



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**REAÇÕES DE ÓXIDO REDUÇÃO COMO ALVO NA
QUIMIOTERAPIA TRICONOMICIDA**

ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS

**Salvador - Bahia – Brasil
2008**



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

**REAÇÕES DE ÓXIDO REDUÇÃO COMO ALVO NA
QUIMIOTERAPIA TRICOMONICIDA**

ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS

Professor-orientador: Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-graduação em Biotecnologia em
Saúde e Medicina Investigativa para
a obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia.

Salvador – Bahia – Brasil
2008

Dedicatória

*Aos meus pais (Agostinho e Iaci) pelo incentivo, por
acreditarem em mim
e me apoiarem em todas as minhas decisões,*

atuando como um porto seguro na minha vida e na de meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a **Deus** por sempre ter se mostrado presente em minha vida e por ter me dado forças em todos os momentos que para mim pareciam intransponíveis.

Aos meus pais, por tudo o que sou e por tudo o que vocês são. Por serem tão maravilhosos e sempre estarem presentes em minha vida me dando amor e apoio. Amo vocês!

Aos meus irmãos (Alã e Alane) e minha cunhada (Simone) pela amizade e carinho. Por estarem sempre do meu lado, pelos momentos de risadas e por me darem forças pra continuar.

Ao meu amor, Jeferson, por todo carinho, amor, amizade e respeito a mim dedicados. Pela compreensão e apoio e por sempre ter me acompanhado nos finais de semana na FIOCRUZ. Te Amo!

Aos meus sogros (Zélia e Fafá) por me receberem sempre tão bem em sua casa, pelo apoio e por todo carinho que dedicam a mim.

Às minhas crianças Lucas, Lico, Ayla, Bruna e Matheus por serem tão inocentes, pelas conversas, jogos e por todos os momentos de distração que vocês me proporcionaram.

As minhas amigas Ane, Niu, Luce, Carol, Si, Suca, Aline e Maísa pelos momentos felizes e por sempre estarem dispostas a me escutar e tentar resolver minhas dificuldades.

A **Dr. Marcos**, pelo apoio, por ter aceitado e enfrentado esse desafio junto comigo. Pelos finais de semana em que precisou me ajudar e principalmente, por todo conhecimento científico com o qual sempre me ajudou a pensar.

A **Di**, pela orientação, paciência e boa vontade. Pela ajuda durante os experimentos e por estar presente nos momentos de dificuldade.

A **Dr. Alberto** pelo incentivo e por me enriquecer com seu conhecimento tão vasto e rico sobre estresse oxidativo.

A **Dr. Marcus Oliveira** pelo auxílio sobre estresse oxidativo e pelas correções tão importantes da minha dissertação.

A **Diego Menezes** pela amizade e pela ajuda que sempre me ofereceu. Pelas conversas, cumplicidade e discussões científicas.

A **Síntia** (Sinhá Menina) uma pessoa sincera com seus sentimentos e amizade. Obrigada por ter me recebido em sua casa.

A **Nanda** e **Aninha**, pela amizade, delicadeza suíça (rsrs), simplicidade e competência.

A **Rafinha Gomes** pelos cortes no ultramicrotomo e pelas trocas de idéias e opinião.

A **Karla**, por sempre ter disponibilidade em me ajudar.

A **Mara, Cris, Danielle, Rafa, Daniel, Edgar, Glória, Lourdes**, pela companhia sempre prazerosa no laboratório, pela ajuda e companheirismo que sempre dedicaram a mim. Mas principalmente pelas risadas inesquecíveis.

A **Gisele (UEFS)** por ser tão paciente e pela boa vontade em me ajudar em Feira de Santana.

A **Táise** pela paciência e competência profissional à frente da Coordenação de Ensino de Biotecnologia.

A **Thiara** e **Samanta**, minhas alunas, pela amizade e carinho.

A **Angélica**, pela descontração com as histórias sobre “psicopatia”.

A **Tony** e **Gustavo (05 e 06)** pelos comentários pertinentes.

A **Elis**, pelas conversas e risadas e por todo apoio burocrático que me ofereceu.

A **Beth** e **Cláudio**, por todos os momentos felizes que me proporcionaram e pelo apoio técnico.

A **Dona Edna** e **Seu Flávio** pela apoio na organização e limpeza do laboratório..

Às **minhas células** que me ensinaram que nem sempre as coisas acontecem como e quando queremos.

Agências financiadoras: **FIOCRUZ, CAPES, FAPESB, CNPq, PDTIS.**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Tricomonadídeos	2
1.2 – <i>Trichomonas vaginalis</i>	2
1.2.1 – Biologia	3
1.2.2 – Epidemiologia	3
1.2.3 – Sintomatologia	5
1.2.4 – Patogenia	5
1.3 – <i>Tritrichomonas foetus</i>	5
1.3.1 – Biologia	6
1.3.2 – Epidemiologia	6
1.3.3 – Patogenia	7
1.4 – Hidrogenossomo	8
1.5 – Mecanismos Antioxidantes	9
1.6 – Quimioterapia	10
1.7 – Dietilditiocarbamato de sódio	14

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivo Específico	16

3. JUSTIFICATIVA	17
4. Material e Métodos	
4.1 Animais	18
4.2 Obtenção de cultura de <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>Tritrichomonas foetus</i>	18
4.3 Proliferação celular	18
4.4 Avaliação de Citotoxicidade em Linfócitos	18
4.5 Avaliação de Citotoxicidade em Macrófagos	19
4.6 Determinação do FIC	19
4.7 Peroxidação Lipídica	19
4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão	20
4.9 Detecção de tióis totais	20
4.10 Microscopia de fluorescência	20
4.11 Quimioluminescência	21
4.12 Detecção de Espécies Reativas	21
4.13 Análise Estatística	21
4.14 Substâncias Utilizadas	22
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ilustração do *Trichomonas vaginalis*

Figura 2 Prevalência da Tricomoníase ao redor do mundo por ano

Figura 3 Ilustração do *Tritrichomonas foetus*

Figura 4 Metabolismo hidrogenossomal

Figura 5 Estrutura química do metronidazol

Figura 6 Ativação do metronidazol em tricomonadídeos

Figura 7 Mecanismo de resistência anaeróbica ao metronidazol por *Trichomonas vaginalis*

Figura 8 Mecanismo de resistência anaeróbica ao metronidazol por *Tritrichomonas foetus*

Figura 9 Tempo de acompanhamento após o uso do MTZ versus incidência de câncer e risco relativo de desenvolver câncer.

Figura 10 Estrutura química do DETC

Figura 11 Crescimento *T. foetus* em estufa de CO₂

Figura 12 Crescimento *T. vaginalis* em estufa de CO₂

Figura 13 Determinação do IC₅₀ DETC em *T. foetus*

Figura 14 Determinação do IC₅₀ DETC em *T. vaginalis*

Figura 15 Determinação do IC₅₀ do Metronidazol para *T. foetus*

Figura 16 Determinação do IC₅₀ do Metronidazol para *T. vaginalis*

Figura 17 Avaliação da Citotoxicidade do DETC em esplenócitos

Figura 18 Avaliação da Citotoxicidade do metronidazol em esplenócitos

Figura 19 Avaliação da Citotoxicidade do DETC em macrófagos

Figura 20 Determinação do FIC para *T. foetus*

Figura 21 Determinação do FIC para *T. foetus*

Figura 22 Determinação do FIC para *T. vaginalis*

Figura 23 Determinação do FIC para *T. vaginalis*

Figura 24 Detecção de tióis totais em *T. vaginalis*

Figura 25 Detecção de Tióis em *T. foetus*

Figura 26 Detecção de radicais livres em *T. vaginalis*

Figura 27 Detecção de radicais livres em *T. foetus*

Figura 28 TBARS *T. vaginali*

Figura 29 TBARS *T. foetus*

Figura 30 Microscopia eletrônica de transmissão de *T. vaginalis* e *T. foetus* tratados com DETC 100 μ M por 6 horas

Figura 31 Microscopia Eletrônica de Transmissão *T. foetus* controle

Figura 32 Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* tratado com DETC 500nM

Figura 33 Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* tratado com metronidazol 500nM

Figura 34 Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* com a combinação dos fármacos

RESUMO:Reações de óxido-redução como alvo na quimioterapia tricomoníase.
ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS. *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* são os agentes etiológicos da tricomoníase humana e bovina, respectivamente. A primeira é uma parasitose de grande importância em saúde pública, sendo a principal doença sexualmente transmissível não viral e a segunda ocasiona extensos prejuízos econômicos na pecuária. A tricomoníase humana pode promover a incidência de câncer de colo de útero e a transmissão do HIV. Na infestação humana a droga de escolha é o metronidazol, mas não há um composto eficiente para o tratamento de bovinos. Como este fármaco é usado para outras parasitoses e infecções bacterianas desde a década de 60, tem sido documentado o surgimento de casos refratários e cepas resistentes. Além disso, o fármaco pode ter efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Assim sendo a busca por novos compostos tricomoníase constitui uma demanda premente. No presente estudo foram avaliados os efeitos do dietilditiocarbamato de sódio (DETC) sobre os protozoários parasitas *T. vaginalis* e *T. foetus*. Observamos que a adição de DETC inibiu significativamente a proliferação de *T. vaginalis*, produzindo uma IC₅₀ de 269,7nM, enquanto o metronidazol teve uma IC₅₀ de 523,1nM. Em *T. foetus* os valores de IC₅₀ foram semelhantes, sendo 497,8 e 459,7nM para o DETC e para o metronidazol, respectivamente. Estes compostos não afetaram significativamente a incorporação de [³H]timidina por esplenócitos murinos em concentrações de até 1000M. A atividade mitocondrial de macrófagos peritoneais murinos também não foi afetada por DETC, mesmo em 200µM, sugerindo seletividade no modo de ação. Objetivando determinar a existência de sinergismo entre DETC e metronidazol, foram determinados os valores de FIC (concentração inibitória fracionada) para os dois protozoários. Os valores de FIC foram 0,3 e 0,7 para *T. vaginalis* e *T. foetus*, respectivamente. Esta observação indica que ocorre a interação sinérgica no protozoário parasita de humanos. A fim de determinar se a incubação com DETC poderia afetar a expressão de grupos sulfidrila dos parasitos empregamos a reação de Ellman para dosar os grupamentos tiol totais de *T. vaginalis* antes e após a adição do composto. Observamos que o tratamento com DETC por 24h significativamente (p<0,01) reduziu a concentração de grupos tióis do parasito. A detecção de tióis livres pela sonda fluorescente orto-phthalaldeído (OPA) em *T. foetus* sugere a participação de sulfidrilas no mecanismo de ação do DETC, uma vez que este reduz marcadamente a marcação dos parasitos pelo OPA, mas este efeito foi revertido pela pré-incubação com cisteína. Vale salientar que o aminoácido reverte, ainda, os efeitos do composto na proliferação parasitária. A mensuração de radicais livres por quimioluminescência amplificada pelo luminol indicou que a geração de espécies reativas de oxigênio foi significativamente (p <0,05) aumentada por DETC em *T. vaginalis*, mas não em *T. foetus*. O estresse oxidativo sobre os parasitas foi avaliado pela medida de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Observou-se que a combinação metronidazol-DETC significativamente aumenta a peroxidação lipídica em *T. vaginalis* (p <0,01) e *T. foetus* (p <0,05). A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão revelou que tanto DETC quanto o metronidazol produziram danos hidrogenossomais e desencadearam autofagia e esses efeitos foram mais acentuadas no parasitas incubados com a combinação de drogas. Tomados em conjunto, estes dados

sugerem que a combinação metronidazol-DETC pode fornecer novas ferramentas para a efetiva quimioterapia da tricomoníase.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, quimioterapia.

ABSTRACT: Redox reactions as a target in trichomonocidal chemotherapy. ALENE VANESSA AZEVEDO DOS SANTOS. *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* are the etiologic agents of the human and bovine trichomoniasis, respectively. The former is a parasitic disease of great relevance in public health – the major non-viral sexually-transmitted disease, whereas the latter causes remarkable losses in livestock productivity. Human trichomoniasis can promote the incidence of cervical cancer and HIV transmission. In human infestation the drug of choice is metronidazole, but there is no efficient compound for treating the cattle. Since the medication is also used for other parasitic and bacterial diseases, since the 60s, refractory cases and resistant strains have been documented. Besides, the drug may be mutagenic and carcinogenic. Therefore the search for new trichomonocidal compounds is required. In the present study we investigated the effects of sodium N,N-diethylthiolcarbamate (DETC) alone or combined with metronidazole upon the parasitic protozoa *T. vaginalis* and *T. foetus*. We notice that DETC significantly inhibited the *T. vaginalis* proliferation, producing an IC₅₀ of 269.7nM, whereas metronidazole produced an IC₅₀ of 523.1. In *T. foetus* the IC₅₀ values were similar, being 497.8 and 459.7nM for DETC and metronidazole, respectively. These compounds did not significantly affect the incorporacão de [³H]timidine incorporation by murine splenocytes in concentrations up to 1000µM. The mitochondrial activity of murine peritoneal macrophages was not affected by 200µM DETC, suggesting a selective mode of action. In order to determine whether there is synergism between DETC and metronidazole, we determined the fractional inhibitory concentrations (FIC) of these compounds upon both protozoa. The FIC values for *T.vaginalis* and *T. foetus* were 0.3 and 0.7, respectively. This observation indicates that synergistic interaction takes place only on the human pathogen. To determine whether the incubation with DETC could affect the expression of sulphhydryl groups of parasites we employed the Ellman's reaction to measure the total thiol groups of *T. vaginalis* before and after the addition of the compound. We observed that treatment with DETC for 24h significantly ($p < 0.01$) reduced the concentration of thiol groups of the parasite. The detection of free thiols by the fluorescent probe ortho- phthaldialdehyde (OPA) in *T. foetus* suggests the involvement of sulphhydryls in the DETC mechanism of action, since it markedly reduces the OPA labeling of parasites, but this effect was reversed by cysteine preincubation with. It is noteworthy that the amino acid addition also reverts, the effects of the compound on the parasite proliferation. The measurement of free radicals by luminol-enhanced chemiluminescence indicated that reactive oxygen species generation was significantly ($p < 0.05$) enhanced by DETC in *T. vaginalis*, but not *T. foetus*. The oxidative stress on the parasites was evaluated by measurement of the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs). We observed that the metronidazole-DETC combination significantly enhanced lipid peroxidation in *T. vaginalis* ($p < 0.01$) and *T. foetus* ($p < 0.05$). The ultrastructural analysis by transmission electron microscopy revealed that both DETC and metronidazole produced hydrogenosomal damage and triggered autophagy and these effects were more pronounced on the parasites incubated with the combined drugs. Taken together these data suggest that the metronidazole-DETC combination may furnish new tools in the effective chemotherapy of trichomoniasis.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, chemotherapy.

LISTA DE ABREVIACÕES E ABREVIATURAS

ATP	adenina trifosfato
DETC	dietilditiocarbamato de sódio
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
FIC	concentração inibitória fracionada
H₂DCFDA	5-(and 6)-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HBSS	salina tamponada de Hank
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPV	papiloma vírus humano
IC₅₀	concentração que inibe 50% do crescimento
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
Meio TYM	trypticase-yeast-maltose
MTT	3-(4,5 dimetil tiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolio
Mtz	metronidazol
OPA	<i>o</i> -phthaldialdeído
O₂⁻	superóxido
PBS	salina tamponada com fosfato
REDOX	óxido – redução
SFB	soro fetal bovino

SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
<i>T. foetus</i>	<i>Tritrichomonas foetus</i>

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237r

Santos, Alene Vanessa Azevedo dos
Reações de óxido redução como alvo na quimioterapia tricomonocida
[manuscrito] / Alene Vanessa Azevedo dos Santos. - 2008.

62 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo
Moniz, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos.

1. Trichomonas vaginalis. 2. Tritrichomonas foetus. 3. Quimioterapia. I.Título.

CDU 593.1:615.28

1 – Introdução

Trichomonas vaginalis e *Tritrichomonas foetus* são protozoários causadores de doenças sexualmente transmissíveis em humanos e bovinos, respectivamente. Ambas as doenças apresentam importante relevância social e incidência mundial.

A infecção por *T. foetus* causa prejuízos econômicos pela alta incidência de abortos, casos de repetição de cio e intervalos prolongados entre partos (YULE *et al.*, 1989; PELLEGRIN, 1999).

T. vaginalis é o maior causador de vaginites sexualmente transmissíveis ao redor do mundo (LOSSICK, 1989) e é a causadora da principal doença sexualmente transmissível de caráter não viral (SOPER, 2004), a tricomoníase. Embora sua grande importância em saúde pública, tem recebido pouca atenção das autoridades e pesquisadores (van der POL, 2007). Estudos estimam que aproximadamente 170 milhões de ocorrências são registradas a cada ano (BOWDEN & GARNET, 2000). A doença também está associada a complicações severas como: aumento significativo no risco de desenvolvimento de câncer cervical (YAP, 1995) e de infecção pelo HIV (LAGA, 1993; van der POL *et al.*, 2006).

Um importante fator de disseminação da doença está vinculado ao fato de indivíduos do sexo masculino, usualmente assintomáticos, não fazerem uso de procedimentos profiláticos ou terapêuticos e, conseqüentemente, levarem à manutenção da doença. Altas quantidades de zinco no líquido seminal impedem a proliferação do parasito, deixando os homens e os touros, em alguns casos, apenas como transmissores.

A droga de escolha para o tratamento é o 5-nitroimidazol, metronidazol. No entanto, casos refratários e resistência ao medicamento já foram descritos (CROWELL *et al.*, 2003). Além disso, o metronidazol tem sido relacionado a aumentos na incidência de tumores. (BENDESKY *et al.*, 2002). Estes autores reportaram a indução de tumores em ratos (*Rattus rattus*). Foi relatado ainda que as fêmeas desenvolveram hepatomas e tumores mamários e os machos apresentaram um número elevado de tumores de pituitária e de testículo em resposta ao metronidazol.

De acordo com a ‘International Agency for Research on Cancer’ (IARC), o metronidazol foi classificado em 1998 como carcinogênico para animais e para seres humanos (www.iarc.fr).

1.1 Tricomonádídeos

Os tricomonádídeos são parasitos flagelados com um só núcleo e apresentam de três a seis flagelos. Todos são parasitas, e os gêneros incluem várias espécies importantes para a medicina humana e a veterinária (MEGLITSCH, 1981; LEVINE, 1985).

Existem várias espécies de tricomonádídeos nos animais domésticos e no homem, mas a classificação taxonômica e as relações parasito-hospedeiro de muitos deles ainda não estão muito claras. Eles têm sido encontrados no ceco e no cólon de praticamente todas as espécies de mamíferos e de aves examinadas, e também ocorrem em répteis, anfíbios, peixes e muitos invertebrados (LEVINE, 1985).

Esses protozoários representam um grupo de flagelados adaptados a viver em condições de anaerobiose e/ou microaerobiose. Muitos destes microorganismos habitam o intestino de uma variedade de hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo poucos virulentos (KULDA, 1999). Os tricomonádídeos são caracterizados pela presença de flagelos anteriores originados dos corpúsculos basais. O flagelo recorrente dá origem a uma membrana ondulante. Como a maioria dos flagelados, estes protozoários dispõem de um citoesqueleto complexo do qual faz parte o axóstilo, um feixe de microtúbulos paralelos, que percorre longitudinalmente todo o parasito e acaba por emergir na sua porção posterior (FELLEISEN, 1999).

A primeira espécie de tricomonádídeos, *Trichomonas tenax*, foi identificada por Muller em 1773. *T. tenax* tem sido associado a gengivites, mas é incerto se o processo inflamatório está relacionado ao protozoário ou se este simplesmente habita a área (REIN & MULLER, 1990).

Donné descobriu e nomeou o *Trichomonas vaginalis* em 1836. Ele encontrou o organismo em secreções genitais de homens e mulheres, sendo caracterizado inicialmente como não patogênico (THOMASON, 1989). Este parasito foi o primeiro a ser documentado em uma micrografia, publicada em 1845 (CAMPBELL, 2001).

1.2 *Trichomonas vaginalis*

O *Trichomonas vaginalis* é o parasito causador da tricomoníase nos seres humanos. Uma doença muito mais prevalente que a *Chlamydia trachomatis* e até mesmo a *Neisseria gonorrhoeae* (SOPER, 2004).

1.2.1 Biologia

O *T. vaginalis* é um protozoário flagelado e móvel. Mede 10 x 20µm e é oblongado ou amebóide durante a adesão às células epiteliais hospedeiras. Ele é impulsionado por quatro flagelos anteriores e um flagelo ligado à membrana ondulante (HEINE, 1993). O protozoário é microaerófilo e não possui mitocôndrias no seu citoplasma, possuindo apenas organelas esféricas especializadas, denominadas hidrogenossomas, cuja função redox gera hidrogênio molecular na região mais central do citoplasma (RUTTIGERS, 1983).

