



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

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EFEITO DA CICLOHEXILAMINA SOBRE TROFOZOÍTOS DE  
*Giardia lamblia***

**TAYANE GONÇALVES FERNANDES**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2014**



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

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

**EFEITO DA CICLOHEXILAMINA SOBRE TROFOZOÍTOS DE  
*Giardia lamblia***

Tayane Gonçalves Fernandes

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de mestre em ciências.

**Salvador - Bahia – Brasil  
2014**

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

F363e	Fernandes, Tayane Gonçalves Efeito da ciclohexilamina sobre trofozoítos de <i>Giardia Lamblia</i> / Tayane Gonçalves Fernandes. - 2014. 98 f. : il. ; 30 cm.
	Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Biologia Parasitária. Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.
	1. <i>G. lamblia</i> . 2. Poliamina. 3. Trofozoitos. I.Título.
	CDU 616.995.132

"EFEITO DA CICLOHEXILAMINA SOBRE TROFOZOÍTOS DE GIARDIA LAMBIA." "

TAYANE GONÇALVES FERNANDES

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Maria Aparecida Gomes  
Professora  
UFMG

  
Dra. Neci Matos Soares  
Professora  
UFBA

  
Dra. Cristiane Flora Villarreal  
Professora Adjunta  
UFBA

Dedico à minha mãe, *in memoriam*, pelo amor incondicional; ao meu pai, *in memoriam*, por ter me ensinado a viver e às minhas irmãs pelo carinho, atenção e apoio constante.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me concedido o dom da vida e estar sempre comigo.

À minha mãe, pelo amor incondicional e aprendizado de vida.

Ao meu pai, por ter me ensinado a viver com as diversidades e sem ter medo de ser feliz.

Às minhas irmãs Irenildes, Ivonildes e Taís pelo incentivo e constante apoio, que foram fundamentais para o meu crescimento. Sei que posso contar com vocês para o que der e vier. Sem elas nada teria acontecido.

Ao meu orientador Dr. Marcos André Vannier dos Santos, pela sua orientação, estímulo e apoio durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa.

A equipe do Laboratório de Biologia Parasitária: Karla, Carlos, Rafael Costa, Mayra, Anderson, Jacqueline, Eliete, Rafael Gomes, Danielle, Clarissa pela força, por ter me ajudado a compreender cada vez mais o meu trabalho. Uma equipe que me fez aprender muito.

À Dra. Adriana Lanfredi Rangel, Dr. Cláudio Figueira e Dra. Ana Lúcia, pela amizade e disposição em me auxiliar nos procedimentos relacionados à microscopia eletrônica.

Ao grupo do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, especialmente para Taís e Cássio que foram pessoas fundamentais neste trabalho, minha eterna gratidão.

Aos colegas de Pós-graduação, que tive imenso prazer de conhecer e criar novos laços de amizade, em especial, Candace, Hellen, Marcus, Igor, Afrânio, Carol, Jaqueline, Maira e Regina.

Aos professores do curso de Pós-graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica.

À e secretária de ensino, Thaíse, Iumara e Geiçsa que tiveram uma atenção, cuidado e agilidade com o meu trabalho.

À todos os funcionários do Centro que colaboraram na realização deste trabalho, em especial à Edna com sua atenção materna.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CAPES, CNPq, PDTIS, PP-SUS e FAPESB que nos auxiliaram com a infraestrutura e recursos financeiros.

“ Deus está colhendo suas lágrimas para transforma-las em vitórias”

(Autor desconhecido)

FERNANDES, Tayane Gonçalves. Efeito da ciclohexilamina sobre trofozoítos de *Giardia lamblia*. 66 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

A giardíase é uma doença causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, e sua sintomatologia é caracterizada pela eliminação de fezes esteatorréicas, dores abdominais e náuseas. Segundo o CDC estima-se que há cerca 1,2 milhões de casos por ano de giardíase, acometendo principalmente crianças em idade escolar. Atualmente, o tratamento da giardíase é realizado principalmente pelo uso do fármaco da família dos 5-nitromidazóis, metronidazol (Flagyl®), secnidazol e tinidazol em particular. Estes são confrontados em casos de resistência clínica causada pelo frequente uso inadequado do medicamento e/ou abandono do tratamento. Além disso, o metronidazol pode apresentar efeito carcinogênico em longo prazo em humanos. Desta forma, novos estudos com análogos e/ou inibidores de poliaminas podem levar à elucidação dos mecanismos de ação envolvidos, favorecendo o estabelecimento de novos regimes terapêuticos mais seguros e eficazes. Em nosso trabalho, foram testadas as substâncias ciclohexilamina (CHA) e o metronidazol que são produtos sintéticos, com o objetivo de avaliar os seus efeitos na proliferação celular, caracterização dos moduladores do metabolismo de poliaminas, avaliação nas mudanças no potencial redox e elucidação de seus possíveis mecanismos de ação nos trofozoítos de *Giardia lamblia*. Foi realizada uma avaliação da proliferação celular na presença de CHA para trofozoítos de *Giardia lamblia*, onde observamos que a substância demonstrou ter ação significativa apresentando um efeito dosedependente. Observamos que os trofozoítos de *G. lamblia* apresentam uma inibição significativa do crescimento em presença de concentrações milimolares do CHA, cujo IC50 em 72 horas foi de 1,646 mM. Ao avaliar a produção de lipoperóxidos nos trofozoítos foi observado o possível papel do CHA como promotor de estresse oxidativo neste parasito. Ao realizar microscopia eletrônica de varredura (MEV) os trofozoítos apresentaram morfologias completamente irregulares em diferentes concentrações da CHA, com internalização do disco adesivo, sendo corroborado com os resultados da microscopia eletrônica de transmissão (MET) que mostram o processo de encistamento seguido de necrose celular. Esses resultados indicam que a CHA é possível candidata para o uso terapêutico contra a giardíase.

