1999.
- WIEDER, T., ORFANOS, C.E. AND GEILEN, C.C. Induction of ceramide-mediated apoptosis by the anticancer phospholipid analog, hexadecylphosphocholine. The Journal of Biological Chemistry. 273(18): 11025-11031, 1998.
- WIEDER, T., HAASE, A., GEILEN, C.C. AND ORFANOS, C.E. The effect of two synthetic phospholipids on cell proliferation and phosphatidylcholine biosynthesis in madin-darby canine kidney cells. Lipids. 30(5): 389-393, 1995.
- WILDERMAN, P.J., VASIL, A.I., MARTIN, W.E., MURPHY, R.C., VASIL, M.L., *Pseudomonas aeruginosa* synthesizes phosphatidylcholine by use of the phosphatidylcholine synthase pathway. J. Bacteriol. **148**: 4792-9, 2002.
- WILGRAM, G.F., KENNEDY, E.P. Intracellular distribution of some enzymes catalyzing reactions in the biosynthesis of complex lipids. J. Biol. Chem. 238: 2615-2619, 1963.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. www.who.int, 2008.
- WRIGHT, M.M., HOWE, A.G., ZAREMBERG, V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. Biochem. Cell. Biol. 82:18-26, 2004.

- YAMAMOTO, N., NGWENYA, B.Z., SERY, T.W. AND PIERINGER, R.A.
Activation of macrophages by ether analogues of lysophospholipids. *Cancer Immunol. Immunother.* 25: 185-192, 1987.
- YANG, H. AND ROBERTS, M.F. Cloning, overexpression, and characterization of a bacterial Ca^{2+} - dependent phospholipase D. *Protein Science*. 11: 2958-2968, 2002.
- YIM, L., GONÇALVES, R., MOTTA, M.C.M., FOTI, L., ARAÚJO, P., PROBST, C.M., SUNAGA, D., GOLDENBERG, S., KRIEGER, M.A., FRAGOSO, S.P.
Cell division in the endosymbiotic bacterium of the trypanosomatid *Crithidia deanei*. *Annals of XXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology and XXXII Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease*. **1, 50**, 2005.
- ZUFFEREY, R., MAMOUN, C.B. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by phosphocholine analogs. *Mol. Biochem. Parasitol.* **125**: 127-34, 2002.
- ZEISEL, S.H. Choline: essential for brain development and function. *Adv Pediatr.* 44:263-295, 1997.
- ZEISEL, S.H., DA COSTA, K.A., FRANKLIN, P.D., ALEXANDER, E.A.; LAMONT, J.T.; SHEARD, N.F., BEISER, A. Choline: an essential nutrient for humans. *FASEB J.* 5: 2093-2098, 1991.
- ZINSER, E., SPERKA-GOTTLIEB, C.D.M., FASCH, E., KOHLWEIN, S.D., PALTAUF, F. AND DAUM, G. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*. 173(6): 2026-2034, 1991.
- ZHENG, B., OISHI, K., SHOJI, M., EIBL, H., BERDEL, W.E., HAJDU, J., VOLGER, W.R. AND KOU, J.F. Inhibition of protein kinase C (sodium, plus potassium)

activated adenosine triphosphatase and sodium pump by synthetic phospholipid analogues. Cancer Res., 50: 3025-3031, 1990.

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](#)