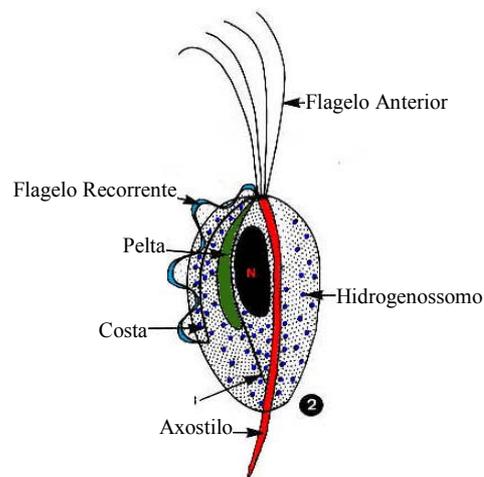


Figura 1: Ilustração do *Trichomonas vaginalis*. Adaptado de Adaptado de Parasitology in Focus, 1988.

O *T. vaginalis* adere à superfície das células na dependência de proteínas, as adesinas. A capacidade de adesão é relacionada a infectividade e virulência deste patógeno. A hemólise, destruição das células vermelhas sanguíneas com a liberação da hemoglobina, está relacionada com a virulência e já foi descrita em *T. vaginalis* (GRAVES, 1993; KRIEGER *et al.*, 1983).

1.2.2 Epidemiologia

Dados da organização mundial de saúde (2001) apontam que existem 174 milhões de casos ao redor do mundo, sendo 7,4 milhões de novos casos anuais relatados tanto em homens como em mulheres nos Estados Unidos da América (CDC, 2007).

A prevalência da doença entre mulheres gestantes na América Latina e no Caribe foi reportada como de 2,1% no Brasil (SIMÕES *et al.*, 1996), 3,6% em Barbados (LEVETT *et*

al., 1995), 8% na Nicarágua (ESPINOZA *et al.*, 1993) e 27,5% no Chile (FRANJOLA *et al.*, 1974).

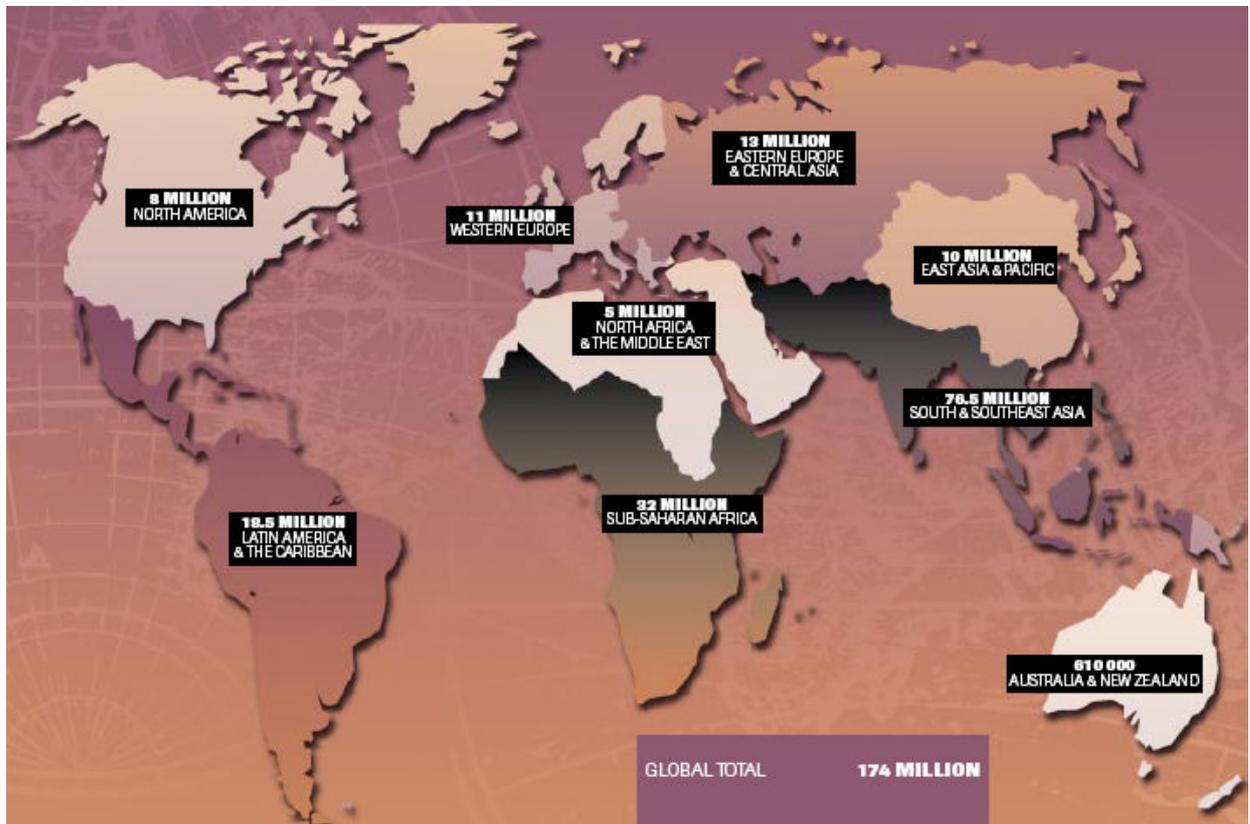


Figura 2: Prevalência da Tricomoníase ao redor do mundo por ano. WHO, 2001.

HOBBS (1999) determinou a prevalência de tricomoníase nos homens da Malásia com e sem uretrite e examinou os efeitos da infecção por *Trichomonas* na eliminação de sêmen com HIV. Homens HIV-soropositivos com uretrite sintomática e *Trichomonas* apresentaram uma concentração seis vezes maior de RNA do vírus HIV no sêmen que homens HIV-positivos com uretrite e sem a presença do protozoário.

Além disso, estudos demonstram que a infecção por *T. vaginalis* pode promover o câncer cervical em mulheres HPV-positivas e também pode agir independentemente por um caminho não viral (YAP, 1995).

Há vários fatores de risco relacionados com a doença, incluindo múltiplos parceiros sexuais, história prévia de doença sexualmente transmissível e infecção coexistente com *Neisseria gonorrhoeae* (SOBEL, 1997).

A infecção ocorre principalmente durante a relação sexual sem o uso de preservativo, mas pode ocorrer durante o parto ou por fômites.

1.2.3 Sintomatologia

A doença apresenta implicações médicas, sociais e econômicas. Com uma sintomatologia variada, a tricomoníase pode ser classificada, de acordo com a severidade da infecção, como aguda, crônica ou assintomática (PETRIN *et al.*, 1998). Na mulher, as manifestações clínicas podem variar de casos assintomáticos até colpites graves e cervicites (REIN & MULLER, 1990).

O homem geralmente é assintomático, mas podem ocorrer prostatites que, quando presentes, incluem descarga uretral fina, dor e disúria. No caso da mulher, quando apresenta sintomas, o período pré-patente varia normalmente entre 4 a 20 dias após a exposição. Os sintomas, na mulher, incluem uma secreção vaginal que varia de verde-amarela a cinza, desconforto durante a relação sexual (dispareunia de intróito), odor vaginal, dor ao urinar, irritação pruriginosa da área genital e, em raras ocasiões, dor na região ventral do abdômen. (NIAID, 2006). Quando infectada durante a gestação, a mulher tem predisposição à ruptura prematura das membranas placentárias, parto prematuro e recém-nascidos com baixo peso ao nascimento (MINKOFF *et al.*, 1984).

1.2.4 Patogenia

T. vaginalis pode, freqüentemente, causar lesões hemorrágicas pontuais na mucosa. Em pessoas HIV-negativas, os infiltrados leucocitários e as lesões genitais microhemorrágicas induzidas por *Trichomonas* podem aumentar o portal de entrada do HIV e o número de células-alvo para o vírus permitindo assim a infecção humana (SORVILLO *et al.*, 2001). *T. vaginalis* produz determinadas cisteíno-proteinases capazes de degradar inibidores de proteases secretados por leucócitos. Esses inibidores são conhecidos por sua capacidade de prevenir a transmissão do HIV através da inibição da entrada do vírus nas células monocíticas *in vitro* (DRAPER *et al.*, 1998).

1.3 *Tritrichomonas foetus*

O *Tritrichomonas foetus* é um protozoário que habita o trato reprodutivo, incluindo o prepúcio e o pênis distal de bois e a vagina e o útero de vacas.

1.3.1 Biologia

É um organismo móvel, como os três flagelos anteriores, um flagelo recorrente e a membrana ondulante. Amostras examinadas ao microscópio óptico apresentam formas ovais, elipsóides ou mesmo amebóides, medindo de 26 a 30 μ m de comprimento por 12 a 15 μ m de largura (CSONKA & SQUIRES, 1984).

A adesão de *T. foetus* às células epiteliais bovinas pode ser mediada pelo glicoconjugado de superfície do parasito análogo ao lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* spp. e a atividade citotóxica parece ser dependente de adesão (SINGH *et al.*, 1999).

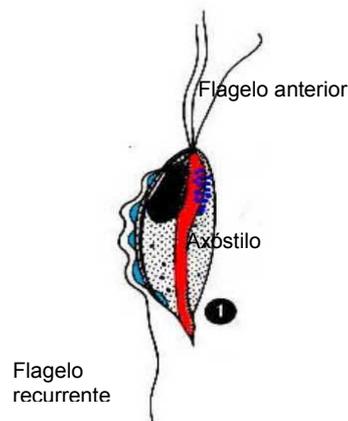


Figura 3: Ilustração do *Tritrichomonas foetus*. Adaptado de Parasitology in Focus, 1988.

1.3.2 Epidemiologia

A distribuição da tricomoníase bovina é mundial. Em partes das Américas do Norte e Sul, bem como na Austrália, onde a bovinocultura é extensiva, a prevalência de *T. foetus* pode superar os 50%. Esta infecção é uma das principais causas de abortos em bovinos, juntamente com a brucelose e leptospirose.

A capacidade reprodutiva do rebanho pode ser reduzida à metade, ocasionando grandes perdas econômicas. A infecção por *T. foetus*, dentre os tricomonadídeos, é a que acarreta os maiores prejuízos, sendo relatadas perdas anuais de cerca de US\$ 10.000.000, somente nos EUA (PETER *et al.*, 1995). Em um estudo realizado no Brasil em 1997, Leite e colaboradores observaram que 5,9% dos 118 lavados prepuciais e os dois fetos estudados apresentavam formas vivas de *Tritrichomonas foetus*. Na pesquisa, os pouco achados de

parasitos foram atribuídos à falta de cuidado durante a coleta e ao transporte inadequado do material a ser analisado.

A transmissão venérea do agente etiológico gera a doença, o que leva à diminuição da eficiência reprodutiva no gado (CORBEIL *et al.*, 1989).

1.3.3 Patogenia

O protozoário é observado na cavidade urogenital de vacas e está hábil a migrar ascendentemente para a cérvix e invadir o útero (HONIGBERG, 1978). Nos touros, o sítio de infecção mais comum é a cavidade prepucial. Entretanto, o epidídimo e as vesículas seminais podem, algumas vezes, estar envolvidos (BONDURANT & HONIGBERG, 1994).

A infecção nas vacas ocorre primariamente pela exposição a touros infectados na criação, porém sêmen e equipamentos de inseminação artificial contaminados também servem como fonte de infecção. A infecção inicial usualmente não interfere na concepção, mas posteriormente culmina com a morte embrionária entre 15 a 80 dias de gestação.

A tricomoníase bovina é caracterizada por infertilidade transiente e as vacas e novilhas normalmente retornam ao estro entre 1 e 3 meses, mas um período de infertilidade pode perdurar por dois a seis meses, devido à infecção (PETER *et al.*, 1995). A infertilidade permanente é ocasional. Em casos de concepção, o aborto normalmente ocorre em seguida. Nos fetos abortados, a invasão do tecido fetal pelos protozoários pode ser observada. Também fora descritas lesões gastrintestinais associadas com lesão do epitélio da mucosa (RHYAN *et al.*, 1995).

No boi, a doença aguda é caracterizada por inflamação e edema do tecido prepucial, ocasionalmente seguido por descarga mucopurulenta. Entretanto, os sintomas usualmente desaparecem após duas semanas de infecção e esta se torna assintomática (HONIGBERG, 1978).

Em contraste, a severidade da doença nas fêmeas alcança desde infecções inaparentes até severas manifestações, acompanhadas por significantes alterações patológicas. Estas, eventualmente, resultam em falha reprodutiva e aborto. Diferentes graus de cervicite, vaginite, endometrite, salpingite, placentite e piometra foram observados com relação às perdas fetais (FELLEISEN, 1999). As alterações inflamatórias mais pronunciadas no trato reprodutivo de novilhas infectadas por *T. foetus* foram encontradas no endométrio e nas tubas uterinas, os dois sítios que mais influenciam na concepção e gestação (ANDERSON *et al.*, 1996). Essas alterações podem ser diretamente correlacionadas com as falhas no trato reprodutivo.

Nos primeiros 20 dias após a infecção inicial, os parasitos proliferam na cavidade vaginal, provocando vaginite. Daí os trofozoítos migram via cérvix, colonizam e invadem as paredes uterinas. Parasitos são vistos por microscopia invadindo os tecidos placentários e fetais. Geralmente o aborto ocorre nas primeiras 16 semanas da gestação, mas algumas vacas podem manter-se infectadas durante todo o período gestacional e mesmo após este. Estas portadoras podem constituir cerca de 5% dos animais infectados, dificultando a profilaxia, em grande parte baseada nas restrições reprodutivas (SKIRROW, 1987).

É possível que o abortamento seja decorrente da ação conjunta de fatores de virulência do parasito, bem como da resposta imunológica produzida. Antígenos parasitários adsorvidos à superfície da membrana coriônica e do endométrio podem deflagrar um processo de auto-agressão mediado pelo sistema complemento e pela resposta imune celular (BONDURANT 1997). Há uma imunidade relativa nos animais infectados que apresentam aumento de IgM, IgG e IgA circulantes, mas estes conferem pouca proteção, possivelmente pela presença de cisteíno-proteinases, que degradam estas moléculas.

1.4 Hidrogenossomo

Os tricomonádídeos não apresentam mitocôndrias, apresentando, ao invés, uma organela denominada hidrogenossomo (uma organela delimitada por dupla membrana), que é responsável pelo metabolismo REDOX destes protozoários.

O hidrogenossomo é uma organela esférica com 0,5 a 2 µm de diâmetro. Geralmente está associada a partículas de glicogênio e às estruturas do citoesqueleto. É encontrado em organismos unicelulares que habitam ambientes com baixas tensões de oxigênio. Dentre estes microorganismos estão alguns protistas, como os tricomonádídeos, alguns ciliados de vida livre e tipos de fungos presentes no rúmen (DÍAZ & DE SOUZA, 1997).

A organela difere da mitocôndria em alguns aspectos principais, como por exemplo: a ausência de um genoma com exceção, o hidrogenossomo de *Nyctotherus ovalis* (AKHMANOVA et al., 1998); eles não possuem citocromos, F₀-F₁ ATPase, o ciclo do ácido tricarbóxico e nem fosforilação oxidativa (MULLER, 1993).

O hidrogenossomo de tricomonádídeos contém um compartimento circundado por dupla membrana, chamado vesícula periférica, o qual acumula magnésio, cálcio e fósforo e que possivelmente está relacionado com a regulação intracelular do cálcio (BENCHIMOL *et al.*, 1996).

A principal função do hidrogenossomo é a descarboxilação oxidativa do piruvato,

associada à formação de ATP. Os elétrons gerados são transferidos da piruvato:ferredoxina oxidoreductase (enzima chave no metabolismo energético do parasito) para a ferredoxina, que depois é novamente oxidada pela hidrogenase, levando à formação de hidrogênio molecular. Os produtos finais do metabolismo do hidrogenossomo são: acetato, H_2 e CO_2 (KULDA, 1999).

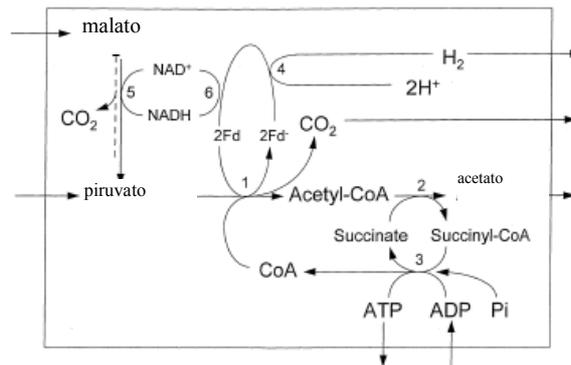


Figura 4: Metabolismo Hidrogenossomal. Adaptado de Kulda, 1999.

1.5 Mecanismos Antioxidantes

Os tricomonádídeos são microorganismos anaeróbicos que não possuem mitocôndria. Entretanto, eles são expostos ao oxigênio no sítio da infecção e precisam de defesas antioxidantes para sobreviver neste ambiente.

Várias enzimas dos parasitos são inativadas pelo oxigênio, inclusive proteínas chave do hidrogenossomo (Ellis *et al.*, 1994).

Enzima, como a catalase, já foi descrita em *T. foetus*, porém sua presença não foi detectada em *T. vaginalis* (Page-Sharp, Behm & Smith, 1996).

Linstead & Bradley em 1988 descreveram a presença de NADH e NADPH oxidase em *T. vaginalis* e relacionaram sua atividade no parasito com a capacidade de reduzir o oxigênio à água e peróxido de hidrogênio, respectivamente. A importância dessas enzimas no citosol foi relatada na prevenção da chegada de oxigênio aos hidrogenossomos.

Esses microorganismos não possuem glutathione e assim fazem uso de proteínas ricas em cisteína como principais agentes redutores na célula. Eles também possuem a capacidade de gerar tióis de baixo peso molecular (propanotiol, metanotiol, sulfato de hidrogênio), a partir da ação de uma enzima similar à metionina- γ -liase (McKie *et al.*, 1998).

Coombs e colaboradores (2004) relataram a existência do sistema tiorredoxina – tiorredoxina redutase e tiorredoxina peroxidase - que atuam em conjunto, detoxificando

agentes oxidantes potenciais. Além de possuírem a capacidade de converter cistina em cisteína, colaborando assim com a manutenção dos níveis de tióis intracelulares, também foi demonstrado por esses autores que *Trichomonas vaginalis* responde a alterações do meio, que levariam ao aumento nos níveis de estresse oxidativo, regulando positivamente a expressão dessas enzimas, o que demonstra a importância delas no equilíbrio redox do parasito.

Esses parasitos também possuem a enzima superóxido dismutase (responsável pela conversão de superóxido em peróxido de hidrogênio e água) (LINDMARK & MULLER, 1974; VISCOGLIOSI *et al.*, 1998). Cepas resistentes ao metronidazol (tanto *in vivo* como *in vitro*), de *T. Vaginalis*, apresentam atividade aumentada desta enzima (Rosoloso *et al.*, 2001), evidenciando que defesas antioxidantes estão relacionadas com os mecanismos de resistência dos parasitos, comprovando então a importância desses mecanismos na sobrevivência deles.

1.6 Quimioterapia

O tratamento da tricomoníase está baseado no uso do metronidazol (5-nitroimidazóis), droga disponibilizada nos anos 60, utilizada para o tratamento da tricomoníase, da amebíase, da giardíase e de infecções por bactérias anaeróbicas. O fármaco é uma pró-droga ativada no hidrogenossomo dos tricomonádídeos.

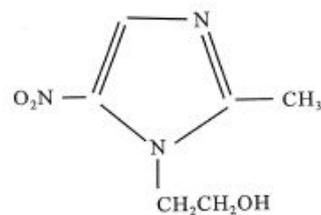


Figura 5: Estrutura química do metronidazol. Kulda, 1999.

O efeito do fármaco ocorre após a sua redução, levando à liberação de radicais citotóxicos dentro das células-alvo (EDWARDS, 1993).

Na presença do metronidazol (este age como aceptor preferencial dos elétrons), esses elétrons são transferidos para a droga, que acaba tendo o seu grupamento nitro reduzido, tornando-se tóxico para as células (KULDA, 1999).

Embora o Metronidazol seja uma droga bastante efetiva contra microorganismos

anaeróbicos (bactérias e protozoários), o uso intensivo deste medicamento vem gerando muitos casos refratários e o desenvolvimento de organismos resistentes (CROWELL *et al.*, 2003).

A pouca disponibilidade de drogas efetivas contra os parasitos tem acarretado sérios problemas.