Palavras-chaves: *G. lamblia*, ciclohexilamina e poliamina.



FERNANDES, Tayane Gonçalves. Cyclohexylamine Effect of trophozoites of *Giardia lamblia*. 66 f. il. Dissertation (Msc) – Oswaldo Cruz Foundation, Research Center Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Giardiasis is a disease caused by the flagellate protozoan *Giardia lamblia*, and its symptomatology is characterized by steatorrhea, abdominal pain and nausea. According to the CDC, an estimate number of 1.2 million cases of giardiasis happen every year, affecting especially schoolchildren. Nowadays, giardiasis treatment is based on drugs from the 5-nitroimidazole family, particularly metronidazole (Flagyl), secnidazole and tinidazole. Those drugs are indiscriminately used by the population, and it's not uncommon to find them causing clinical resistance due to inappropriate utilization and/or treatment abandon. Besides that, metronidazole can present longterm carcinogenic effect in humans. Thus, new studies with analogs and/or polyamines inhibitors can lead to the clarification of the drugs action mechanis, favouring the establishment of new, safer and more efficient therapeutic regimens. Our work tested cyclohexylamine (CHA) and metronidazole, wich are synthetic products, in order to evaluate their effects on cell proliferation and on changes in redox potential, characterize polyamines metabolism modulator and describe their possible action mechanisms on *Giardia lamblia* trophozoites. We evaluated *Giardia lamblia* trophozoites cell proliferation in the presence of CHA; it was observe that the substance shows significant action, presenting dose-dependent effect. We also observed that *G. lamblia* trophozoites presented significant growth inhibition when exposed to millimolar concentrations of CHA - its IC<sub>50</sub> in 72 hours was 1,646mM. When assessed the lipoperoxides production in trophozoites, we observed a possible role of CHA as an oxidative stress promoter in the parasite. Under Scanning Electron Microscopy, trophozoites showed completely irregular morphologies in different CHA concentrations, with internalization of the adhesive disc; this results are corroborated by the Transmission Electron Microscopy results, wich showed the process of encystment followed by cell necrosis. This makes CHA a possible candidate for therapeutic use against giardiasis.

Keywords: *G. lamblia*, cyclohexylamine and polyamine.

## LISTA DE ABREVIações

CDC	Centro de Prevenção e Controle de Doenças
CEUA	Comitê de Ética Animal
CHA	Ciclohexilamina
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DAB	1,4-diamino-2-butanona
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade Óptica
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido Clorídrico
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de 50% do crescimento das células
MET	Microscopia eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTZ	Metronidazol
ODC	Descarboxilase ornitina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Poliamina
PAO	Poliamina oxidase
PBS	Tampão fosfato de sódio
Put	Putrescina
SBA	Soro bovino adulto

SSAT	Espermidina - espermina-1-N-acetiltransferase
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TBA	Ácido tiobarbitúrico

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Aspectos históricos.....	13
1.2 Aspectos Epidemiológicos.....	13
1.3 Biologia do Parasito.....	16
1.3.1 Trofozoíto.....	16
1.3.2 Cisto.....	18
1.3.3 Ciclo biológico.....	19
1.4 Giardíase-Patologia.....	20
1.5 Tratamento.....	21
1.6 Poliaminas.....	24
1.6.1 Via de poliaminas.....	26
1.6.2 Poliaminas : Ciclo celular.....	29
1.6.3 Poliaminas em protozoários.....	30
1.7 Novas abordagens terapêuticas.....	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos .....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Cultivo de <i>G. lamblia</i> .....	35
3.2 Animais.....	35
3.3 Considerações éticas.....	36
3.4 Padronização e análise da proliferação celular.....	37
3.5 Ensaio de inibição.....	37
3.6 Detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	37
3.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
3.8 Microscopia eletrônica de transmissão.....	38
3.9 Citotoxicidade in vitro.....	39
3.1.1 Análise estatística.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Padronização do método colorimétrico para trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i> .....	40

4.2 Análise da citotoxicidade do DMSO em trofozoítotrofozoíto de <i>Giardia lamblia</i> .	41
4.3 Avaliação da proliferação celular trofozoíto de <i>Giardia lamblia</i> .....	42
4.4 Toxicidade em esplenócitos.....	44
4.5 Detecção de TBARS.....	45
4.6 Microscopia eletrônica de varredura.....	46
4.7 Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÃO.....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICE.....	68

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A giardíase é uma patologia causada pelo protozoário flagelado *Giardia lamblia*, cuja sintomatologia é caracterizada pela eliminação de fezes esteatorréicas, dores abdominais e náuseas (REY, 2001). O protozoário foi descrito por Antonie Van Leeuwenhoek em 1681, após examinar as próprias fezes diarreicas com o auxílio de lentes de aumento esféricas, em microscópio simples os quais ele mesmo confeccionava quando notou “animalunculos moveis”. Embora fosse difícil aceitar as observações de um comerciante, não acadêmico, estas vieram a ser consideradas entre as principais descobertas da ciência e medicina. Em 1859 o parasito foi descrito detalhadamente por Lambl. Em 1879, Grassi descobriu a forma cística, contudo a nomeação do mesmo ocorreu em 1915, em homenagem ao professor de zoologia Alfred Giard (ADAM, 2001).