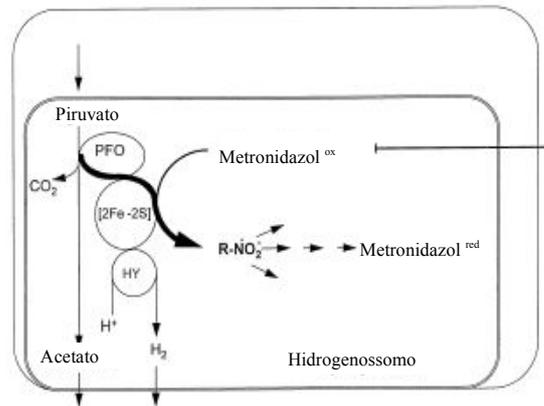


Figura 6: Ativação do metronidazol em tricomonádídeos. Adaptado de Kulda, 1999.

A resistência por parte do parasito pode ocorrer devido a falhas durante o tratamento, o que é chamado de resistência aeróbica. Também existem algumas cepas com resistência anaeróbica (DUNNE, 2003).

A resistência aeróbica só ocorre na presença de pequenas quantidades de oxigênio. A presença de oxigênio intracelular pode interferir na ativação da droga. Re-oxidação do grupo nitro e remoção competitiva dos elétrons por parte do oxigênio surgem como possíveis mecanismos (KULDA, 1999).

Rosolonson e colaboradores (2002) descreveram que cepas resistentes ao metronidazol apresentam aumentada suscetibilidade ao oxigênio, bem como um incremento na atividade da enzima superóxido dismutase.

Com relação à resistência anaeróbica, tipo de resistência desenvolvida em laboratório, as cepas suprimem a via que a droga usa para a sua ativação, levando assim à eliminação de qualquer efeito da droga sobre os parasitos. Essas cepas deixam de expressar a enzima piruvato:ferredoxinaoxidoreductase (KULDA, 1999). Esse tipo de resistência já foi observado em alguns isolados clínicos de *Trichomonas vaginalis* (DUNNE, 2003).

Trichomonas vaginalis

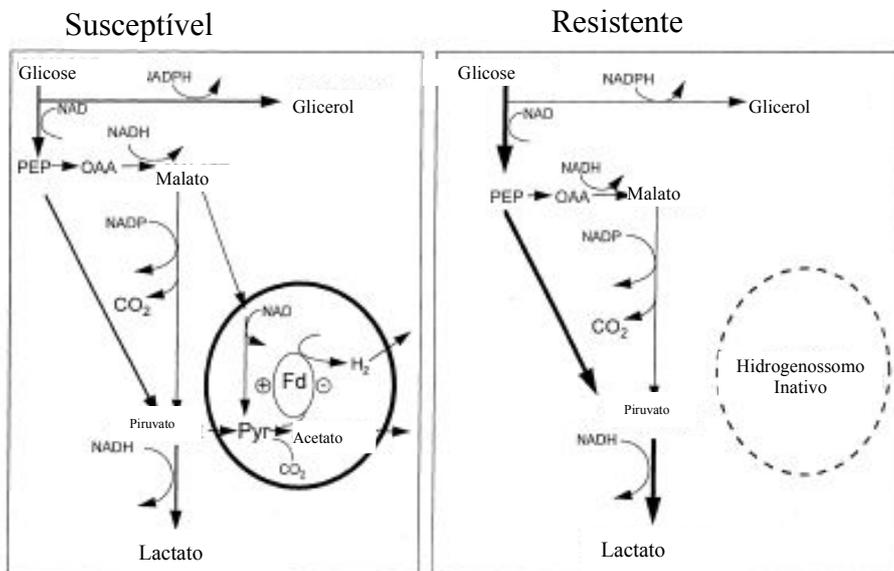


Figura 7: Mecanismo de resistência anaeróbica ao metronidazol por *Trichomonas vaginalis*. Adaptado de Kulda, 1999.

Tritrichomonas foetus

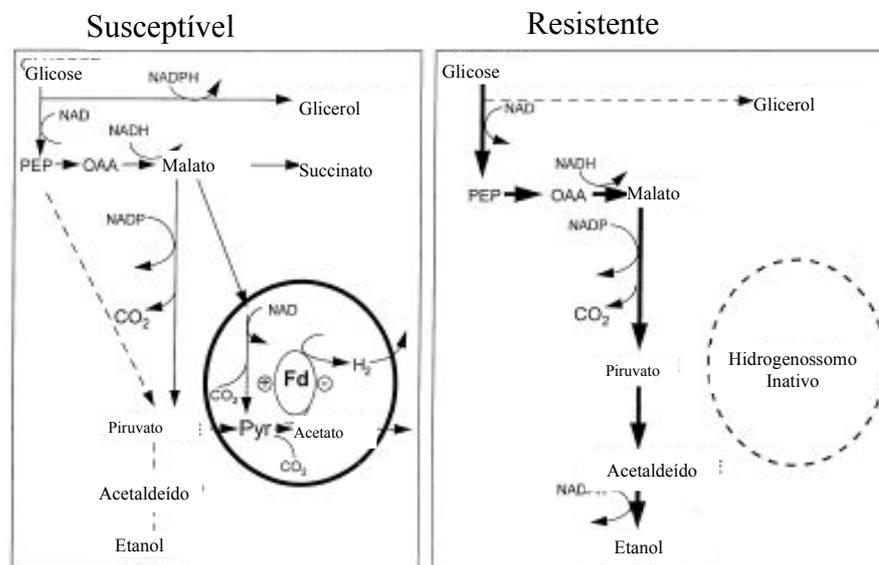


Figura 8: Mecanismo de resistência anaeróbica ao metronidazol por *Tritrichomonas foetus*. Adaptado de Kulda, 1999.

Além dos problemas relacionados à resistência, o metronidazol está sendo correlacionado com casos de câncer. Estudos com camundongos apontaram o efeito

carcinogênico potencial do metronidazol. Camundongos tratados com a droga desenvolverem número elevado de tumores de pituitária e testicular (machos) e hepatomas e tumores mamários (fêmeas) (RUSTIA & SHUBIK, 1979) Também foram observados em camundongos BALB/c a formação de tumores de pulmão e de linfomas, respectivamente, em machos e fêmeas (CAVALIERE *et al.*, 1984).

Com relação a humanos, os dados existentes na literatura são descritos como ambíguos (BENDESKY *et al.*, 2002). BEARD e colaboradores (1988) analisaram o aparecimento de câncer em pacientes tratados e não tratados com metronidazol e observaram um incremento da incidência de câncer no grupo dos tratados, entretanto somente o câncer de pulmão mostrou resultados significativos. Após fazer o ajuste para pacientes fumantes, o câncer pulmonar continuou mostrando significância.

Um Grupo Cooperativo em Saúde (GHC) acompanhou pessoas tratadas ou não pelo metronidazol após 7, 12 e 15 anos do tratamento e comparou com o aparecimento de câncer. Análises estatísticas não comprovaram diferença significativa entre os grupos. Entretanto, observando a figura é possível visualizar uma tendência ao aumento da diferença entre os grupos com o passar do tempo e, possivelmente, um estudo mais prolongado mostraria diferença estatística significativa. (BENDESKY *et al.*, 2002).

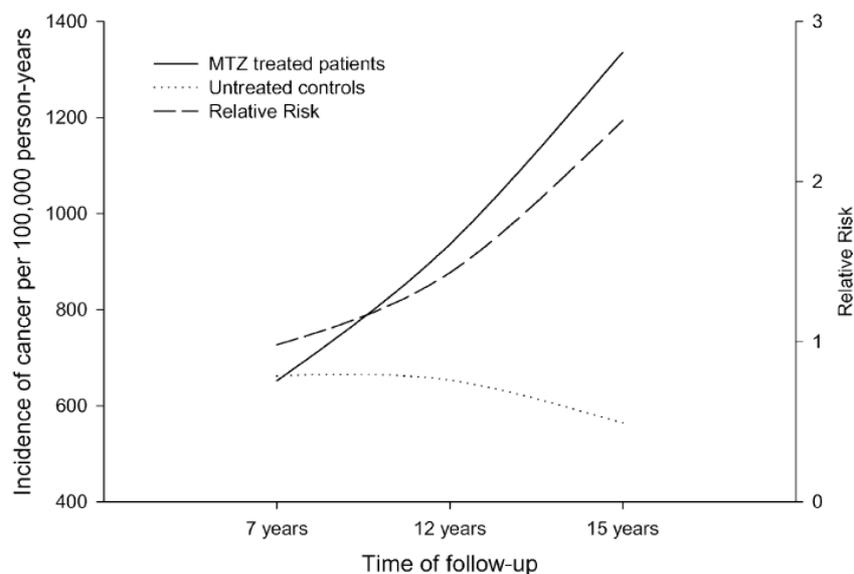


Figura 9: Tempo de acompanhamento após o uso do MTZ versus incidência de câncer e risco relativo de desenvolver câncer.

BENDESKY *et al.*, 2002.

Pelo exposto, fica clara a necessidade de buscar novas alternativas quimioterápicas para o tratamento da tricomoníase, gerando assim uma diminuição na exposição ao metronidazol, bem como a possibilidade de cura para pacientes com cepas resistentes.

1.7 Dietilditiocarbamato de sódio (DETC)

O dietilditiocarbamato é o primeiro metabólito do dissulfiram (droga utilizada no tratamento do alcoolismo nos últimos 50 anos), em mamíferos, e é um agente seletivo para carbamilação de proteínas nos grupos sulfidril (NAGENDRA *et al.*, 1997).

Os ditiocarbamatos demonstram atividade antioxidante e quelantes de metais (SOMERS *et al.*, 2000 em). Eles são reconhecidos células eucarióticas por sua capacidade de inativar a enzima superóxido dismutase (SOD – Cu/Zn), ligando-se ao cobre e removendo-o do sítio ativo da enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

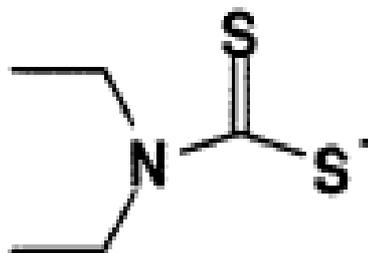


Figura 10: Estrutura química do DETC.

O DETC pode exercer diversas propriedades. Além de quelar íons cobre e atuar como supressor de radicais livres, este composto inibe a SOD, promovendo danos mediados por superóxido (O_2^-), bem como liga-se a proteínas ricas em tiol, formando pontes dissulfeto, inibindo, assim, possíveis mecanismos antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A busca de novas terapias nos leva a abordar a possibilidade de sinergismo entre drogas, melhorando a eficácia delas mesmo em menores concentrações, diminuindo, portanto, os efeitos colaterais de ambas. Neste sentido, sistemas reguladores de estresse oxidativo surgem como um possível alvo. A enzima superóxido dismutase, responsável pela catálise da

dismutação do radical livre superóxido (O_2^-), já foi descrita em tricomonadídeos. Tal atividade pode estar correlacionada à suscetibilidade aos 5-nitroimidazóis, como o metronidazol (RASOLOSON *et al.*, 2002). Além disso, a resistência ao metronidazol pode ser associada à suscetibilidade a radicais oxidantes (ELLIS *et al.*, 1994), indicando que o estresse oxidativo pode proporcionar novas estratégias terapêuticas na tricomoníase.

2. OBJETIVO

2.1 GERAL

➡ Encontrar novos alvos farmacológicos relacionados com estresse oxidativo e usá-los como ferramentas terapêuticas contra os tricomonádídeos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar os efeitos do DETC (dietilditiocarbamato) no crescimento celular dos protozoários *T. vaginalis* e *T. foetus*;
- Avaliar os efeitos do DETC na ultraestrutura dos protozoários;
- Verificar a existência de efeito sinérgico ou aditivo entre o DETC e o metronidazol;
- Avaliar os efeitos da combinação das drogas sobre o crescimento e ultra-estrutura dos protozoários;
- Identificar possíveis alvos do DETC nos protozoários;
- Avaliar o estresse oxidativo produzido pelas drogas através das quantificações da peroxidação lipídica e quimioluminescência.

3. JUSTIFICATIVA

Tricomonádídeos (*Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus*) são responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis de alta incidência e prevalência.

Nos bovinos, *T. foetus* apresenta alta relevância econômica dada o alto índice de abortos e intervalos prolongados entre partos prolongados (PELLEGRIN, 1999). As doenças que afetam o trato reprodutor de bovinos contribuem para os baixos níveis reprodutivos da pecuária brasileira. A tricomonose é uma doença de maior frequência em países onde o controle sanitário é deficiente, entretanto ela continua sendo frequente em áreas do oeste americano, onde é praticada a pecuária de corte com monta natural e alcança índices que variam de 5,0 a 40% (PELLEGRIN & LEITE, 2007).

O *Trichomonas vaginalis* é um protozoário bastante comum em todo o mundo. Sabe-se que o risco da tricomoníase aumenta com a idade. Entretanto, segundo estudos recentes, há um número considerável de casos surgindo entre adolescentes e mulheres jovens, e casos de reinfecção têm sido bastante comuns (van der POOL *et al.*, 2005). A doença também está relacionada com severas complicações, como o aumento significativo no risco de desenvolvimento de câncer cervical e de infecção pelo HIV (Van Der Pol *et al.*, 2006).

Outro grave problema está no fato de que o único fármaco disponível para o tratamento da doença tem efeito potencialmente carcinogênico (BENDESKY *et al.*, 2002). Além disso, tem aumentado o número de casos refratários provocados por parasitos resistentes.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais: Camundongos (*Mus musculus*) Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

4.2 Obtenção da cultura de *Tritrichomonas foetus* e *Trichomonas vaginalis* : As cepas K de *T. foetus* e JT de *T. vaginalis* foram mantidas em meio TYM (para *T. foetus* – 200mL: 4g de caseína, 2g de extrato de levedura, 1g de d-maltose, 0,2g de cisteína, 0,2g de cloreto de potássio, 0,2g de carbonato de potássio monobásico, 0,16g de fosfato de potássio monobásico, 0,16g de fosfato de potássio dibásico e 0,02g de sulfato ferroso e o pH 6,6, após autoclavação é adicionado 100µL/mL de ácido ascórbico a 0,2g/mL. Para *T. vaginalis* – 200mL: 4g de caseína, 2g de extrato de levedura, 1g de d- maltose, 0,2g de cisteína, 0,04g de ácido ascórbico, 0,16g de fosfato de potássio monobásico, 0,16g de fosfato de potássio dibásico o pH 6,6), suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C em estufa a 5% CO₂, com repiques realizados a cada 48hs.

4.3 Proliferação Celular: As células foram repicadas no dia anterior ao experimento. Inóculos de 10⁵ células de *T. foetus* e de *T. vaginalis* foram incubados a 37°C em estufa de 5% de CO₂, em presença ou ausência de diferentes concentrações das drogas. Amostras para determinação da densidade celular foram retiradas com 24 horas após a incubação, através da centrifugação a 250 x g por 10 minutos (antes da centrifugação, os tubos contendo *Trichomonas vaginalis* foram incubados a 0–2°C para o desprendimento das células da parede do tubo). As células foram fixadas em 0,1% de formol e contadas em câmara de Neubauer em microscopia óptica de contraste de fase.

4.4 Avaliação da citotoxicidade em linfócitos: Inóculos de 1 x 10⁶ esplenócitos retirados de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 µL de [³H]-timidina/poço, de forma a obter uma concentração de 1 µCi/poço, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as

células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador β Matrix 9600.

4.5 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos: Macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos através de lavagem peritoneal com meio RPMI 1640 gelado, e plaqueados em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, e os macrófagos não aderidos foram removidos por lavagem com PBS. Foi adicionado à monocamada meio RPMI suplementado com 10% SFB, sendo mantidas nas mesmas condições. A citotoxicidade para os macrófagos foi avaliada *in vitro* e a viabilidade celular, mensurada a partir da análise da atividade mitocondrial das células, através do método da redução do 3-(4,5 dimetil tiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolio (MTT) após 24 horas de exposição à droga.

4.6 Determinação do FIC: Para a determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) e posterior determinação do tipo de associação entre as drogas, foram realizados ensaios de proliferação celular, variando alternadamente a concentração de cada composto em combinação com o IC₅₀ do outro. A partir daí foi calculado o IC₅₀ da combinação das drogas e posteriormente estes resultados foram colocados na seguinte fórmula:

$$FIC = \frac{IC_{50} \text{ combinação AB}}{IC_{50} \text{ de A}} + \frac{IC_{50} \text{ combinação BA}}{IC_{50} \text{ de B}}$$

Resultados abaixo de 0,5 caracterizam efeito sinérgico.

4.7 Peroxidação lipídica: As células foram pré-incubadas em presença ou ausência do DETC 100µM, metronidazol 100µM e da combinação destes compostos. Após o tratamento, as células foram centrifugadas a 250 x g por 10 minutos e lavadas 3 vezes em PBS (salina tamponada com fosfato). Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 200µL do mesmo tampão. 200µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) a 1% foi adicionado para posterior incubação a 100°C por um período de 3 horas. As

substâncias reativas ao TBA (TBARS) foram mensuradas em espectrofotômetro a 532 nm.

4.8 Microscopia Eletrônica de Transmissão: Após o tratamento com as drogas, as amostras foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de Sódio 0,1M, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5mM ao abrigo da luz por 40 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os parasitos foram lavados no mesmo tampão e desidratados em concentrações crescentes de acetona (30 – 100%) por 10 minutos em cada. As amostras foram infiltradas e emblocadas em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização, cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo e coletados em grades de cobre de malha 400. Os cortes contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV.

4.9 Detecção de tióis totais: Inóculos de 10^5 de *Trichomonas vaginalis* foram incubados a 37°C em estufa de CO₂, em tubos de 15 mL, por 24 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC. Em seguida, as células foram centrifugadas a 250 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão tris-HCl 30 mM com EDTA 3 mM, pH 8,2. 20 µL da amostra foram adicionados a 75 µL do mesmo tampão, 25 µL do reagente DTNB e 400 µL de metanol, sendo após centrifugado a 1500 x g por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

4.10 Microscopia de fluorescência: Células foram fixadas por 30 min a 4°C em uma solução contendo 4% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Após a fixação, as células foram aderidas às lamínulas (previamente lavadas com extran neutro, submersas em álcool 70%), colocadas em placas de Petri e recobertas com solução de 0,1% de poli-L-lisina em PBS, pH 7,2, por 10 minutos e secas em estufa a 37 °C, lavadas em água destilada e novamente postas para secar. As células foram aderidas por 30 minutos e incubadas em 50 µM de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, passaram por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propil-galato e observadas no

microscópio de fluorescência Olympus BX51.

4.11 Quimioluminescência: Inóculos de 10^7 células de *T. vaginalis* e de *T. foetus* foram colocados em placas de Petri plásticas de 35x10mm, estéreis, em tampão HBSS. As leituras foram realizadas em presença ou ausência das drogas e do luminol. As drogas foram adicionadas na hora de leitura, DETC a $100\mu\text{M}$, metronidazol a $100\mu\text{M}$ e a combinação das drogas. A quimioluminescência foi medida em um dispositivo equipado com um tubo fotomultiplicador de 5cm de diâmetro com um cátodo de arseneto de gálio (o mais sensível disponível). Este tubo foi especialmente selecionado na linha de produção, pelo fabricante, para ter uma contagem de ruído inferior a 12 fótons por segundo e uma resposta linear de 200nm a 800nm. O tubo opera em um sistema refrigerado, pelo processo Peltier a ($- 20^\circ \text{C}$). Ligado a este sistema está uma câmera condicionada para trabalhar a 37°C e com capacidade de contar quatro placas de Petri simultaneamente, com possibilidade de injeção de agonistas/antagonistas e realização de análises em tempo real. As células analisadas em condições assépticas podem ser contadas por tempo indeterminado e reutilizadas. O sinal originado do sistema é processado por um amplificador/discriminador extremamente sensível acoplado a um computador. A câmera tem um sistema de espelhos e lentes que permite a captação de fótons em uma geometria aproximada de 4π . A sensibilidade do sistema é de aproximadamente 1018ergs (NORONHA-DUTRA, comunicação pessoal).

4.12 Detecção de espécies reativas: Trofozoítos de *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus* foram incubados a 37°C em estufa de CO_2 , em tubos de 6mL, por 2 horas, na presença de DETC $100\mu\text{M}$, metronidazol $100\mu\text{M}$ ou combinação. Em seguida, as células foram lavadas com HBSS, pH 7,2 por centrifugação a $250 \times g$ por 10 minutos e incubadas por 30 minutos em 1 mL do mesmo tampão contendo $25 \mu\text{M}$ da sonda fluorescente H_2DCFDA - 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato- (Molecular Probes). Após a incubação, os trofozoítos foram lavados três vezes e imediatamente analisados por citometria de fluxo.

4.13 Análise estatística: Os dados obtidos foram representados como a média \pm

desvio padrão e analisados estatisticamente pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três repetições independentes. Os gráficos apresentados neste trabalho são todos representativos de três experimentos realizados em triplicata.

4.14 Substâncias Utilizadas: DETC (dietildithiocarbamato) Sigma. O DETC utilizado em todos os experimentos foi nascente (recém-preparado). Metronidazol – Farmanguinhos. O Metronidazol foi preparado previamente. Diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) a 80%. Luminol – Sigma. H₂DCFDA - 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato – Molecular Probes. *o*-phthaldialdeído (OPA) – Molecular Probes.

5 – RESULTADOS

5.1 – Crescimento celular dos protozoários em estufa de CO₂

Foram realizados experimentos de proliferação axênica para verificar a adaptação das células em estufa de CO₂ e determinar qual o momento ideal da coleta dos pontos das curvas de crescimento. O ponto máximo de crescimento dos protozoários (tanto *T. foetus* – Fig. 11 quanto *T. vaginalis* – Fig. 12) foi observado em 36 horas. A partir daí, ficou determinado que o tempo ideal para a coleta das amostras seria em 24 horas. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

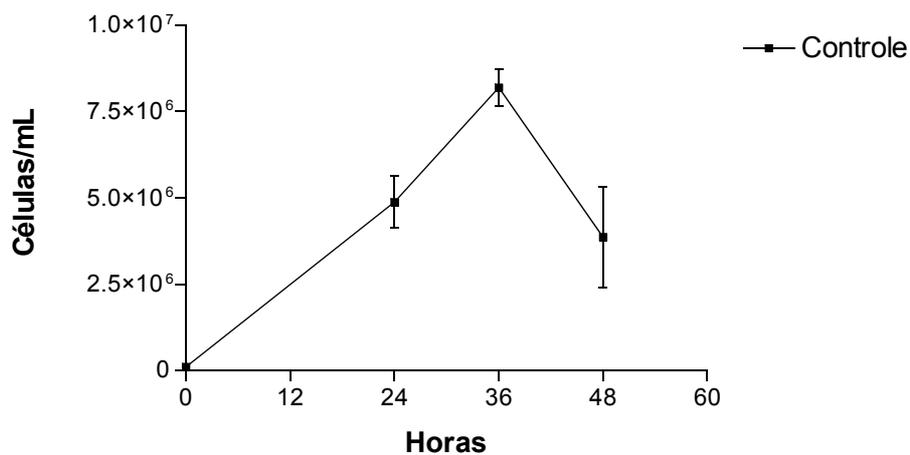


Figura 11- Crescimento de *Trichostrongylus foetus* em estufa de CO₂: Inóculos de 10⁵ células por mL de *T. foetus* foram incubados por 48 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. As coletas para contagem do número de células foram realizadas a cada 12 horas.

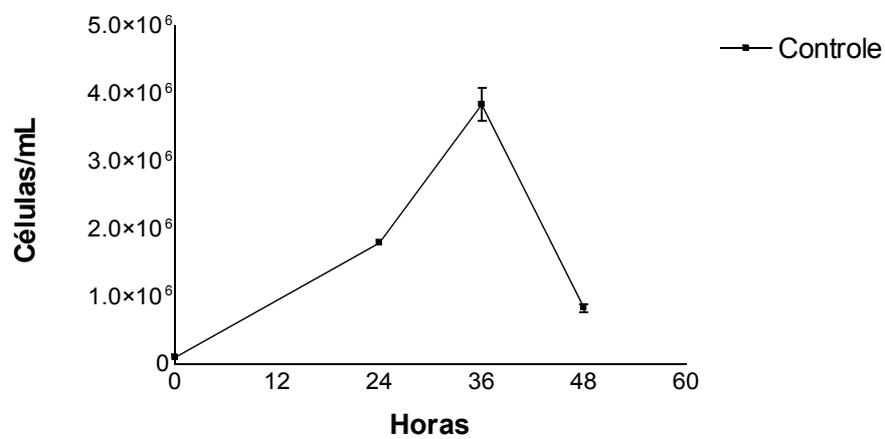


Figura 12-Crescimento de *Trichomonas vaginalis* em estufa de CO₂. Inóculos de 10^5 células por mL de *T. vaginalis* foram incubados por 48 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. As coletas para contagem do número de células foram realizadas a cada 12 horas.

5.2 - Determinação do IC₅₀ do DETC para *T. foetus* e *T. vaginalis*

Para determinar o IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento das células) do DETC nos protozoários foram realizadas curvas de crescimento com 5 (cinco) concentrações diferentes da droga. A partir daí, foi feito o cálculo do IC₅₀ para cada protozoário, usando o Programa GRAPHPAD.PRISM.4.0. Foi verificado que o IC₅₀ para *T. foetus* foi de 497,8nM (Fig. 13) e para *T. vaginalis* foi de 269,7nM (Fig. 14). Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

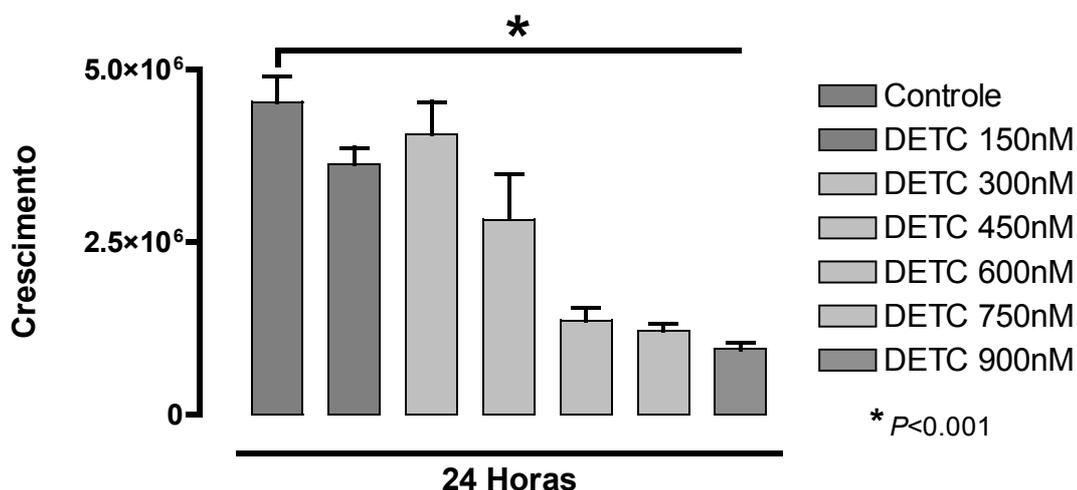


Figura 13- Determinação do IC₅₀ do DETC em *Trichomonas foetus*: Inóculos de 10⁵ células por mL de *T. foetus* foram incubados na presença de diferentes concentrações do DETC nascente por 24 horas. A contagem de células para determinação do IC₅₀ foi feita por microscopia de contraste de fase.

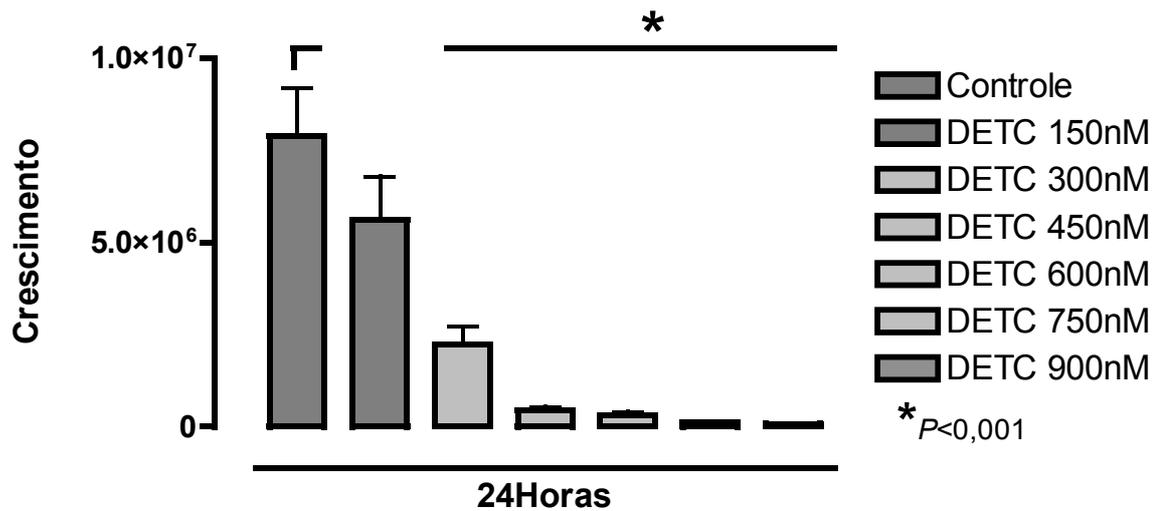


Figura 14- Determinação do IC_{50} do DETC em *Trichomonas vaginalis*: Inóculos de 10^5 células por mL de *T. vaginalis* foram incubados na presença de diferentes concentrações do DETC nascente por um período de 24 horas. A contagem de células para determinação do IC_{50} foi feita por microscopia de contraste de fase.

5.3 - Determinação do IC₅₀ do metronidazol para *T. foetus* e *T. vaginalis*

Para verificar o IC₅₀ do Metronidazol nos protozoários, foram realizadas curvas de crescimento com 5 (cinco) concentrações diferentes da droga. Foi verificado que o IC₅₀ para *T. foetus* foi de 459,7 nM (Fig. 15) e para *T. vaginalis* foi de 523,1nM (Fig. 16). Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

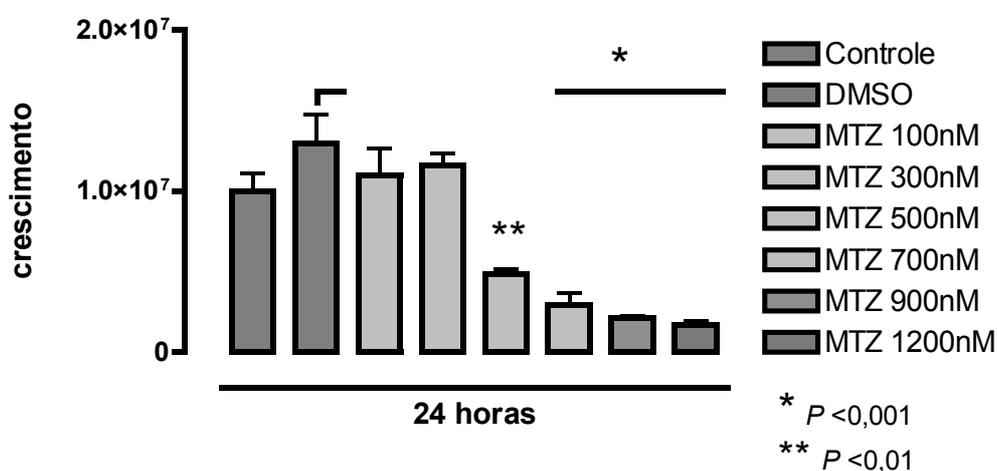


Figura 15- Determinação do IC₅₀ do metronidazol para *Tritrichomonas foetus*: Inóculos de 10^5 células por mL de *T. foetus* foram incubados na presença de diferentes concentrações do metronidazol por um período de 24 horas. A contagem de células para determinação do IC₅₀ foi feita por microscopia de contraste de fase.

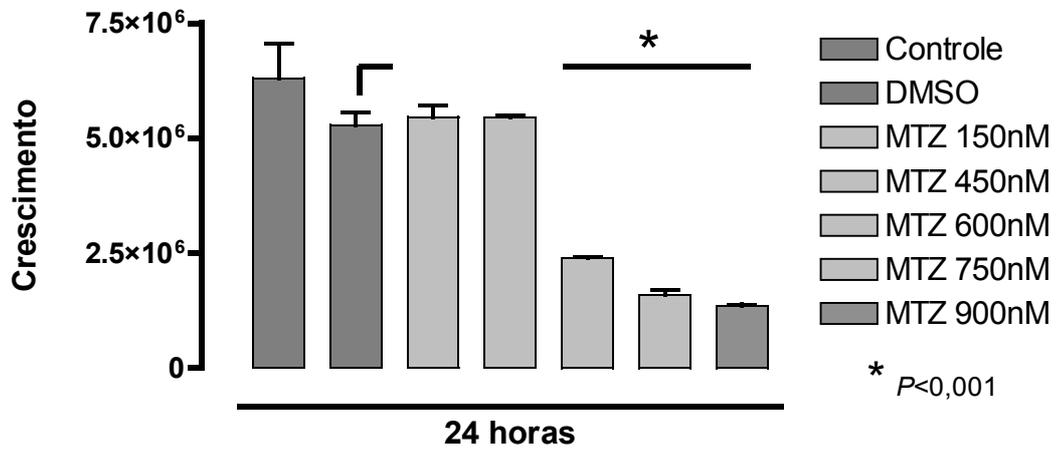


Figura 16- Determinação do IC_{50} do metronidazol para *T. vaginalis*: Inóculos de 10^5 células por mL de *Trichomonas vaginalis* foram incubados na presença de diferentes concentrações do metronidazol por um período de 24 horas. A contagem de células para determinação do IC_{50} foi feita por microscopia de contraste de fase.

5.4 - Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos

Foi avaliada a citotoxicidade, através da técnica de incorporação por [³H]Timidina, das drogas testadas (tanto o metronidazol quanto o DETC) em linfócitos de camundongos BALB/C. Para o DETC (Fig. 17), somente a concentração de 1000μM demonstrou um efeito inibitório significativo. Já para metronidazol (Fig. 18), não foi observado efeito citotóxico significativo nas concentrações testadas. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

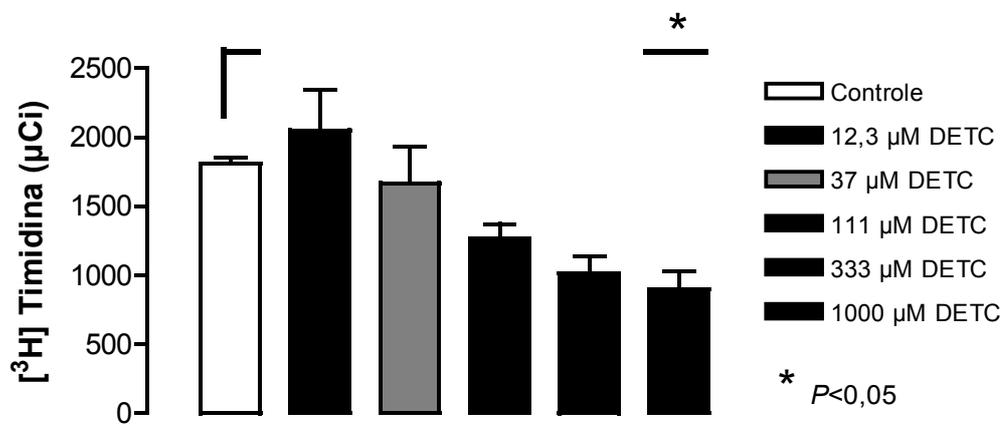


Figura 17- Avaliação da citotoxicidade do DETC em esplenócitos: Inóculos de 1×10^6 esplenócitos de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 μL de [³H]-timidina/poço, na presença de diferentes concentrações do DETC. Após 24 horas foi realizada a contagem de radioatividade incorporada.

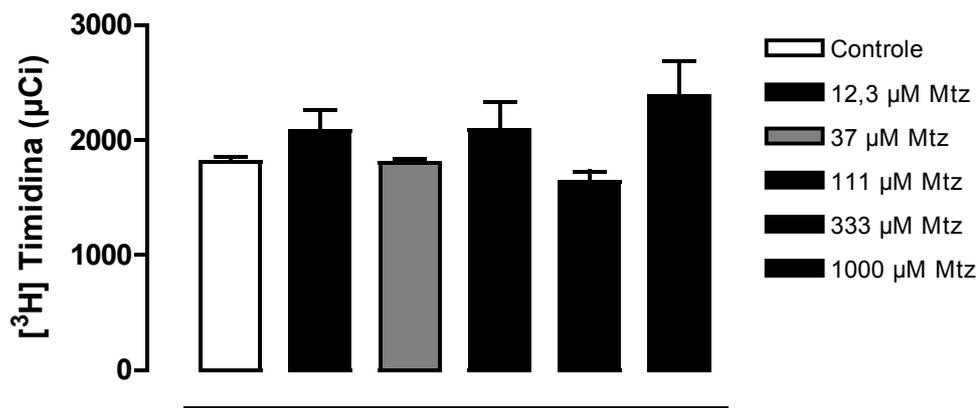


Figura 18- Avaliação da citotoxicidade do metronidazol em esplenócitos: Inóculos de 1×10^6 esplenócitos de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10 μ L de [³H]-timidina/poço, na presença de diferentes concentrações do metronidazol. Após 24 horas foi realizada a contagem de radioatividade incorporada.

5.5 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

Foi avaliada a citotoxicidade do DETC, através da técnica de MTT, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C. Foi observado que a incubação com o DETC não interferiu na redução do MTT nas concentrações testadas. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

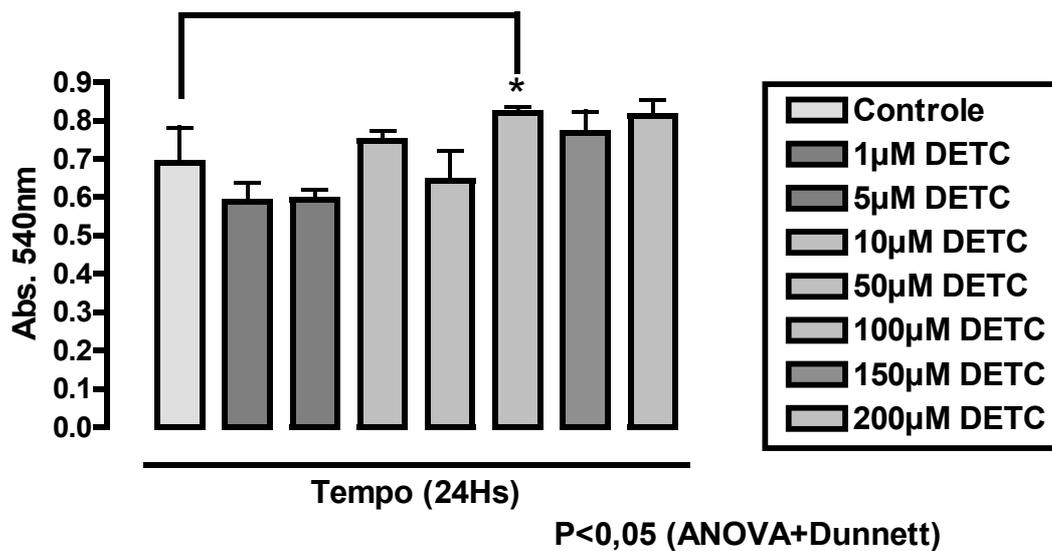


Figura 19- Avaliação da citotoxicidade do DETC em macrófagos: Macrófagos de camundongos BALB/c foram obtidos de lavagem peritoneal com meio RPMI 1640 gelado, e plaqueados em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas por 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A citotoxicidade para os macrófagos foi mensurada a partir da análise da atividade mitocondrial das células através do método da redução do 3-(4,5 dimetil tiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazólio (MTT) após 24 horas de exposição à droga.