## 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos ao longo dos últimos anos, as enteroparasitoses ocasionadas por helmintos e/ou protozoários são consideradas um grave problema de saúde pública mundial devido a alta prevalência, tanto em países subdesenvolvidos quanto desenvolvidos (FREI, 2008). A elevada frequência de episódios de diarreia ocasionadas pelas infestações intestinais por estes parasitos é uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (DE CARLI, 2004).

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), foram notificados anualmente aproximadamente 20.000 casos de giardíase em humanos, no período de 2002 a 2009 (YODER *et al.*, 2010), além disso, o CDC

estima que o número de casos por ano pode estar próximo a 1,2 milhões devido a subnotificação e falta de diagnóstico (SCALLAN *et al.*, 2011). A diarreia dos viajantes, como também é conhecida, e assim denominada devido a alta prevalência de indivíduos que viajam para áreas endêmicas e retornam a com manifestações clínicas da doença, ou albergando o protozoário de forma assintomática (JELINEK *et al.*, 2000). É considerada uma gastroenterite importante em todo o mundo, mesmo que se apresente de forma assintomática (VEENEMANS *et al.*, 2011; IGNATIUS *et al.*, 2012).

É estimado que 5 a 15% dos indivíduos que ingerem cistos de *G. lamblia* tornam-se portadores assintomáticos e destes, 25 a 50% se tornam hospedeiros sintomáticos (NEVES *et al.*, 2001). Esta doença acomete cerca de 400 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo (OMS, 2009). É mais frequente em crianças e em indivíduos imunocomprometidos, sendo considerada uma das doenças mais comuns tanto em países desenvolvidos quanto em regiões caracterizadas pelo subdesenvolvimento (MANDELL *et al.*, 2010). Apresenta uma prevalência mundial de 11 a 30%, com maior frequência em crianças em idade escolar (CARVALHO *et al.*, 2009). Desta forma, esta enfermidade adquire grande relevância sobre os índices de morbidade, desnutrição e déficit cognitivo infantil. Em adultos, é possível relacionar a giardíase com um quadro de morbidade associado a desnutrição e redução da produtividade nesta faixa etária (NIEHAUS *et al.*, 2002; PEDRAZA *et al.*, 2014).

Estudos epidemiológicos mostram que a giardíase e a doença parasitária mais comumente detectada em diferentes regiões industrializadas do mundo. Em países desenvolvidos da Europa e América do Norte a prevalência da giardíase está entre 2 a 7%, e a população normalmente é infectada através da veiculação hídrica, não havendo declínio de incidência nos últimos anos (THOMPSON, 2004; YODER *et al.*, 2012). Nos países em desenvolvimento, a prevalência das infecções em crianças causadas pelo parasito intestinal ainda são elevadas, podendo variar entre 20 a 60% na África, 24 a 47% na Ásia e 20 a 65% na América Latina (ONINLA *et al.*, 2010; CHIRDAN *et al.*, 2010; STEINMANN *et al.*, 2010).

No Brasil, a prevalência da giardíase em crianças em creches e idade escolar varia de 14,6 a 78,3%, principalmente devido ao ato de lavar as mãos na

boca, compartilhamento de brinquedos e troca de fraldas (MACHADO *et al.*, 1999). Em São Paulo, na cidade de Botucatu, um estudo demonstrou que 53,4% das crianças que frequentavam a creche eram infectadas com algum parasito e destes 26,9% estavam parasitados por *G. lamblia* (CARVALHO *et al.*, 2006). No estado do Paraná, ao avaliar a prevalência de enteroparasitoses em escolares foi verificado que 50,7% eram infestados por *G. lamblia* (PITNER *et al.*, 2007). No estado de Minas Gerais foi verificado que 44,2% das crianças encontravam-se com parasitas intestinais, sendo que a prevalência de *G. lamblia* foi de 16,7%.

Um estudo prospectivo de doenças diarreicas em crianças que vivem no nordeste brasileiro demonstrou que falta de banheiros e desmame precoce são fatores de risco para transmissão de giardíase (GUERRANT *et al.*, 1983). Segundo Matos *et al.* (2008), em um estudo transversal com 629 escolares do estado da Bahia, um percentual 20% apresentaram um déficit antropométrico e destes, 13,5% apresentavam *G. lamblia* nas fezes. Prado *et al.*, (2001), realizaram um estudo randômico nos municípios de Salvador e entorno da Baía de Todos os Santos, acompanhando crianças de 7 a 14 anos, dentre as 300 crianças, 15,8% estavam infestadas por *G. lamblia* e dentre estas, 35% apresentaram reinfestação. Crianças mais velhas e residentes em áreas sem saneamento básico apresentaram-se sintomáticas e com baixo desenvolvimento escolar. Assim, cabe ressaltar que a via hídrica e a principal fonte de contaminação, principalmente para humanos e outros animais, sendo uma grande preocupação da saúde pública ainda não resolvida (THOMPSON, 2004).