5.5 - Determinação do FIC para *Tritrichomonas foetus*

A fim de verificar o tipo de associação entre o DETC e o metronidazol foram realizados experimentos combinando o IC₅₀ das drogas. A partir deste experimento, foi calculado o IC₅₀ da combinação das drogas. Para o DETC, o IC₅₀ da combinação foi de 223,9nM (Fig.20). Para o metronidazol, o IC₅₀ da combinação foi de 140,7nM (Fig. 21). A partir daí, foi realizado o cálculo do FIC (Concentração Inibitória Fracionada) e verificado que o FIC da combinação para *T. foetus* foi de 0,7. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

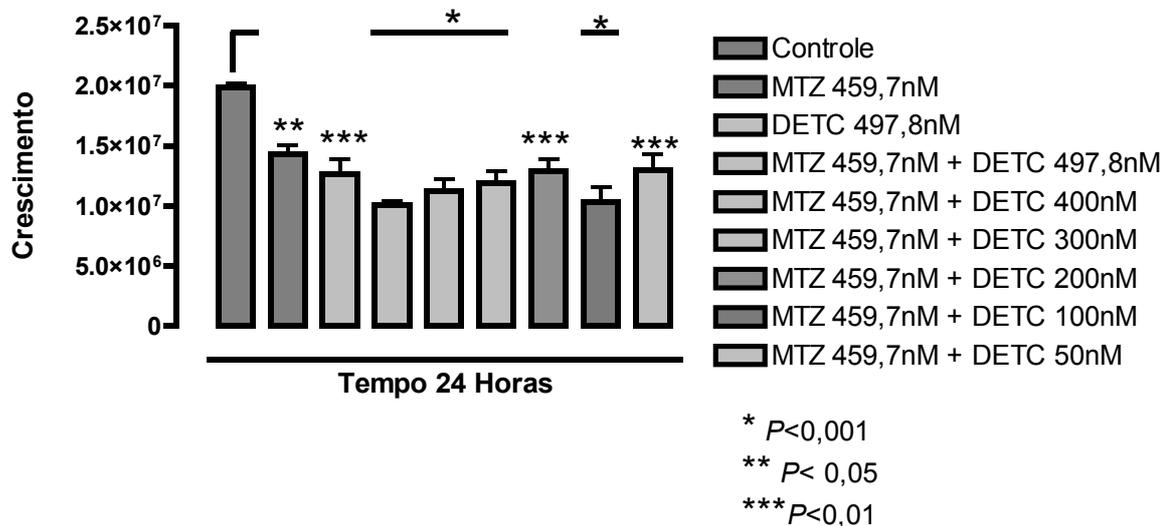


Figura 20 - Determinação do FIC para *Tritrichomonas foetus*:

Inóculos de 10^5 células por mL de *T. foetus* foram incubados com o IC₅₀ do metronidazol e variadas concentrações do DETC por 24 horas. Foi realizada a contagem das células, por microscopia óptica, para determinação do FIC.

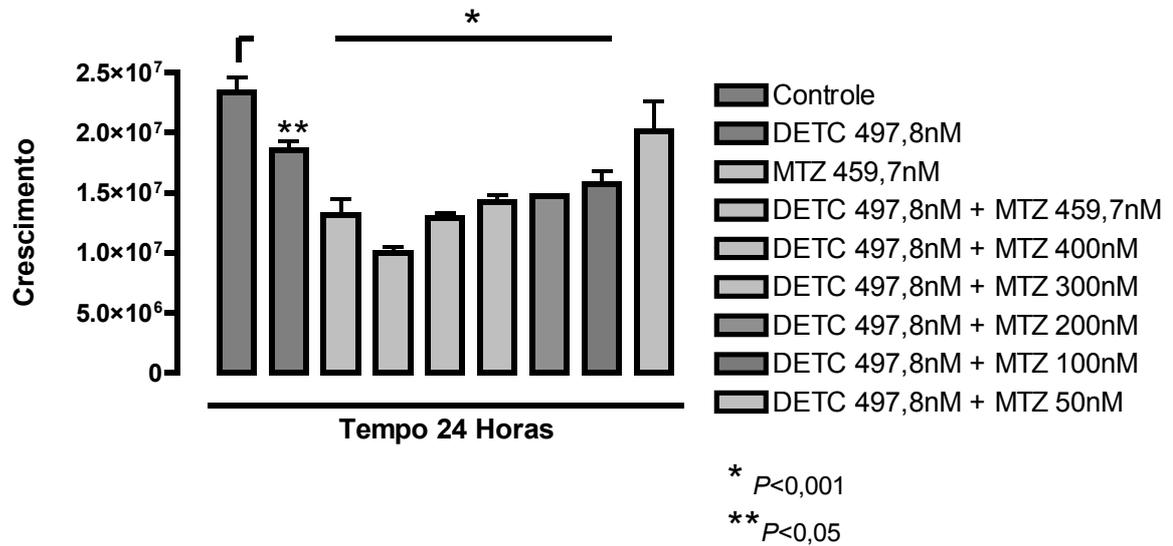


Figura 21 - Determinação do FIC para *Trichostrongylus axei*:

Inóculos de 10^5 células por mL de *T. axei* foram incubados com o IC_{50} do DETC e variadas concentrações do metronidazol por 24 horas. Foi realizada a contagem das células, por microscopia óptica, para posterior determinação do FIC.

5.6 - Determinação do FIC para *Trichomonas vaginalis*

A fim de verificar o tipo de associação entre o DETC e o metronidazol foram realizados experimentos combinando o IC₅₀ das drogas. A partir deste experimento, foi calculado o IC₅₀ da combinação das drogas. Para o DETC, o IC₅₀ da combinação foi de 35,73nM (Fig.22), e para o metronidazol, o IC₅₀ da combinação foi de 135,7nM (Fig. 23). A partir daí, foi realizado o cálculo do FIC (Concentração Inibitória Fracionada) e verificado que o FIC da combinação para *T. vaginalis* foi de 0,3. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

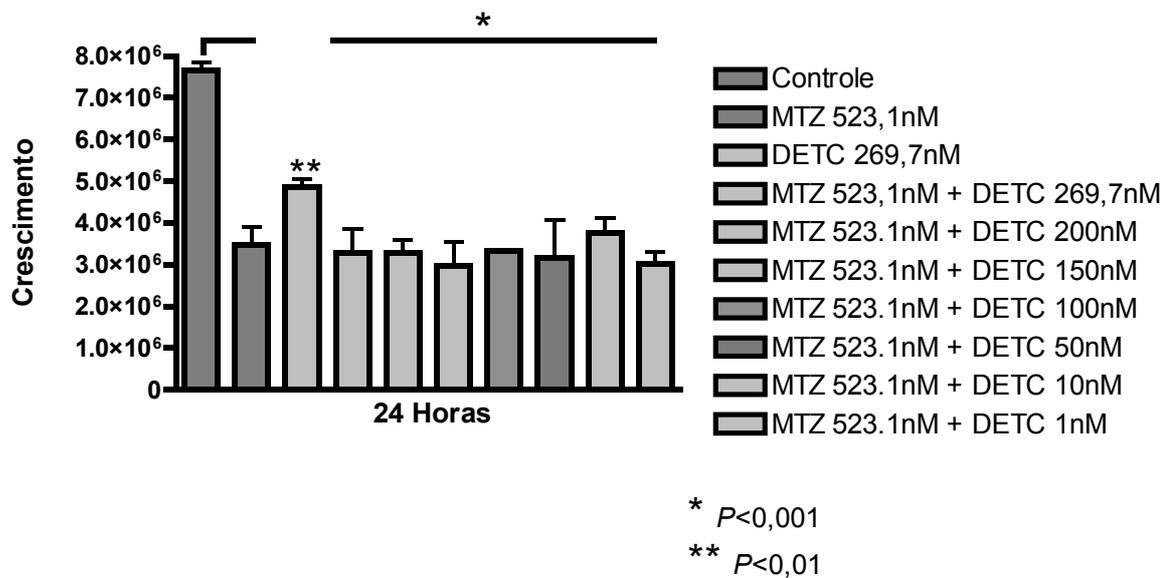
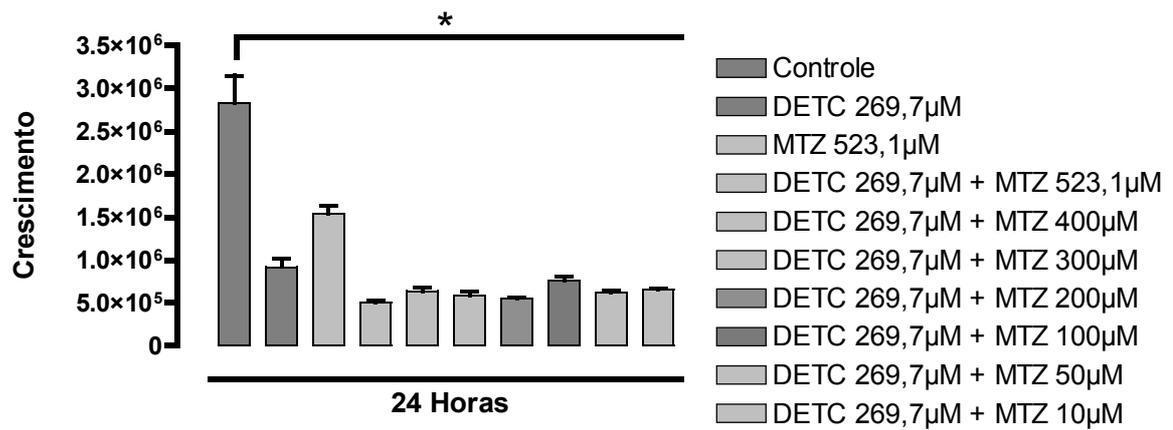


Figura 22 - Determinação do FIC para *Trichomonas vaginalis*: Inóculos de 10⁵ células por mL de *T. vaginalis* foram incubados com o IC₅₀ do metronidazol e variadas concentrações do DETC por 24 horas. Foi realizada a contagem das células, por microscopia óptica, para determinação do FIC.



* $P < 0,001$

Figura 23- Determinação do FIC para *Trichomonas vaginalis*:
 Inóculos de 10^5 células por mL de *T. vaginalis* foram incubados com o IC_{50} do DETC e variadas concentrações do metronidazol por 24 horas. Foi realizada a contagem das células, por microscopia óptica, para determinação do FIC.

5.7 - Detecção de tióis totais

Na tentativa de elucidar possíveis mecanismos de ação do DETC em *Trichomonas vaginalis* foi realizada a detecção de tióis totais através da técnica da reação de Ellman. O protozoário foi incubado na presença e ausência da droga e, a partir daí, foi determinada a concentração total de grupamentos tiol do parasito. De acordo com a observação, o tratamento com o DETC provocou uma diminuição significativa nos níveis de tióis totais da célula (Fig. 24). Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

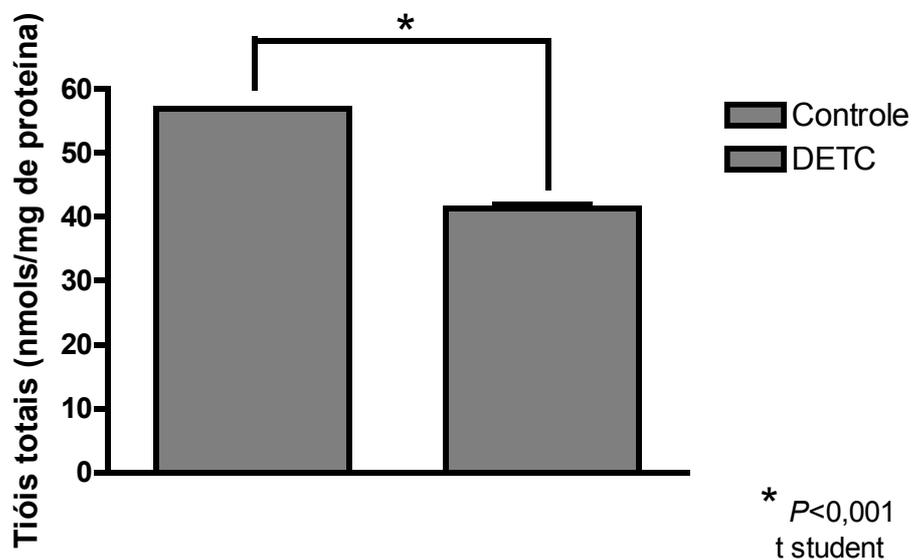


Figura 24- Detecção de tióis totais em *Trichomonas vaginalis*: Inóculos de 10^5 de *T. vaginalis* foram incubados a 37°C em estufa de CO_2 , em tubos de 15 mL, por 24 horas e posteriormente tratados em presença ou ausência de DETC. 20 μL da amostra foram adicionados a 75 μL do mesmo tampão, 25 μL do reagente DTNB e 400 μL de metanol, sendo posteriormente centrifugado a $1500 \times g$ por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 412 nm.

5.8 –Detecção de tióis livres em *Tritrichomonas foetus* por microscopia de fluorescência

Foi realizada a microscopia de fluorescência em *T. foetus*, na tentativa de verificar o efeito do DETC sobre os níveis de tióis presentes neste protozoário. Para isso, as células foram incubadas na ausência e presença do DETC, juntamente com o DETC pré-incubado com a cisteína. As figuras mostram contraste de fase (Fig.25- A, C e E) e fluorescência (Figs.25- B, D e F).

Foi observado por microscopia de fluorescência que o protozoário incubado com o DETC (Fig.25D) teve seus níveis de tióis diminuídos em comparação com as células controle (Fig. 25B). Quando o DETC foi previamente incubado com cisteína (Fig. 25F) e posteriormente adicionado à cultura com o protozoário, a marcação para tióis mostrou-se mais intensa, inclusive do que o controle, o que sugere o envolvimento de resíduos de cisteína no mecanismo de ação da droga. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

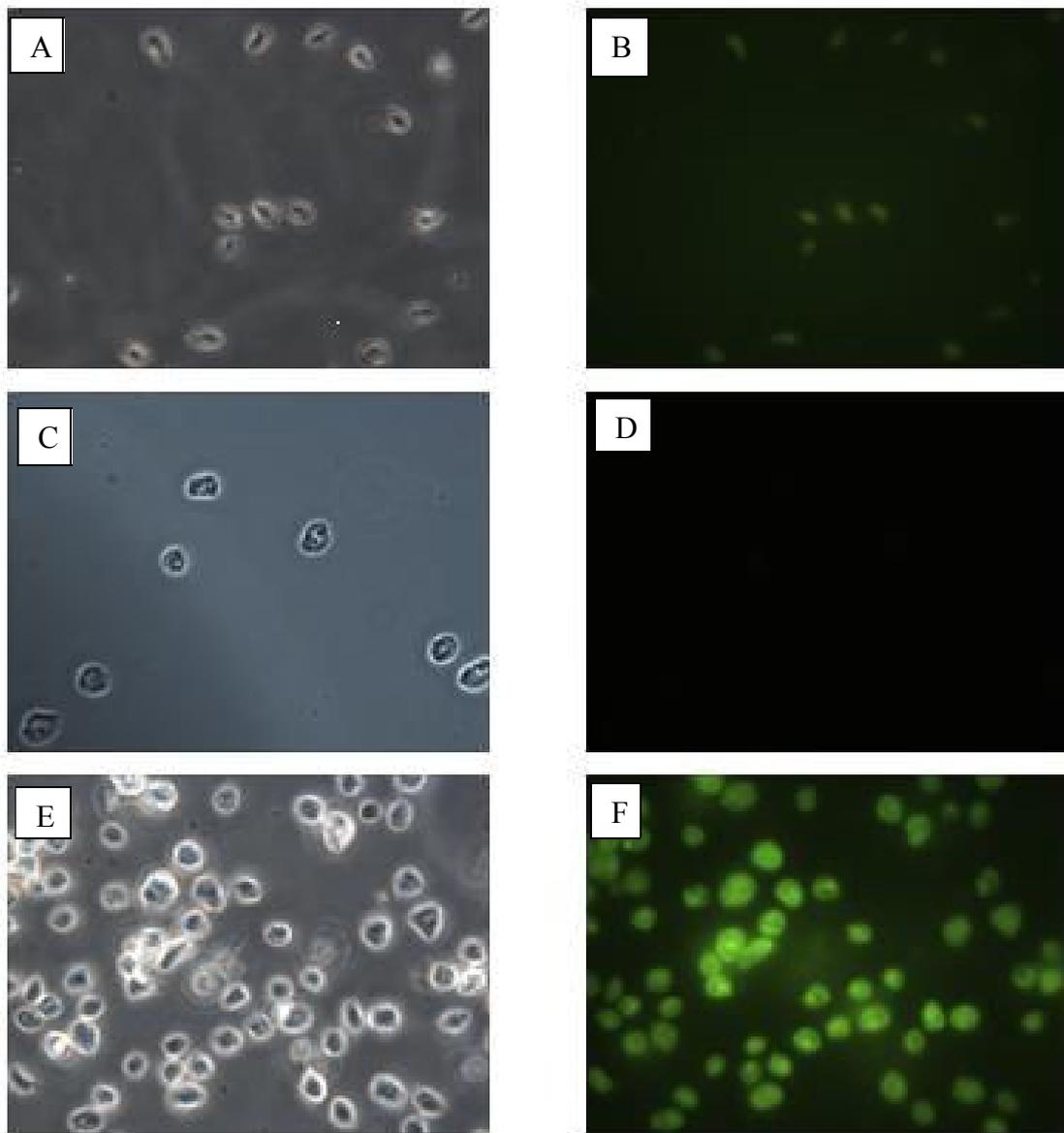
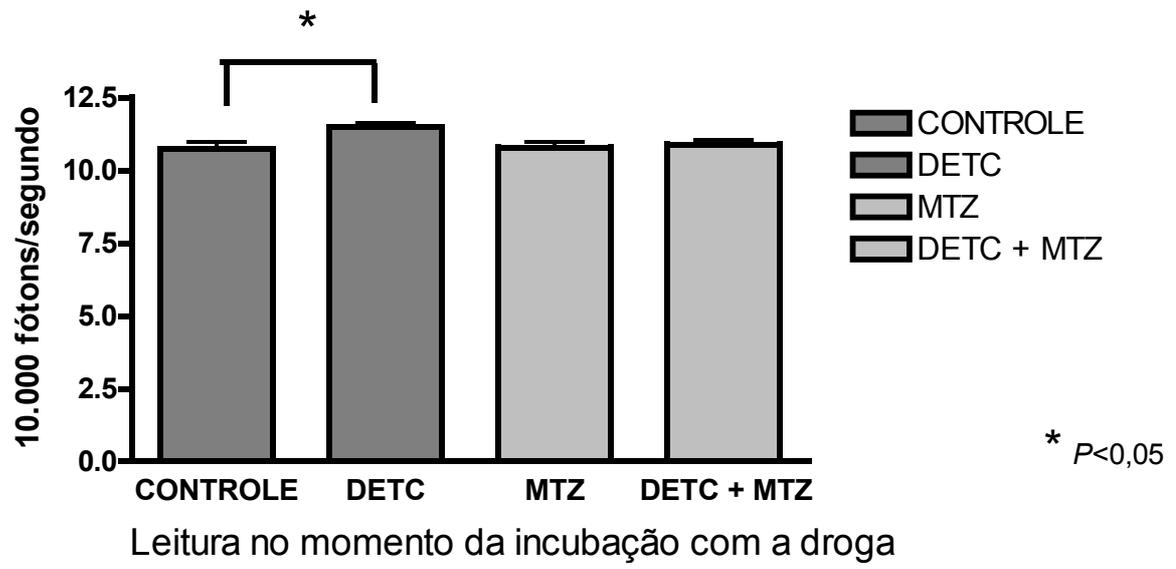


Figura 25 - **Deteção de tióis em *T. foetus*** : Células foram incubadas na ausência (A e B) e presença (Figs. C e D) do DETC a 100 μ M e na presença do DETC pré incubado com cisteína na proporção de 1:2 (E e F). Após a incubação, as células foram fixadas por 30 min a 4°C, em uma solução contendo 4% paraformaldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. Após a fixação, foram aderidas às lamínulas. Após 30 minutos de adesão, foram incubadas em 50 μ M de *o*-phthaldialdeído (OPA) em PBS, por 12 horas a 4°C. Após este tempo, as células passam por sucessivas lavagens, sendo montadas em lâminas com N-propil-galato e observadas no microscópio de fluorescência.

5.9 – Quimioluminescência

Foram realizados experimentos para quantificação da geração de radicais livres através da utilização do luminol para a detecção dos fótons gerados pelo decaimento dos radicais livres. O luminol foi colocado antes para verificar a geração de radicais na ausência da droga, e foi observado que não houve diferença. O tratamento com o DETC em *Trichomonas vaginalis* (Fig.26) ocasionou pequeno, mas significativo, aumento na geração de radicais livres intracelulares, o que não foi observado para o metronidazol e nem para a combinação das drogas. Já em *Tritrichomonas foetus* (Fig. 27) não foi observado nenhum tipo de diferença entre as células controle e as tratadas com as drogas isoladamente e nem em combinação. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

Figura 26 – **Detecção de radicais livres em *Trichomonas vaginalis***: Inóculos de 10^5 de *T. vaginalis* foram incubados a 37°C em estufa de CO₂ por 24 horas. Após isso, inóculos de 10^7 foram colocados em placas de Petri plásticas de 35mm de diâmetro e 10mm de altura, estéreis, em tampão HBSS (2mL). As leituras foram realizadas em presença ou ausência das drogas e do luminol. As drogas foram adicionadas na hora de leitura, DETC a 100µM, metronidazol a 100µM e a combinação delas. A quimioluminescência foi medida em um dispositivo equipado com um tubo fotomultiplicador de 5cm de diâmetro.



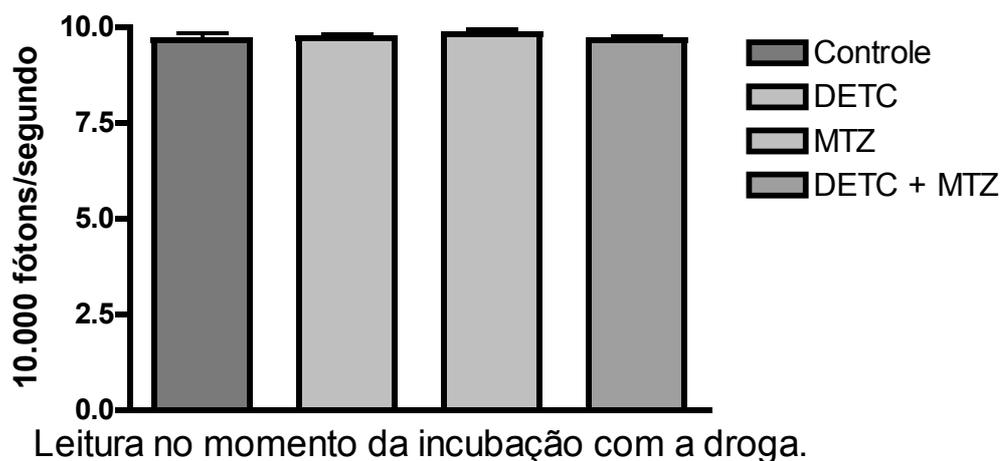


Figura 27 - **Deteção de radicais livres em *Tritrichomonas foetus***: Inóculos de 10^5 de *T. foetus* foram incubados a 37°C em estufa de CO_2 , por 24 horas. Após isso, inóculos de 10^7 foram colocados em placas de Petri plásticas de 35mm de diâmetro e 10mm de altura, estéreis, em tampão HBSS (2mL). As leituras foram realizadas em presença ou ausência das drogas e do luminol. As drogas foram adicionadas na hora de leitura, DETC a $100\mu\text{M}$, metronidazol a $100\mu\text{M}$ e a combinação. A quimioluminescência foi medida em um dispositivo equipado com um tubo fotomultiplicador de 5cm de diâmetro.

5.10 – DOT PLOT

Na tentativa de verificar a geração de espécies reativas intracelulares, foi realizado o

experimento com sonda fluorescente H₂DCFDA. Essa sonda penetra nas células e, em presença de espécies reativas, passa a emitir uma fluorescência que pode ser lida por citometria de fluxo. O experimento foi realizado, entretanto os dados não foram conclusivos.

5.11 – TBARS

No TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitírico) foi avaliada a geração de

peroxidação lipídica, que é uma consequência da geração de radicais livres. Em *T. vaginalis* (Fig. 28), foi observado um aumento gradativo na peroxidação lipídica nos tratamentos DETC, metronidazol e na combinação das drogas, que demonstrou diferença estatística. Em *T. foetus* (Fig. 29), a combinação também demonstrou um aumento maior do que as drogas isoladas. Gráfico representativo de 3 experimentos em triplicata.

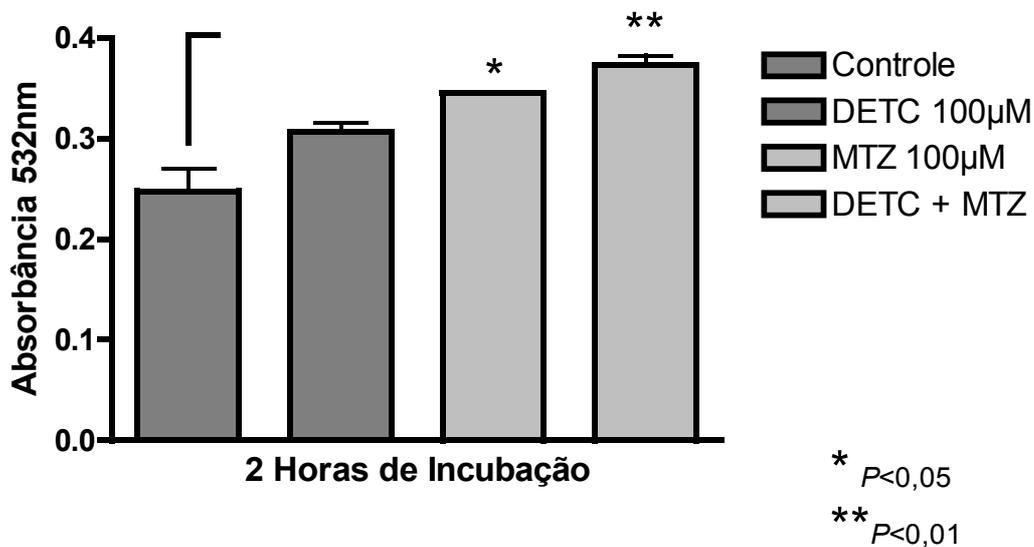


Figura 28 – **TBARS** *Trichomonas vaginalis*: 10^6 células por mL de *T. vaginalis* foram pré-incubadas em presença ou ausência do DETC $100\mu\text{M}$, metronidazol $100\mu\text{M}$ e da combinação destes compostos por 3 horas. Após a lavagem, as células foram ressuspensas em $200\mu\text{L}$ do mesmo tampão. $200\mu\text{L}$ de TBA (ácido tiobarbitúrico) a 1% foi adicionado para posterior incubação a 100°C por um período de 2 horas. As substâncias reativas ao TBA (TBARS) foram mensuradas em espectrofotômetro a 532 nm.

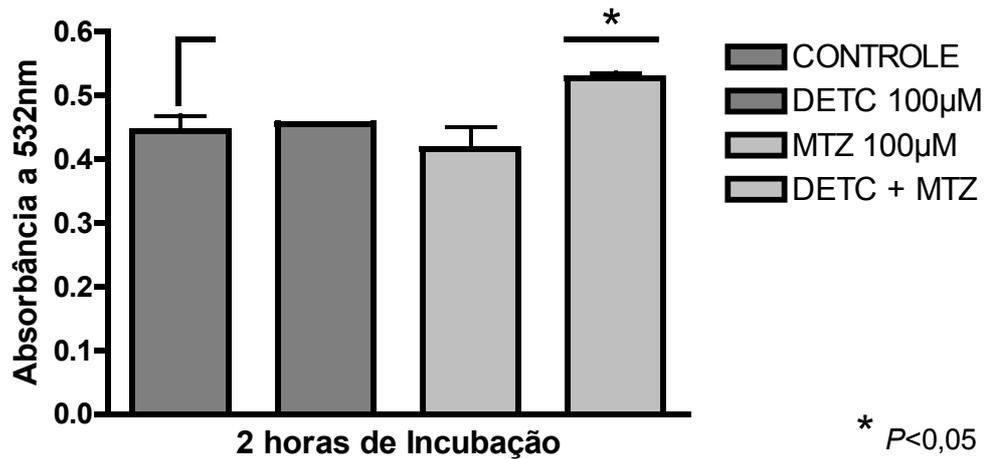


Figura 29 – **TBARS** *Tritrichomonas foetus*: 10^6 células por mL de *T. foetus* foram pré-incubadas em presença ou ausência do DETC 100µM, metronidazol 100µM e da combinação destes compostos por 3 horas. Após a lavagem, as células foram ressuspendidas em 200µL do mesmo tampão. 200µL de TBA (ácido tiobarbitúrico) a 1% foi adicionado para posterior incubação a 100°C por um período de 2 horas. As substâncias reativas ao TBA (TBARS) foram mensuradas em espectrofotômetro a 532 nm.

5.12 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Por microscopia eletrônica de transmissão, verificamos que células controle apresentavam-se normais, com citoplasma característico, com grânulos de glicogênio (*) e ribossomos (Fig.30-1). Os hidrogenossomos (H) apresentam dupla membrana justapostas (Figs. 30-1 e 2, ➔), com pequenas vesículas periféricas (Fig. 30-2, ⬆).

Trofozoítos de *T. foetus*, quando tratados com DETC 100 μ M por 6 horas, apresentaram uma quantidade significativa de vacúolos contendo figuras de mielina (Figs.30- 3 e 4,*), sugerindo autofagia com alta taxa de reciclagem de membranas. Em alguns momentos foi possível visualizar que as membranas dentro do vacúolo estavam interligadas com a membrana da organela (Fig. 30-4, **). No entanto, o citoplasma apresentava-se bem preservado estruturalmente.

T. vaginalis tratadas com DETC 100 μ M por 6 horas demonstraram que as vesículas periféricas dos hidrogenossomos (H) apresentavam-se muito aumentadas (Fig.30-5, ⬆) e/ou em maior número (Fig.30-6, ⬆). Isto também foi observado em *T. foetus* (Fig.30-7). As vesículas periféricas apresentavam depósito de material eletrondenso adjacente à membrana da organela, possivelmente pelo maior acúmulo de cálcio.

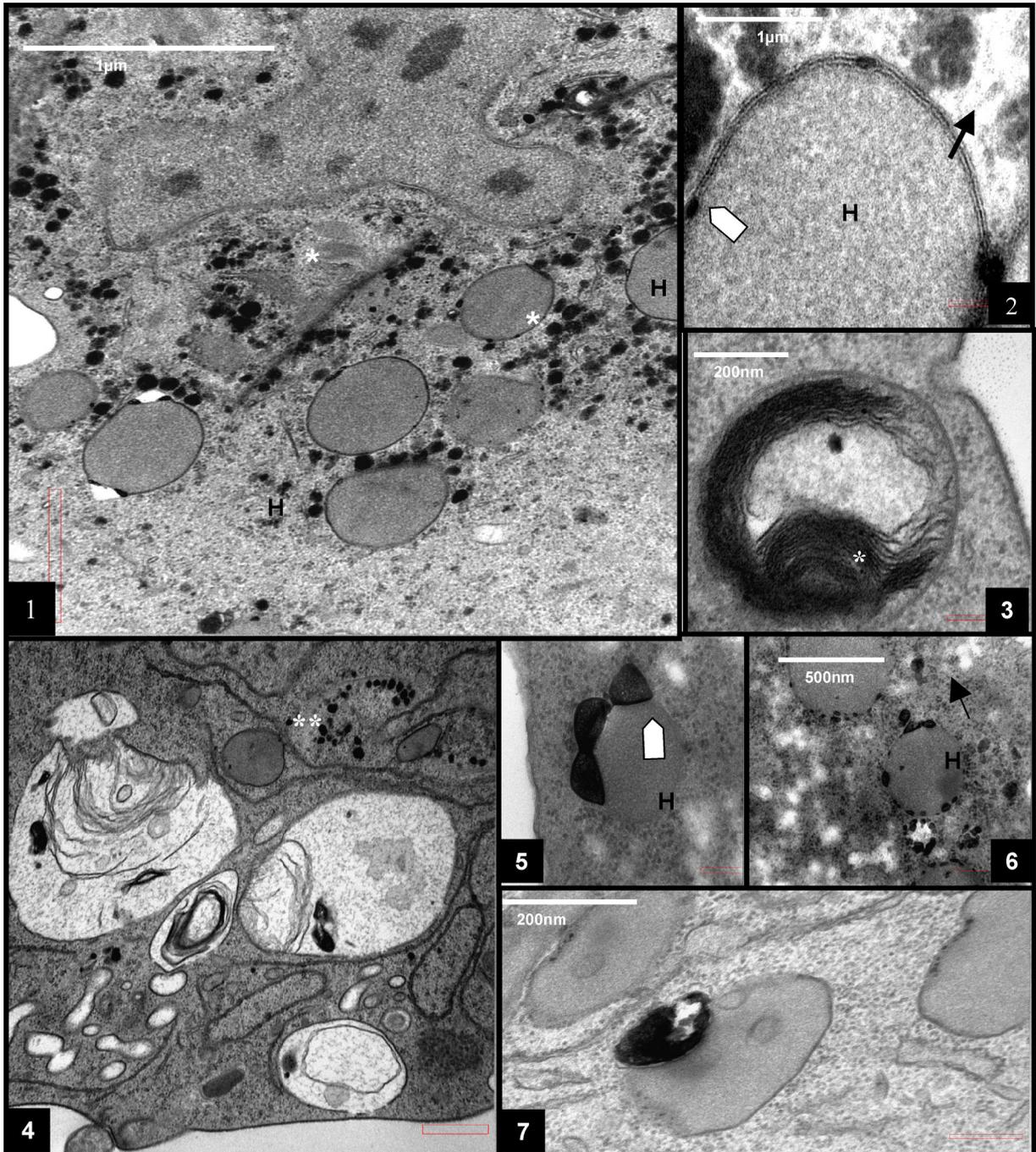


Figura 30: Microscopia eletrônica de transmissão de *Trichomonas vaginalis* (eletromicrografias 1, 5 e 6) e *Tritrichomonas foetus* (eletromicrografias 2, 3, 4 e 7) tratados com DETC 100µM por 6 horas ou controle (eletromicrografias 1 e 2). Observar a formação de vacúolos contendo extensas áreas membranares (3 e 4) e danos hidrogenossomais (5-7).

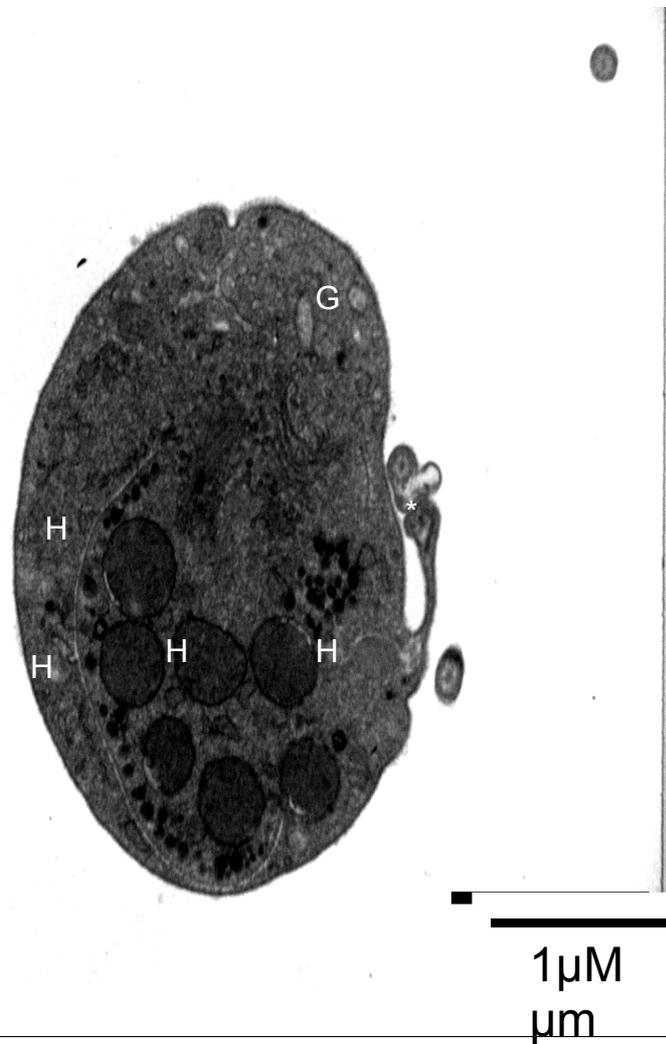


Figura 31 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* controle: Micrografia de *T. foetus* controle apresentando suas estruturas intracelulares em perfeito estado. Citoplasma com características normais. Hidrogenossomo (H), axóstilo (A →), complexo de Golgi (G) e grânulos de glicogênio (*).

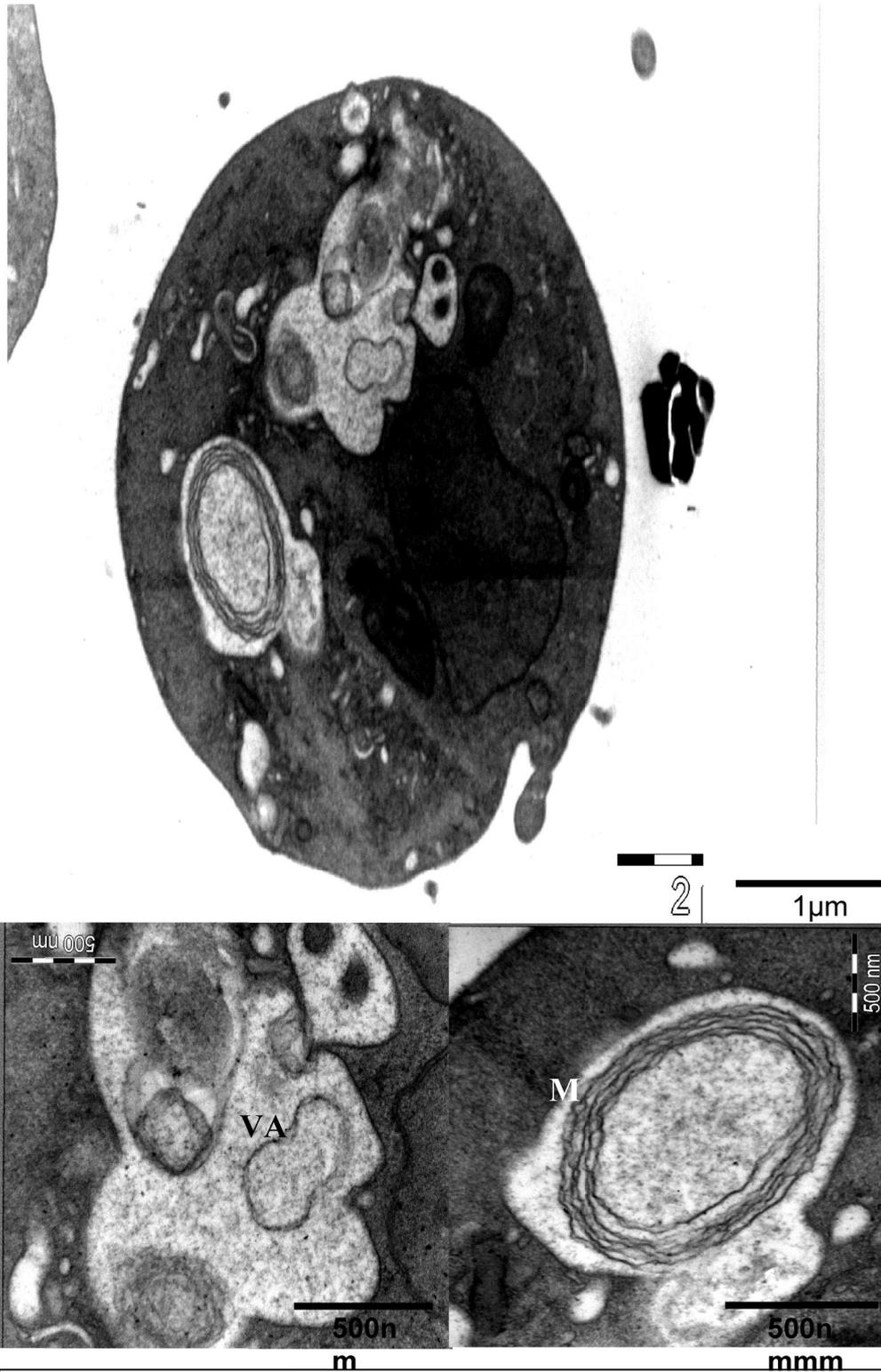


Figura 32 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* tratado com DETC 500nM: Em 24 horas foi observada a formação de figuras de mielina (M) e de vacúolos autofágicos (VA), indicativos de morte celular.