A prevalência destas infecções está relacionada, principalmente, as condições de uso e contaminação do solo, a falta de saneamento básico, carência de infraestrutura educacional, socioeconômica e políticas de promoção à saúde (ANDRADE *et al.*, 2010). Estes graves problemas elevam o risco de contaminação e reinfecção na população endêmica. Diante de tal realidade, especialistas da Sociedade Latino-Americana de Medicina de Viagem (SLAMVI) desenvolveram aconselhamentos e diversas recomendações atualizadas sobre a epidemiologia e os riscos das doenças transmissíveis, especialmente doenças que podem ser assintomáticas como a giardíase, como medida preventiva para viajantes e profissionais da saúde. Como exemplo temos a



Copa do Mundo de futebol, que ocorreu no Brasil esse ano e representava um local de risco para a transmissão de *G. lamblia* (GALLEGO *et al.*, 2014).

## 1.3 BIOLOGIA DO PARASITO

### 1.3.1 Trofozoíto

Os trofozoítos de *G. lamblia* são piriformes, com achatamento dorso-ventral possuindo simetria bilateral e medindo cerca de 12 a 15  $\mu\text{M}$  de comprimento por 5 a 9  $\mu\text{M}$  de largura. Utilizam quatro pares de flagelos para sua locomoção, os quais estão dispostos nas regiões anterior, latero-posterior, caudal e ventral, sendo originados nos corpúsculos basais. Os axonemas dão sustentação ao parasito e na porção caudal são envolvidos pelo corpo funis que são responsáveis pela flexão do parasito (Figura 1).

Para a fixação no epitélio intestinal do hospedeiro, o trofozoíto utiliza o disco adesivo que é côncavo e se localiza na região ventral, desaparecendo quando o parasito está na forma de cisto. Próximo ao disco é possível observar a presença de uma crista lateral constituída pelas bordas dos discos, e a flange ventrolateral (Figura 1) é uma projeção maleável do citoplasma ventrolateral que circunda todo o corpo e auxilia na adesão do trofozoíto (ADAM, 2001).

O material genético deste parasito está dividido em dois núcleos, sem nucléolos, que são localizados anteriormente de forma simétrica no eixo lateral, possuindo os mesmos genes e cromossomos (Figura 1) (ADAM, 2001). No citoplasma são encontrados, de forma bem homogênea, as vesículas periféricas, lisossomos, ribossomos e grânulos de glicogênio distribuídos na região dorsal da célula. O retículo endoplasmático é projetado da região perinuclear até a região das vesículas periféricas do dorso da célula (MAIA *et al.*, 2008). É possível visualizar indícios do complexo de Golgi em trofozoítos em processo de encistamento, não havendo sua presença confirmada em trofozoítos vegetativos, mesmo havendo cisternas empilhadas que sugerem a

existência de tal complexo (ADAM, 2001; GILLIN *et al.*, 1996; LUJÁN *et al.*, 1995).

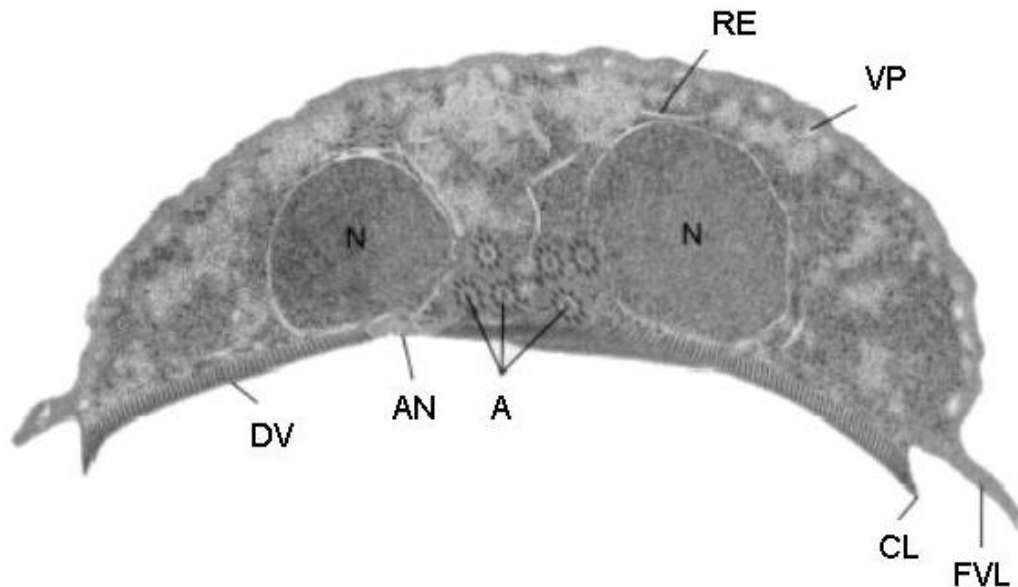


Figura 1– Trofozoíto em seção transversal com visualização do núcleo (N), retículo endoplasmático (RE) e vesículas periféricas (VP). Componentes do disco ventral (DV), como a área nua (AN), crista lateral (CL) e flange ventrolateral (FVL) são demonstrados nesta micrografia eletrônica. Os axonemas dos flagelos (A) originam-se da região entre os dois núcleos. Fonte: Adaptado de Adam, 2001.

A *Giardia* sp. devido à sua linhagem primitiva que seguiu um rumo diferente dos eucariontes, apresenta uma organização celular muito simples. Não apresenta mitocôndrias e nem peroxissoma, mas possuem estruturas membranosas especializadas provavelmente com função redox, denominadas mitossomos (MARTI *et al.*, 2003, SIMPSON *et al.*, 2002). Os mitossomos são organelas que apresentam uma maquinaria proteica para a biossíntese de Fe-S e produção de H<sub>2</sub> (TACHEZY *et al.*, 2001). Este maquinário proteico confirma a hipótese de que pode ser caracterizado como um derivado vestigial incompleto das mitocôndrias (NYINDODO-OGARI *et al.*, 2014).

Através da observação da região central dos discos adesivos foi verificado que 30% dos trofozoítos apresentavam uma protusão ventral que revela a presença de cisternas de retículo endoplasmático, que na maioria das vezes formam membranas concêntricas e com quantidades variadas de

grânulos de glicogênio e vesículas periféricas (LANFREDI-RANGEL *et al.*, 1999).

### 1.3.2 Cisto

O cisto possui um formato oval, medindo de 8 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento por 7 a 10  $\mu\text{m}$  de largura, envolto por uma parede de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$  de espessura apresentando resistência e o protegendo de condições ambientais desfavoráveis. Dentro do cisto é possível visualizar 2 a 4 núcleos (dependendo da fase de divisão nuclear), os corpos basais, corpos medianos e presença de grânulos de glicogênio (Figura 2). Os discos adesivos e flagelos estão fragmentados e internalizados, não sendo visíveis neste estágio (ADAM, 2001, MANNING *et al.*, 1992).

A forma cística é encontrada nas fezes diarréicas e pastosas do hospedeiro e no meio ambiente. Estes podem permanecer viáveis por até 60 dias na superfície da água com temperatura até 4° C e resistir aos processos de tratamentos de água mais simples (dióxido de cloro, cloraminas), devido a parede cística que o protege (MONIS, 2003, SMITH *et al.*, 2006). Segundo SAMUELSON (2013), a parede cística apresenta um componente estrutural composto por fibrilas de  $\beta$  - ligada 1,3 - GalNAc que proporcionam esta resistência ao meio externo.



Figura 2: Cisto de *Giardia lamblia* com visualização dos núcleos (N), axonemas (A), parede cística (PC) e corpos medianos (CM).

### 1.3.3 Ciclo biológico

O ciclo biológico da *Giardia lamblia* é alternado entre um cisto infectante e um trofozoíto ativamente móvel. A infecção ocorre principalmente por via fecal-oral, através da ingestão de água e/ou alimentos contaminados pelos cistos deste parasito (Figura 3). No trato digestório ocorre o processo de excistamento, com o auxílio de proteases e a acidez estomacal (ADAM, 2001). Ao atingir a região proximal do intestino delgado o parasito se encontra na forma de trofozoíto, aderindo às microvilosidades através do disco adesivo. A proliferação ocorre através da fissão binária de forma simétrica devido ao estímulo dos hidratos de carbono e bile presentes no duodeno, e assim, promovendo um atapetamento da mucosa intestinal pelo parasito e dificultando o processo de absorção do hospedeiro (ADAM, 2001; RAJURKAR *et al.*, 2012). No entanto, em 1981 foram encontrados trofozoítos em outros locais menos comuns como a vesícula biliar, nos ductos biliares, lavado bronco-alveolar e no trato urinário (MEYERS, 1977; STEVENS, 1981). Em 1996, SANAD *et al.*, relataram a presença de trofozoítos no estômago de um indivíduo, sendo confundidos com quadros de gastrite devido ao refluxo biliar.

O encistamento ocorre quando alguns dos trofozoítos se desprendem da parede intestinal e chegam à região distal do intestino delgado, em pH mais alcalino, em torno de 7,8, com redução drástica dos níveis de água e nutrientes necessários para sua sobrevivência, como a ausência de lipoproteínas (LUJÁN *et al.*, 1996). Assim, os cistos formados devido às condições desfavoráveis apresentam uma forma altamente resistente ao ambiente e serão liberados pelas fezes (ADAM, 2001).