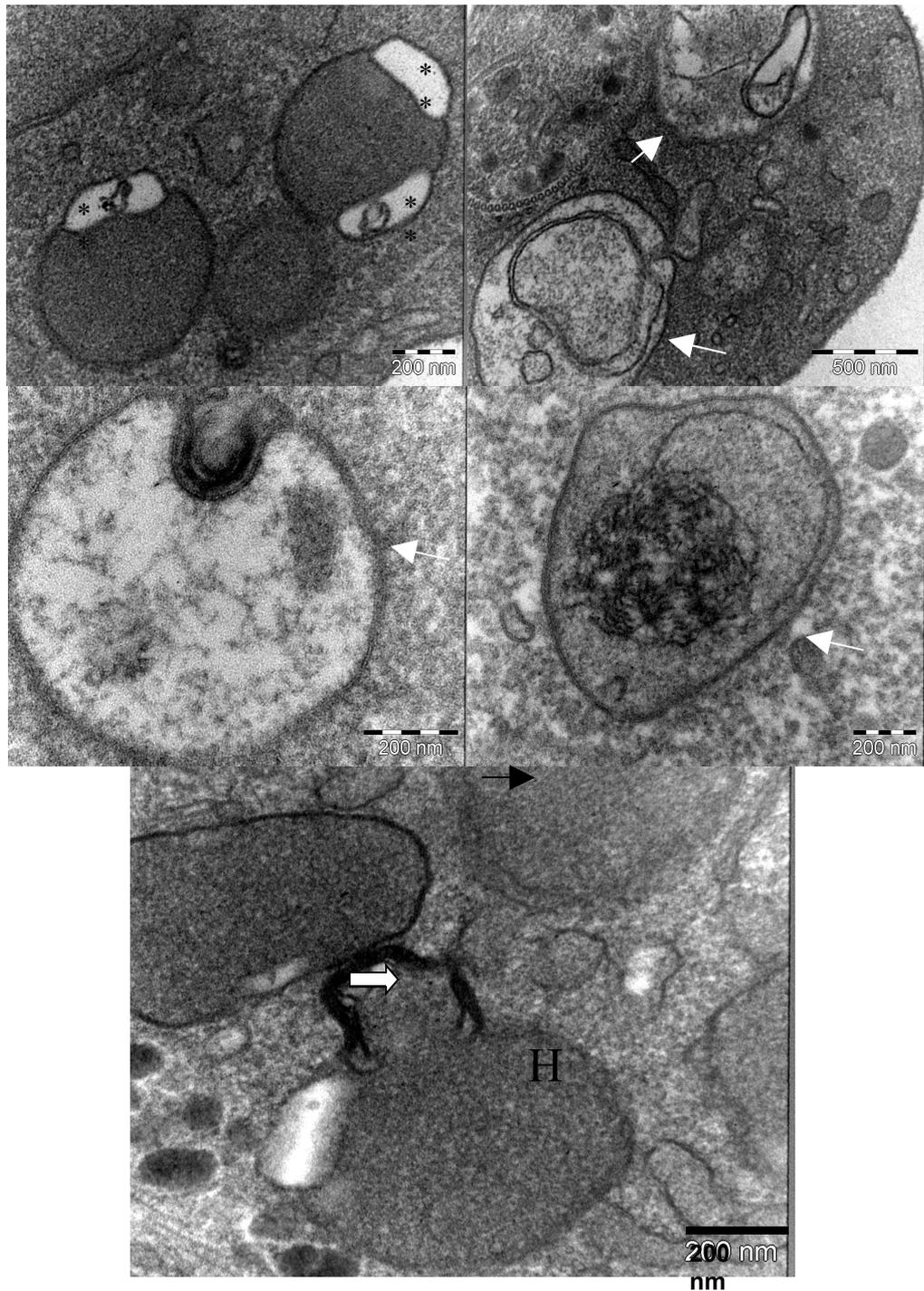


Figura 33 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* tratado com metronidazol 500nM: em 24 horas os hidrogenossomos apresentavam aumento de estruturas, semelhante às vesículas periféricas (**). Demonstravam também processo autofágico (seta), inclusive nos hidrogenossomos (H).

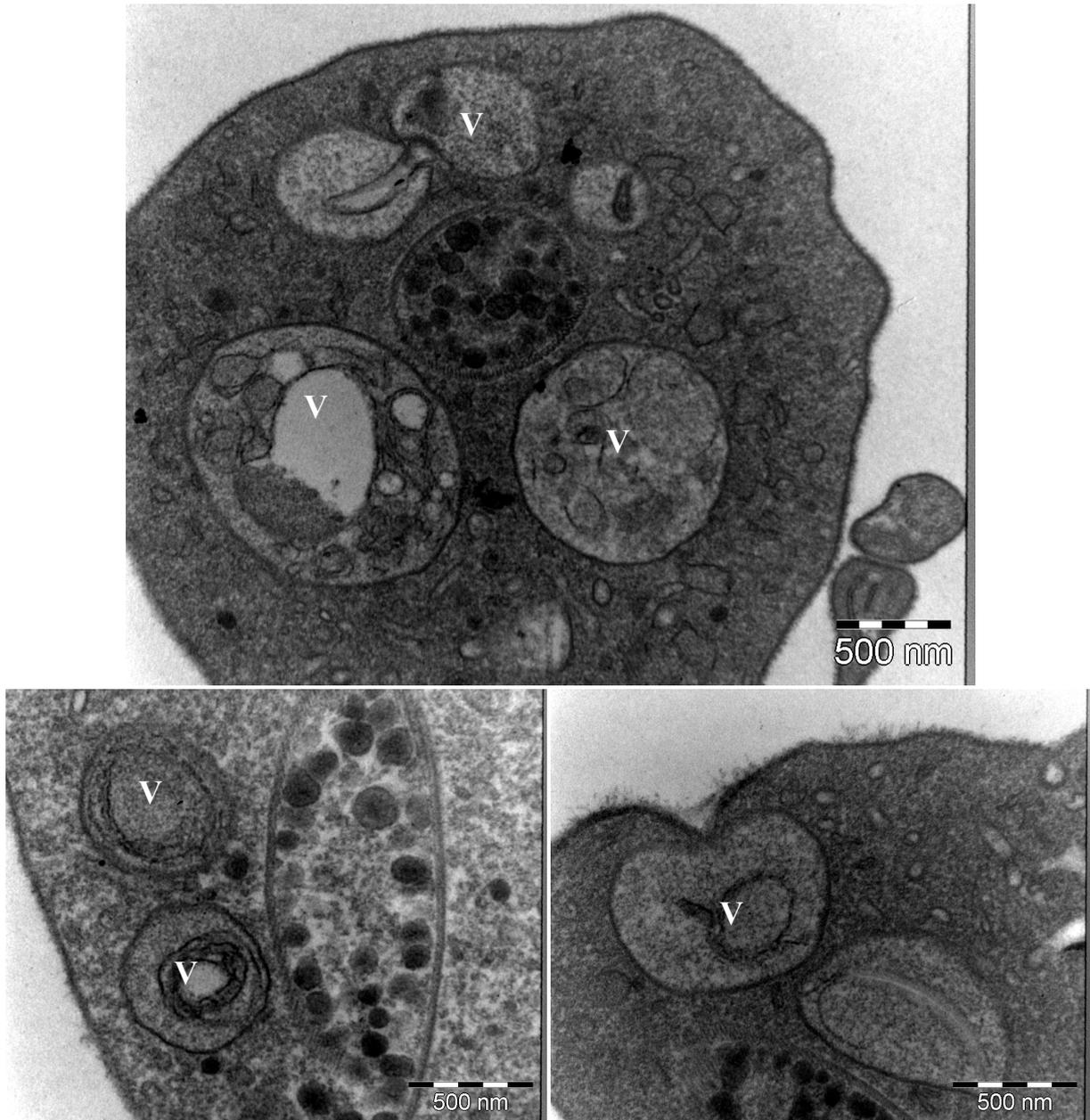


Figura 34 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de *T. foetus* com a combinação dos fármacos: *T. foetus* tratado com a combinação das drogas com DETC 500nM e metronidazol 500nM por 24 horas. Foram observadas grandes quantidades de vacúolos autofágicos (V) por célula. As células apresentavam perda da organização intracelular.

6 – DISCUSSÃO

A resistência de protozoários aos medicamentos tem se mostrado um problema na medicina, principalmente quando um único medicamento é eficaz contra determinado parasito. Sendo assim, testes de suscetibilidade com quimioterápicos têm se mostrado importantes ferramentas para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos com potenciais terapêuticos contra protozoários.

Em tricomonádídeos, o tratamento existente é com uma droga do grupo dos 5-nitroimidazóis, o metronidazol (comercialmente denominado de Flagyl®). Até 1959, algumas preparações vaginais tópicas eram utilizadas para o tratamento, entretanto, promoviam apenas uma melhora clínica e, embora as mulheres fossem tratadas, os homens continuavam infectados (LOSSIC & KENT, 1991). Na década de 60, o metronidazol foi introduzido como agente terapêutico para a tricomoníase. Desde então, este medicamento é a droga escolhida para o tratamento da doença.

A maioria das pessoas infectadas se curam com uma única dose, no entanto, casos de resistência vêm surgindo no decorrer dos anos (ACTOR, ZIV & PAGANO, 1969; DE CARNERI & GIANNONE, 1971; LOSSICK, MULLER & GORRELL 1986; SCHWEBKE & BARRIENTES, 2006).

A tricomoníase bovina apresenta um quadro um pouco diferente, tendo em vista que em países europeus e nos Estados Unidos o metronidazol não é aprovado para uso em animais. Assim, o controle da doença é muito difícil e baseado na inspeção das práticas de inseminação.

Os tricomonádídeos são protozoários microaerófilos e possuem uma organela redox responsável pela descarboxilação oxidativa do piruvato, o hidrogenossomo. O tempo de geração dos tricomonádídeos está em torno de 6 horas e o seu pico de crescimento acontece por volta de 36 horas, em estufa de CO₂. Tendo em vista a necessidade de se avaliar os possíveis efeitos das drogas sobre o crescimento e a ultraestrutura do parasito, o tempo ideal para a análise dos efeitos das drogas ficou determinado em 24 horas, pois neste período os trofozoítos, multiplicando-se logaritmicamente, não estariam passando por privação de nutrientes e os efeitos observados seriam decorrentes da ação das drogas.

Em 1998, BOUMA e colaboradores avaliaram os efeitos do dissulfiram e do seu primeiro metabólito, o DETC, contra algumas cepas suscetíveis e resistentes de *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus*. Eles demonstraram que, sob condições aeróbicas, tanto *T. vaginalis* quanto *T. foetus* mostravam-se sensíveis a ambas as drogas. Entretanto, quando eles

testaram a resistência anaeróbica, as células mostraram-se resistentes às duas drogas. Eles concluíram que era necessária uma oxidação intracelular da droga para que ela pudesse ser ativada e, então, capaz de matar aos microorganismos.

A partir daí, avaliamos os efeitos do DETC nas cepas suscetíveis de *T. vaginalis* e *T. foetus*.

Inicialmente, foram realizados experimentos para verificar o efeito potencial da droga nos protozoários. Observamos que seria necessária uma concentração muito alta do DETC para produzir efeito contra os parasitos (dados não mostrados). Posteriormente, foi verificado que, quando a droga era preparada no momento em que seria utilizada, a sua eficácia aumentava muito. Essa diferença de tempo influenciando na eficácia da droga pode estar relacionada com o fato de que a estrutura química do DETC favorece a sua interação com o oxigênio, o que poderia estar então interferindo na redução do seu efeito contra os parasitos. Essa conclusão acaba por discordar de Bouma e colaboradores, tendo em vista que, no caso estudado neste trabalho, a oxidação do DETC inibiria o seu efeito nos tricomonadídeos.

A partir daí, foram realizados experimentos com DETC nascente, para avaliar o efeito da droga e realizar o cálculo do IC₅₀ nos parasitos (*T. vaginalis* e *T. foetus*). Para isso, utilizamos diferentes concentrações da droga, com um tempo de incubação de 24 horas.

Constatou-se que o IC₅₀ para *T. vaginalis* estava em torno de 269,7nM e para *T. foetus*, 497,8nM. Durante este experimento, também foi observado o efeito dose-dependente da droga. Esse resultado demonstra um efeito bastante interessante, pois é utilizada uma concentração bem pequena da droga.

Posteriormente, foram realizados experimentos para determinar os efeitos e o IC₅₀ do metronidazol e compará-los com os do DETC. Os resultados mostraram um IC₅₀ do Metronidazol para *T. vaginalis* de 523,1nM e para *T. foetus* de 459,7nM. Este efeito também foi dose-dependente.

Esses resultados, em conjunto, demonstraram que o DETC é mais eficaz que o próprio metronidazol no caso de *T. vaginalis* e que ambos tinham eficácia bastante parecida no caso de *T. foetus*. Isso evidencia que mecanismos de ação e/ou compensação diferentes podem estar envolvidos no caso dos dois parasitos.

Devido às similaridades existentes entre protozoários e algumas células de mamíferos, foram realizados testes de citotoxicidade, através da técnica de incorporação de [³H]Timidina (tanto o metronidazol quanto o DETC) em esplenócitos de camundongos BALB/C, para analisar a especificidade da droga com relação ao microorganismo. Os resultados apontaram que o DETC só apresentou efeito citotóxico significativo na concentração de 1000μM. Já o

metronidazol não apresentou efeitos citotóxicos significativos em nenhuma das concentrações testadas.

Também foi realizado experimento de medida de função mitocondrial em macrófagos peritoneais de camundongo. De acordo com os resultados, não houve redução significativa da viabilidade celular quando os macrófagos foram tratados com o DETC.

Os testes comprovam que há uma considerável seletividade das drogas. Este resultado já era esperado, tendo em vista que ambas as drogas são utilizadas em humanos, inclusive com o mecanismo de ação já descrito para certos modelos.

O mecanismo de ação do metronidazol já é bem conhecido na literatura. O efeito da droga está relacionado à sua redução dentro do hidrogenossomo, através da transferência de elétrons catalisada pela ferredoxina para o metronidazol (KULDA, 1999).

As drogas do grupo dos nitroimidazóis são seletivas para anaeróbicos. Sob condições anaeróbicas e de baixas tensões de oxigênio, ocorre a transferência de um único elétron, levando à geração de ao menos três radicais intermediários com potenciais citotóxicos. São eles: o ânion nitro ($R-NO_2^-$), o hidronitróxido ($R-HNO$) e o cátion amino livre ($R-NH_2^+$). Essas reações podem detoxificar ou gerar radicais ainda mais citotóxicos. Uma segunda reação importante é a ligação covalente dos radicais com algumas moléculas como DNA, proteínas e tióis. A terceira reação é a oxidação do ânion nitro, na presença de oxigênio. Esta reação resulta na regeneração do composto Nitro com a produção de O_2^- , o qual é posteriormente dismutado a H_2O_2 (MASON & JOSEPHY, 1985). Esse comportamento químico do metronidazol faz dele um agente pró-oxidante.

O dissulfiram foi utilizado por mais de meio século para o tratamento do alcoolismo. O seu mecanismo de ação (gerado pelos seus metabólitos) é a inibição da enzima aldeído desidrogenase. Essa inibição gera a diminuição do metabolismo do acetaldeído, um produto do metabolismo do etanol, o que leva ao seu acúmulo no organismo e aos efeitos da droga (HALD & JACOBSEN, 1948). A sua farmacocinética tem sido estudada com frequência e foi demonstrado que ele é bastante seguro. Pesquisa recente evidenciou que o dissulfiram e outros ditiocarbamatos possuem efeito significativo no tratamento contra o câncer (SAUNA, SHUKLA & AMBUDKAR, 2005).

O dissulfiram é rapidamente reduzido *in vivo* a N,N-dietilditiocarbamato (DETC), o qual é metilado para formar S-metil N,N-dietilditiocarbamato (MeDDC) (GLAUSER *et al.*, 1993). O MeDDC é primeiramente oxidado para formar um intermediário denominado MeDDC sulfeto, que é convertido em S-metil N,N- dietilditiocarbamato sulfoxido e pequenas quantidade de MeDDC (MADAN *et al.*, 1998).

O DETC tem sido bastante estudado e dados na literatura têm apontado seus efeitos em vários tipos celulares, em células tumorais, dentre outras.

Entre seus principais mecanismos de ação está a formação de múltiplos compostos bioativos, como o CS₂ e o S- metil-N,N-dietilditilcarbamato sulfóxido e sulfona, poderosos agentes causadores de carbamilação em grupos sulfidrilas, podendo assim inibir enzimas com cisteínas em seus sítios ativos (NAGENDRA *et al.*, 1994).

A P-glicoproteína (Pgp) é uma bomba de efluxo dependente de ATP, localizada na membrana celular. Essa P-glicoproteína está relacionada com o bombeamento de grandes quantidades de drogas. Conseqüentemente, os altos níveis de resistências de parasitos e de células de mamíferos a certas drogas estão relacionados com a super expressão desta proteína (SAUNA, SHUKLA & AMBUDKAR, 2005).

LOO e colaboradores em 2004 mostraram que os metabólitos do dissulfiram exercem efeitos inibitórios sobre a P-glicoproteína. Eles provaram que estes efeitos não estão relacionados à inibição da síntese da proteína, mas à interação do dissulfiram com duas cisteínas localizadas em domínios dos sítios de ATP da proteína. Quando os sítios de ATP estão acessíveis, o dissulfiram interage com as cisteínas, inibindo assim a hidrólise do ATP e inativando a proteína. Quando o sítio do ATP está protegido, o dissulfiram estimula a hidrólise do ATP pela Pgp.

Em *Trichomonas vaginalis* essas proteínas estão relacionadas com um incremento na resistência do parasito a medicamentos (JOHNSON, SCHUCK, DELGADILLO, 1994). Sendo assim, o desenvolvimento de regimes terapêuticos que empreguem combinações com um fármaco capaz de inativar esta proteína tem fundamental importância e aplicabilidade em quimioterapia.

O DETC é quelante de metais divalentes, com exceção de cálcio e magnésio, e inibidor do sistema enzimático superóxido dismutase, que dismuta o O₂⁻ em H₂O₂ (WALKER *et al.*, 1987). A inibição da Cu,Zn-SOD ocorre através da ligação e remoção dos íons Cu(II) do sítio ativo da enzima. A presença desta enzima já foi detectada tanto em *T. foetus* (LINDMARK & MULLER, 1974) quanto em *T. vaginalis* (VISCOGLIOSI *et al.*, 1998).

A inibição destes sistemas pode vir a permitir o acúmulo de radicais livres, o que posteriormente pode causar peroxidação lipídica da membrana celular, bem como outros danos oxidativos estruturais e em macromoléculas (WALKER *et al.*, 1987).

Com estes mecanismos de ação, a combinação do DETC com o metronidazol poderia gerar um excelente efeito, já que o metronidazol é um agente pró-oxidante e o DETC funciona como um inibidor de mecanismos antioxidantes. Nesta linha de raciocínio, fomos

avaliar a possibilidade da combinação das drogas e tentar entender o mecanismo de ação do DETC e da combinação deste com o metronidazol em tricomonádídeos.

Para isso, inicialmente testamos a existência de efeito sinérgico entre a combinação das drogas. Utilizamos então a metodologia do FIC (concentração inibitória fracionada), através da qual foi observado que para *Tritrichomonas foetus* temos um FIC de 0,7 e para *Trichomonas vaginalis* temos um FIC de 0,3. Segundo Hallander e colaboradores (1982), duas drogas possuem efeito sinérgico quando apresentam valores de FIC de 0,5 ou inferiores. Portanto, a combinação do DETC com o metronidazol apresentou efeito sinérgico apenas para *Trichomonas vaginalis*.

É descrito na literatura que os metabólitos do dissulfiram possuem a capacidade de se ligarem às cisteínas, formando aductos e, assim, inibir a atividade de certas enzimas.

Aminoácidos contendo enxofre são essenciais para uma variedade de atividades biológicas, incluindo síntese de proteínas, metilação, síntese de poliaminas, produção de coenzima A, biossíntese de centros ferro-enxofre e defesa contra o estresse oxidativo (ALI & NOZAKI, 2007).

Recentes estudos sobre caracterização molecular e bioquímica do metabolismo de aminoácidos contendo enxofre, em organismos que não possuem mitocôndria, revelaram que as vias metabólicas destes aminoácidos são distintas das vias de seus hospedeiros mamíferos em vários aspectos (ALI & NOZAKI, 2007).

Normalmente, a maioria dos organismos eucarióticos apresenta glutatona como um agente antioxidante chave. Os tricomonádídeos, entretanto, não contam com este peptídeo (ELLIS *et al.*, 1994). Sendo assim, a cisteína tem sido considerada como o principal agente redutor e antioxidante em tricomonádídeos (MCKIE, *et al.*, 1998).

Desta forma, analisamos os efeitos do DETC sobre os níveis de tióis totais dos parasitos.

Através da reação de Ellman, observamos que o DETC diminui os níveis de cisteína de *Trichomonas vaginalis* e essa diminuição pode estar relacionada com o mecanismo de ação da droga, devido à importância da cisteína no equilíbrio redox do parasito. Esse resultado corrobora com os dados mostrados anteriormente e com as descrições na literatura sobre a droga.

Em *Tritrichomonas foetus*, observamos, através da microscopia de fluorescência, utilizando o OPA como sonda, que o DETC também diminui os níveis de cisteína do parasito. Quando o DETC foi pré-incubado com a cisteína, na proporção de 1:2, observamos que, além de reverter os efeitos do DETC, houve um aumento no número de células em relação ao

controle. Essa reversão dos níveis de proliferação e expressão de grupamentos sulfidríla indica a participação dos radicais SH no mecanismo de ação do DETC e sugere a possibilidade de formação de aductos entre o DETC e a cisteína. Entretanto é importante levar em consideração a possibilidade de resíduos de cisteína serem incorporados isoladamente pelos trofozoítos.

Como supracitado, a cisteína age como antioxidante. Como um possível mecanismo de ação do DETC em tricomonádídeos está a formação de aductos com as cisteínas do parasito.

Avaliamos os níveis de estresse oxidativo gerado pelo DETC, pelo metronidazol e pela combinação de ambos, para elucidar se os efeitos sobre os parasitos estavam relacionados com um incremento no estresse oxidativo intracelular.

Através da utilização do luminol, foi verificado que em *Trichomonas vaginalis* (Fig.26), o tratamento com o DETC gera um aumento significativo dos radicais livres intracelulares, o que não foi observado para o metronidazol e para a combinação entre as drogas. Em *Tritrichomonas foetus* também não foi observado aumento dos radicais por esta técnica para nenhuma das drogas testadas. Uma possível explicação para a não observação do efeito está no fato de que o tempo de incubação não tenha sido suficiente para a geração dos efeitos no caso do metronidazol e da combinação, no caso de *T. vaginalis*, e para nenhuma das drogas no caso de *T. foetus*. Outra possibilidade é que o luminol não seja o melhor indicador para os radicais gerados. Entretanto, outros experimentos devem ser realizados para verificar a possível interferência dessas variáveis.

Foi utilizada a sonda fluorescente H₂DCFDA para analisar a geração de estresse oxidativo intracelular, entretanto os resultados não foram conclusivos, possivelmente pela perda de viabilidade celular. Outros experimentos serão realizados.

A peroxidação lipídica é uma etapa posterior à geração de radicais livres e ocorre pela interação de radicais livres com os lipídeos de membrana. Através da técnica de TBARS foi verificado que todas as drogas promovem um aumento da peroxidação lipídica. No caso de *T. vaginalis*, somente metronidazol e a combinação mostraram aumento significativo e para *T. foetus* somente a combinação mostrou aumento significativo.

Este resultado corrobora a hipótese de que a formação de radicais livres está relacionada com mecanismo de ação das drogas, entretanto pelas metodologias empregadas não foi possível afirmar quais os tipos de radicais livres estão envolvidos no processo de lesão celular.

O processo de autofagia é utilizado na degradação e reciclagem de proteínas e organelas citoplasmáticas. Este processo é essencial na regulação de parte do crescimento e manutenção da homeostasia de organismos multicelulares. Ocorre formação de vacúolos autofágicos em resposta adaptativa a vários estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo privação de nutrientes.

O vacúolo autofágico é formado a partir do retículo endoplasmático, formando uma estrutura circundada por dupla membrana. Posteriormente ocorre a fusão com lisossomos, cujas enzimas hidrolíticas irão degradar o conteúdo do compartimento (XIE & KLIONSKY, 2007).

Por microscopia eletrônica de transmissão foi observada a formação de figuras de mielina e vacúolos contendo extensas áreas de membrana, o que sugere a ocorrência de um processo autofágico associado a um aumento da reciclagem de fosfolipídeos.

As alterações observadas nos hidrogenossomos corroboram a participação dos compostos no metabolismo parasitário e, possivelmente, no estresse oxidativo e modo de ação do metronidazol.

O aumento descontrolado no cálcio livre intracelular pode levar à injúria e morte por apoptose e necrose. O estresse oxidativo gerado dentro de uma célula pode levar à destruição do sistema de incorporação do cálcio (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). As vesículas periféricas fazem parte do hidrogenossomo dos tricomonadídeos e estão relacionadas com o acúmulo de cálcio e zinco (BENCHIMOL & ELIAS, 1982). As alterações encontradas nestas podem estar relacionadas com possível interferência na homeostasia do cálcio, o que também estaria envolvida no aumento do estresse oxidativo gerado na célula.

7 – CONCLUSÃO

- A utilização de drogas que interfiram nos mecanismos oxidantes é bastante promissora em virtude dos microorganismos serem microaerófilos e não possuírem os mesmos mecanismos de defesa mostrados pelo hospedeiro.
- A determinação bioquímica da peroxidação lipídica e a análise ultraestrutural indicam que o tiocarbamato promove o estresse oxidativo e produz autofagia nos tricomonádídeos.
- O efeito sinérgico DETC-MTZ em *T. vaginalis* aponta para uma importante ferramenta terapêutica, tendo em vista que, além de diminuir a concentração das drogas, leva a uma diminuição na possibilidade do microorganismo adquirir resistência.

8 - Referências Bibliográficas:

- ACTOR P, ZIV DS, PAGANO JF. Resistance to metronidazole by *Trichomonas foetus* in hamsters infected intravaginally. **Science**. 1969 Apr 25;164(878):439-40
- AKHMANOVA ,A. , VONCKEN, F. , VAN ALEN, T. , VAN HOEK, A. , BOXMA, B. , VOGELS, G, EENHUIS, M., HACKSTEIN, J.H. A hydrogenosome with a genome. **Nature**, 10;396(6711), 527-8, 1998.
- ALI, V. and NOZAKI,T. Currents therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infection by “amitochondriate” protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, 20(1), 164-187, 2007.
- ANDERSON, M.L., BONDURANT, R.H., CORBEIL, R.R., CORBEIL, L.B., Immune and inflammatory responses to reproductive tract infection with *Tritrichomonas foetus* in immunized and control heifers. **Journal of Parasitology** 82: 594–600, 1996.
- BEARD, C.M., NOLLER, K.L., O'FALLON, W.M., KURLAND, L.T., DAHLIN, D.C. Cancer after exposure to metronidazole. **Mayo Clin Proc**. 63(2),147-53, 1988.
- BENCHIMOL, M., JOHNSON, P.J. E DE SOUZA, W. Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. **Bio. Cell** . 87, 197-205. 1996
- BENCHIMOL, M. ; ELIAS, W. C. . Ultrastructural Localization Of Calcium In The Plasma Membrane and Hydrogenosome. **Experimental PARASITOLOGY**, v. 54, n. 3, p. 277-281, 1982.
- BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Is Metronidazole carcinogenic? **Mutation Research**, 511: 133-144, 2002.
- BONDURANT R.H., HONIGBERG B.M., Trichomonads of veterinary importance, in:Kreier J. (Ed.), **Parasitic Protozoa**, Academic Press, New York, 111–206, 1994.
- BONDURANT RH. Pathogenesis, diagnosis, and management of trichomoniasis in cattle. **Vet Clin North Am Food Anim Pract**. 13: 345-361, 1997.
- BOUMA, M.J., SNOWDON, D., FAIRLAMB, A.H., ACKERS, J. P. Activity of disulfiram(bis(diethylthiocarbamoyl)disulphide) and ditiocarb (diethyldithiocarbamate) against metronidazole- sensitive and – resistant *Trichomonas vaginalis* e *Tritrichomonas foetus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 42, 817-820, 1998.
- BOWDEN, F.J.; GARNETT, G.P. *Trichomonas vaginalis* epidemiology: parameterising and analyzing a model of treatment interventions. **Sex transm. Inf.**, 74: 248 – 256, 2000.
- CAMPBELL, W.C. A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). **Trends in Parasitology**,17(10), 499-500, 2001.
- CAVALIERE, M. BACCI, R. VITALI, Induction of mammary tumors with metronidazole in female Sprague-Dawley rats, **Tumor**, 70, 307–311, 1984.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trichomoniasis. Disponível em <www.cdc.gov/std>. Acesso em: 04 jan. 2008.
- CORBEIL LB, HODGSON JL, JONES DW, et al. Adherence of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. **Infect. Immun**. 57: 2158-2165, 1989.

- CROWELL AL, SANDERS-LEWIS KA, SECOR WE. In vitro metronidazole and tinidazole activities against metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. **Antimicrob Agents Chemother**, 47: 1407-1409, 2003.
- CSONKA, G.W., SQUIRES S.L. Trichomoniasis. **Medical Microbiology**, Academic Press 103-106, 1984.
- DE CARNERI I, GIANNONE R.. Drug resistance in *Trichomonas vaginalis*. **Lancet**. 11; 2 (7737), 1971.
- DÍAZ, J.A.M. & DE SOUZA, W. Purification and biochemical characterization of the hydrogenosomes of the flagellate protozoan *Tritrichomonas foetus*. **European journal of Cell Biology**, 74, 85-91, 1997.
- DRAPER D, DONOHOE W, MORTIMER L, HEINE RP. Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. **J Infect Dis**, 178: 815-819, 1998.
- DUNNE,R.L. , DUNN, L.A. , UPCROFT, P., O'DONOGHUE, P.J., UPCROFT, J. . Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. **Cell research**, 13 (4):239- 249. 2003.
- EDWARDS, D.I. Nitroimidazoles drugs: action and resistance mechanisms.I. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 31: 9-20, 1993 a.
- EDWARDS, D.I. Nitroimidazoles drugs: action and resistance mechanisms.II. Mechanisms of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 31:201-210, 1993 b.
- ELLIS JE, YARLETT N, COLE D, HUMPHREYS MJ, LLOYD D. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains.**Microbiology**, 140: 2489-2494, 1994.
- ESPINOZA E, EGGER M, HERRMANN B, ISLER M, VOKEN K, DAVEY SMITH G. STD in Nicaragua: population rate estimates and health seeking behaviour. **IX International Conference on AIDS (ICAIDS)**. Abstract N0o PO C06 2702, 1993.
- FELLEISEN, R.S.J. Host parasitic interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. **Microbes and Infection**,1: 807-816, 1999.
- FRANJOLA R, ANAZCO R, PUENTE R *et al.*, *Trichomonas vaginalis* infection in pregnant women and newborn infants. **Rev Med Chil** 117: 142-145, 1974.
- GLAUSER, T.A., NELSON, A.N., ZEMBOWER, D.E., LIPSKY, J.J. AND WEINSHILBOUM, R.M. Diethylthiocarbamate S-methylation: Evidence fo catalysis by human liver thiol methyltransferase and thiopurine methyltransferase. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 266, 23-32, 1993.
- GRAVES A, GARDNER WA. Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*. **Clin Obstet Gynecol.** 36: 145-152, 1993.
- HALD, J., AND JACOBSEN, E. The formation of acetaldehyde in the organism after ingestion of Ant-abuse (tetraethylthiuramdisulphide) and alcohol. **Acta Pharmacol Toxicol**, 4, 305 – 310, 1948.
- HALLANDER, H.O., DORNBUSCH, K., GEZELIUS,L., JACOBSON, K. and KARLSSON,I. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 22 (5), 743-752, 1982.
- HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3th. Ed. **Oxford University press**, 1999.

- HEINE P, MCGREGOR J. *Trichomonas vaginalis*: A reemerging pathogen. **Clin Obstet Gynecol.** 36: 137-144, 1993.
- HOBBS M, *et al.* *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. **Sex Transm Dis.** 26: 381-387, 1999.
- HONIGBERG B.M., Trichomonads of veterinary importance, in: Kreier J.P. (Ed.), **Parasitic Protozoa**, Academic Press, New York, 163–273, 1978.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. METRONIDAZOLE (Group 2B), 1998. Disponível em <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr02b.php>>. Acessado em: 13 dez. 2007.
- JOHNSON, PJ, SCHUCK, BL, DELGADILLO, MG. Analysis of a single-domain P-glycoprotein-like gene in the early-diverging protist *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol.** 66(1),127-37, 1994.
- KRIEGER, J.N., POISSON, M.A. & REINI, M.F. Beta-Hemolytic Activity of *Trichomonas vaginalis* Correlates with Virulence. **Infection and immunity**, 1291-1295, 1983.
- KULDA, J. Trichomonads, hydrogenosomes and drug resistance. **International Journal for Parasitology**, 29: 199-212, 1999.
- LAGA, M.; MANOKA, A.; KIVUVU, M.; MALETE, B.; TULIZA, M.; NZILA, N. ET AL., Non – ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV – 1 transmission in women : results from a cohort study. **AIDS**, 7: 95 – 102, 1993.
- LEVETT PN, TARA VINGA M, MAHESWARAN K *et al.*, Genital tract infections in sexually active women in Barbados. **West Indian Medical Journal** 44: 128, 1995.
- LEVINE, N.D. Veterinary protozoology. 1st ed. Iowa State University Press, 414p., 1985.
- LINDMARK, D.G., MULLER, M. Superoxide dismutase in the anaerobic flagellates, *Trichomonas foetus* and *Monocercomonas* sp. **J Biol Chem.** 249(14), 4634-7, 1974.
- LINSTEAD DJ, BRADLEY S. The purification and properties of two soluble reduced nicotinamide: acceptor oxidoreductases from *Trichomonas vaginalis*. **Mol Biochem Parasitol**, 15;27:125-33, 1988.
- LOO, T.W., BARTLETT, M.C., CLARKE, D.M. Dissulfiram metabolites permanently inactivate the human multidrug resistance P-glycoprotein. **Mol Pharm** 1(6):426-33, 2004.
- LOSSICK, J. G., M. MULLER, AND T. E. GORRELL. In vitro drug susceptibility and doses of metronidazole required for cure in cases of refractory vaginal trichomoniasis. **J. Infect. Dis.** 153:948–955, 1986.
- LOSSICK, J.G. Epidemiology of urogenital Trichomoniasis in HONIGBERG, B.M. Trichomonads Parasitic in Humans. **Springer –Verlag**, 1989.
- LOSSICK, J. G., AND H. L. KENT. 1991. Trichomoniasis: trends in diagnosis and management. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 165:1217–1222.
- MADAN, A., PARKINSON, A. and FAIMAN, M.D. Identification of the human P-450 enzymes responsible for the sulfoxidation and thiono-oxidation of diethyldithiocarbamate methyl ester: Role of P-450 enzymes in dissulfiram bioactivation. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, 22, 1212-1219, 1998.

- MASON, R.P., JOSEPHY, P.D. An electron spin resonance investigation of the iron-catalyzed reaction of metronidazole with cysteine. **J Inorg Biochem.**, 24(2), 161-5, 1985.
- MCKIE, A.E., EDLIND, T., WALKER, J., MOTTRAM, J.C., COOMBS, G.H.. The primitive protozoon *Trichomonas vaginalis* contains two methionine gamma-lyase genes that encode members of the gamma-family of pyridoxal 5'-phosphate-dependent enzymes. **J Biol Chem**, 273(10):5549-56, 1998.
- MEGLITSCH, P.A. Zoologia de los Invertebrados. 3^a ed. Universidad de Drake. H. Blume Ediciones, 1981.
- MINKOFF, H. *et al.*, Risk factors for prematurity and premature rupture of membranes: a prospective study of the vaginal flora in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 150: 965-972, 1984.
- MULLER, M. The Hydrogenosome. **J. Gen. Microbiol.**, 139, 2879 – 2889, 1993.
- NAGENDRA, S.N.; FAIMAN, M.D.; DAVIS, K.; WU, JY.; NEWBYI, X; SCHLOSSI, J.V. Carbamoylation of Brain Glutamate Receptors by a Disulfiram Metabolite. **The Journal Of Biological Chemistry**, 272, 39:24247–24251, 1997.
- NAGENDRA, S.N, MADAN,A., FAIMAN, M.D. S-Methyl-n,n-diethyldithiolcarbamate sulfone, an in vitro and in vivo inhibitor of rat liver mitochondrial low Km aldehyde dehydrogenase. **Biochem. Pharmacol.** ,47,1465-1467, 1994.
- NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS. Trichomoniasis. U.S. Department of Health and Human Services. Outubro, 2006. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/factsheets/std-vag.htm>> Acesso em: 17 out. 2006.
- PAGE-SHARP M, BEHM CA, SMITH GD. Tritrichomonas foetus and Trichomonas vaginalis: the pattern of inactivation of hydrogenase activity by oxygen and activities of catalase and ascorbate peroxidase. **Microbiology**. 142:207-11, 1996.
- PELLEGRIN, A.O. Acampilobacteriose e tricomonose são doenças Remergentes?. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, 23:523 – 531, 1999.
- PELLEGRIN, A.O. & LEITE, R.C. Atualização sobre Tricomonose Genital Bovina. Disponível no site < http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/download.php?arq_pdf=doc54> Acessado em: 26 set. 2007.
- PETER DA, FALES WH, MILLER RB, YOUNGQUIST RS, RANDLE RF, GANJAM IK, LYBYER JL. Tritrichomonas foetus infection in a herd of Missouri cattle. **J Vet Diagn Invest**, 7: 278 – 280, 1995.
- PETRIN D. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clin Microbiology**, 11: 300-317, 1998.
- REIN MF, MULLER M. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. In Holmes KK, editor. **Sexually Transmitted Diseases**. New York: McGraw Hill; 481-492, 1990.
- RHYAN JC, WILSON KL, BURGESS DE, STACKHOUSE LL, QUINN WJ. Immunohistochemical detection of Tritrichomonas foetus in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of bovine placenta and fetal lung. **J Vet Diagn Invest**. 7: 98-101, 1995.
- RASOLOSON D, VANACOVA S, TOMKOVA E, RAZGA J, HRDY I, TACHEZY J, KULDA J. Mechanisms of in vitro development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. **Microbiology**, 148: 2467-2477, 2002.

- RUSTIA, M., SHUBIK, P. Experimental induction of hepatomas, mammary tumors and other tumors with metronidazole in noninbred SAS: MRC/W1/BR. rats. **J. Natl. Cancer Inst.** 63, 863-867, 1979.
- RÜTTGERS H. Epidemiology and symptomatology of trichomoniasis. **Gynäk. Rdsch.** 23: 3-9, 1983.
- SAUNA, Z.E., SHUKLA, S. & AMBUDKAR, S.V. Dissulfiram, an old drug with new potential therapeutic uses for human cancers and fungal infections. **Molecular BioSystems**, 1, 127-134, 2005.
- SCHWEBKE, J.R. AND BARRIENTES, F.J. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* Isolates with Resistance to Metronidazole and Tinidazole. **Antimicrob Agents Chemother.**; 50(12): 4209–4210, 2006.
- SIMOES JA, GIRALDO PC, RIBBEIRO FILHO AD *et al.*, Prevalencia e fatores de risco associados às infecções cérvico-vaginais durante a gestação. **Rev Bras Ginecol Obstet** 18: 459-67, 1996.
- SINGH BN, LUCAS JJ, BEACH DH, SHIN ST, GILBERT RO. Adhesion of *Tritrichomonas foetus* to bovine vaginal epithelial cells. **Infect Immun.**, 67: 3847-3854, 1999.
- SKIRROW S. Identification of trichomonad-carrier cows. **J Am Vet Med Assoc.** 1: 553-554, 1987.
- SOBEL J. Vaginitis. **N England J Med.** 337: 1896-1903, 1997.
- SOMERS, P.K., MEDFORD, R.M., SAXENA, U.. Dithiocarbamates: effects of lipid hydroperoxides and vascular inflammatory gene expression. **Free Radic. Biol. Med.** 28, 1532– 1537, 2000.
- SOPER D. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? **AJOG Review.** 190: 281-90, 2004.
- SORVILLO F, SMITH L, KERNDT P, ASH L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerg Infect Dis.** 7: 927-932, 2001.
- THOMASON ,J.L. ; GELBERT, S.M. *Trichomonas vaginalis*. **Obstet. Ginecol.** 74: 536-541, 1989.
- VAN DER POL, B. *Trichomonas vaginalis* Infection: The Most Prevalent Nonviral Sexually Transmitted Infection Receives the Least Public Health Attention. **Clinical Infectious Diseases**, 4:23–5, 2007.
- VAN DER POL B, KWOK C, RINALDI A, *et al.*, *Trichomonas vaginalis* as a risk factor for HIV acquisition [abstract TUA0503]. In: **Program and abstracts of the XVIth International AIDS Conference (Toronto).** Geneva: International AIDS Society, 2006.
- VAN DER POL, B., WILLIAMS, J.A. , ORR, D.P., BATTEIGER, B.E., FORTENBERRY, J.D. Prevalence, Incidence, Natural History, and Response to Treatment of *Trichomonas vaginalis* Infection among Adolescent Women. **The Journal of Infectious Diseases**, 192:2039–44, 2005.
- VISCOGLIOSI E, DELGADO-VISCOGLIOSI P, GERBOD D, DAUCHEZ M, GRATEPANCHE S, ALIX AJ, DIVE D. Cloning and expression of an iron-containing superoxide dismutase in the parasitic protist, *Trichomonas vaginalis*. **FEMS Microbiol Lett.** , 161(1),115-23, 1998.
- WALKER, E.M., CANNON, D.J., REIFSTECK,M.E., HOBBS, K.A., HARDIN,H.F., JONES, M.M. AND SKEELES, J.K. Effects of diethylthiocarbamate and structural analogs in mice with systemic candidial infections. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 56(2),253-263, 1987.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. Departament of communicable disease surveillance and response, 2001. Disponivel no site <WHO/CSR>. Acessado em: 17 out. 2007.

- XIE, Z AND KLIONSKY, D.J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**, 9(10), 2007.
- YAP, E. H. ; HO, T.H.; CHAN, Y.C., THONG, T.W.; Ng, G.C.; HO, L. et al., Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. **Genitourin. Med.** 71: 402 - 404, 1995.
- YULE, A.; SKIRROW, S.Z.; BON DURANT, R.H. Bovine trichomoniasis. **Parasitology Today**, 5: 373 – 377, 1989.