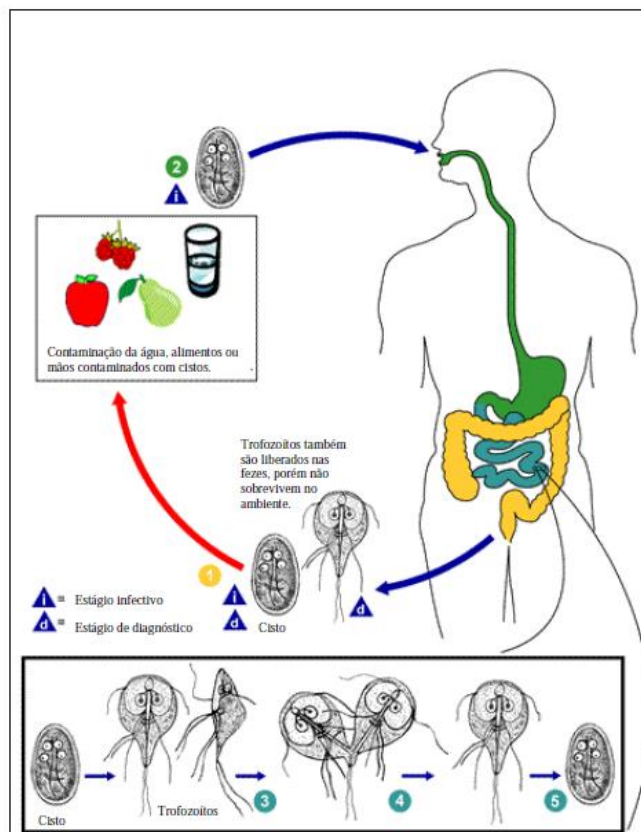


Figura 3: Ciclo biológico de *Giardia lamblia*. (1) Eliminação dos cistos e trofozoítos pelas fezes. (2) Ingestão de cistos através da água e alimentos contaminados. (3) Trofozoítos no intestino delgado. (4) Fissão binária dos trofozoítos. (5) Encistamento. (i) Estágio infectivo, (d) Estágio diagnóstico. Fonte: Adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

## 1.4 GIARDÍASE – PATOLOGIA

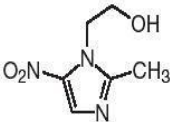
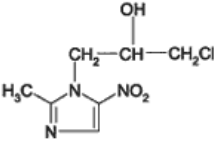
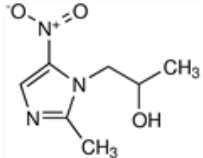
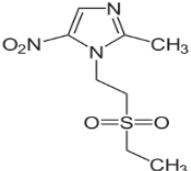
O processo patogênico da doença é caracterizado pelo atapetamento dos trofozoítos no endotélio intestinal, que ocasiona uma obstrução mecânica e redução da absorção dos nutrientes (CAETANO, *et al.*, 2013). Os trofozoítos expressam enzimas proteolíticas e moléculas de superfície que auxiliam na adesão transitória dos discos adesivos no epitélio intestinal (BURET, 2008). O ato de aderir e desprender-se do endotélio deixam deformidades nas microvilosidades, induz uma resposta inflamatória, aumenta a multiplicação de enterócitos e atrofia das vilosidades, além de aumentar a permeabilidade intestinal, diminuir as enzimas entéricas, sendo um fator chave para a formação da diarreia esteatorréica e da má absorção dos nutrientes (HALLIEZ *et al.*, 2013; ADAM, 2001).

A sintomatologia é evidenciada pela eliminação de fezes esteatorréicas, dores abdominais, flatulência, náuseas e síndrome de má absorção (RAJURKAR, *et al.*, 2012). A severidade da doença é determinada pelo estado nutricional, imunológico e idade do hospedeiro, do número de cistos ingeridos e da virulência do parasito (SAVIOLI, 2006; THOMPSON, 2004). Contudo, sabe-se que os trofozoítos de *Giardia lamblia* não secretam toxinas conhecidas, não são invasivos, porém são capazes de causar diarreia aguda e crônica (USEPA, 1989).

## 1.5 TRATAMENTO

Desde 1955 a classe de fármacos dos nitroimidazóis vem sendo estudada devido à toxicidade e a alta seletividade para bactérias e protozoários anaeróbios. Os principais quimioterápicos utilizados para o tratamento de giardíase são os fármacos da classe dos nitroimidazóis: o metronidazol, o tinidazol, secnidazol e o ornidazol (Tabela 1). A droga de escolha para o tratamento de giardíase é o metronidazol, sendo também bastante eficaz para o tratamento de tricomoníase (*Trichomonas vaginalis*) e amebíase invasiva (*Entamoeba histolytica*) (GARDNER e HILL, 2001, UPCROFT e UPCROFT, 2001).

Tabela 1: Fármacos utilizados no tratamento da giardíase

Fármacos	Estrutura
Metronidazol	
Ornidazol	
Secnidazol	
Tinidazol	

Fonte: [www.chemopharmaul.cz/en/produkty\\_katalog\\_por/](http://www.chemopharmaul.cz/en/produkty_katalog_por/)  
[www.drugs.com/pro/metronidazole.html](http://www.drugs.com/pro/metronidazole.html) // [www.medicinescomplete.com/.../13227-b.htm/commons.wikimedia.org/wiki/File:Tinidazol.svg](http://www.medicinescomplete.com/.../13227-b.htm/commons.wikimedia.org/wiki/File:Tinidazol.svg)

O metronidazol é uma substância de cadeia cíclica que possui um grupamento nitro, o qual precisa ser reduzido para se tornar ativo e causar danos à célula. Esta droga é rapidamente absorvida pelo corpo, penetrando nos tecidos e secreções corporais, metabolizada no fígado e excretada pela urina (BENDESKY *et al.*, 2002). Ocorrendo assim a descarboxilação do

piruvato pela enzima piruvato: ferredoxina oxireductase (PFOR), que está acoplada a redução da ferredoxina e é capaz de ativar o metronidazol em meio intracelular, gerando radical nitro tóxico pela redução do grupo nitro. O radical tóxico formado interage com as macromoléculas essenciais ligando covalentemente ao DNA, causando quebra da fita, ligações cruzadas e consequentemente a morte do trofozoíto (TOWNSON *et al.*, 1994; TOWNSON *et al.*, 1996). Estes efeitos em trofozoítos se comportam de forma efetiva, enquanto que na forma cística se comporta de forma ineficaz, uma vez que a parede que o envolve dificulta a permeabilidade de drogas como estratégia de barreira (THOMPSON *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 2000).

A droga possui uma difícil metabolização em células aeróbicas, assim a mesma entra de forma inativa e somente após sua metabolização na célula alvo poderá causar algum efeito nas células do hospedeiro (LIU *et al.*, 2000). Vários efeitos colaterais estão relacionados ao uso do metronidazol, dentre eles o gosto metálico na boca, dores de cabeça, náusea, vômitos, etc. Estudos demonstraram o efeito mutagênico do metronidazol para bactérias e carcinogênico para ratos em altas doses de aplicação. Entretanto, dados de carcinogenicidade do metronidazol em humanos ainda são ambíguos (BENDESKY *et al.*, 2002; GARDNER e HILL, 2001). Hoje o metronidazol é umas das drogas mais utilizadas para o tratamento da infecção por *Giardia lamblia*.

Ainda da classe dos nitroimidazóis, o tinidazol (Fasigyn<sup>®</sup>) também apresenta efeitos significativos *in vitro*, porém este também apresenta efeitos colaterais intensos. Outro fármaco derivado dos nitroimidazóis é o ornidazol, que apresenta excelentes resultados quando administrado por vários dias, sendo eficaz também em dose única (92-100%). Porém estudos *in vitro* demonstraram efeitos genotóxicos e citotóxicos em culturas de sangue periférico humano (LÓPEZ *et al.*, 2003). O secnidazol também apresenta resultados eficazes e ambas as drogas apresentam a meia-vida longa, reduzindo a toxicidade desses compostos quando comparados com o metronidazol, permitindo o tratamento em dose única. Devido aos seus efeitos colaterais, como distúrbios gastrointestinais, também não são recomendados



pela FDA (Food and Drug Administration) (GARDENER e HILL, 2001; LÓPEZ *et al.*, 2003).

As atuais drogas de escolha para o tratamento de giardíase, principalmente o metronidazol, apresentam falhas em cerca de 20% dos casos devido à resistência ao medicamento. Essa resistência ocorre em decorrência do emprego indiscriminado, condutas terapêuticas inadequadas, ao baixo custo e acessibilidade destes fármacos (UPCROFT e UPCROFT, 2001). Alguns estudos mostraram que elevadas doses do metronidazol e falhas no tratamento ocasionam resistência, provavelmente por afetar o metabolismo glicolítico do trofozoíto, reduzindo a atividade da piruvato:ferredoxina oxidoreductase, enzima necessária para a ativação dos nitroimidazóis no metabolismo do parasito (DUNN *et al.*, 2010; TEJMAN-YARDEN *et al.*, 2011). Desta forma, a busca de novos fármacos para uso para o tratamento contra a giardíase se torna cada vez mais necessária.

## 1.6 POLIAMINAS

As poliaminas (PA) são moléculas de baixo peso moleculares, não protéicas, de bases orgânicas alifáticas e nitrogenadas, apresentando o grupo protonado –  $\text{NH}_3^+$ , aminas bioativas, que apresentam uma carga positiva que contribuem para a interação com os bioligantes carregados negativamente, a exemplo dos ácidos nucleicos, proteínas e fosfolipídios. Estas aminas bioativas podem ser encontradas nas formas de diaminas e poliaminas, sendo conhecidas como poliaminas (TABOR e TABOR, 1999; COHEN, 1998).

As poliaminas biogênicas podem ser caracterizadas em cinco principais componentes: putrescina (Put) (1,4- diaminobutano), que é a precursora das poliaminas; espermidina (Spd), espermina (Spm) e as poliaminas cadaverina, norespermidina e 1,3 diaminopropano (YARLETT, 1988) (Figura 4). Estes polications são encontrados em todos os organismos vivos e desempenham importantes funções metabólicas, na biogênese ribossomal, modulação dos canais iônicos, transcrição, tradução, diferenciação e proliferação celular (DAVIDSON *et al.*, 1999; PEGG, 2009), além de apresentar um importante

papel na proteção de membranas e macromoléculas, como DNA, RNA e contra o estresse oxidativo (TABOR e TABOR *et al.*, 1984).

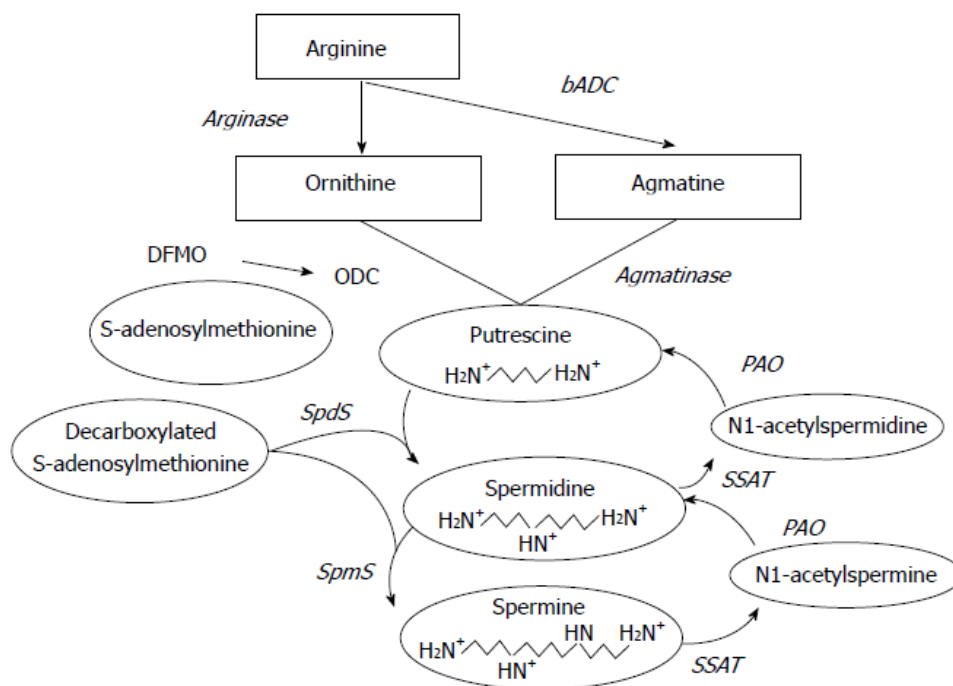


Figura 5: Representação esquemática do metabolismo das poliaminas. ODC: descarboxilase ornitina; PAO: Poliamina oxidase; SSAT: espermidina - espermina-1-N-acetiltransferase (RUSSO *et al.*, 2014).

As poliaminas apresentam-se protonadas, com cargas positivas em cada átomo de nitrogênio e atuam como “supercátions” equivalentes, porém apresentam características que são diferentes daqueles de  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{2+}$  para a interação com RNA e outras moléculas ácidas, uma vez que os grupos aminos primário e secundário protonados a pH fisiológico interagem eletrostaticamente com estas moléculas carregadas negativamente (BACHRACH, 2005). Essas apresentam alguns mecanismos de feedback associados à biossíntese, degradação, absorção e excreção celular (PEGG *et al.*, 2009; 1999; WALLACE *et al.*, 2003; IGARASHI *et al.*, 2010).

As poliaminas são biomoléculas essenciais para diversas funções celulares, atuando principalmente na regulação do crescimento e diferenciação celular em todos os organismos vivos. O baixo nível de poliaminas pode resultar em inibição da proliferação e diferenciação, bem como em morte

celular por apoptose ou necrose (CRISS, 2003). A via de síntese e regulação das poliaminas quando ativadas são determinantes em células tumorais, uma vez que estas podem contribuir com o desenvolvimento do câncer, além dos seus metabólitos fornecerem meios altamente sensíveis para o diagnóstico precoce de doenças humanas como o câncer, acidente vascular cerebral e insuficiência renal (PEGG, 1988; IGARASHI e PARK, 2013).

A putrescina, espermina e espermidina são as poliaminas que estão mais envolvidas nestes processos biológicos fundamentais para o desenvolvimento celular. Alguns estudos mostram que as poliaminas putrescina e espermidina predominam em maior quantidade em células procarióticas, que crescem mais rapidamente, e que espermina e espermidina são predominantes em células eucarióticas, que proliferam mais lentamente (GERNER, 2004; IGARASHI *et al.*, 2010).

As vias de biossíntese das poliaminas apresentam diferentes papéis biológicos, principalmente as vias de síntese e conversão que diferem entre as células de mamíferos, protozoários e plantas, compreendendo importantes alvos quimioterápicos e de quimioprevenção (MINOCHA *et al.*, 2014; MÜLLER *et al.*, 2001). Desta forma, há vários estudos em expansão que estão empregando antagonistas metabólicos da via de poliaminas na busca de mecanismos cistostáticos/carcinostáticos em diferentes tipos celulares (THOMAS e THOMAS, 2001).

### 1.6.1 Via de poliaminas

As poliaminas naturais putrescina, espermidina e espermina são biomoléculas catiônicas essenciais com diferentes funções celulares, sendo encontradas em todas as células eucarióticas e procarióticas. Estas apresentam um papel fundamental na proliferação celular, diferenciação celular e síntese de macromoléculas para que atinjam condições ótimas de desenvolvimento (HEBY *et al.*, 2003). A regulação da via de poliaminas

também ocorre em células tumorais, impondo um crescimento celular elevado e estabelecendo suas características fenotípicas (CASERO *et al.*, 2007).

Os organismos eucariontes e procariontes apresentam níveis aumentados de poliaminas quando há estímulos regulatórios da célula, sendo diferenciados através das distintas vias e quantidade de biomoléculas intracelulares. Para que ocorram estas sínteses é fundamental a presença das enzimas ornitina descarboxilase (ODC) e a S-adenosil-L-metionina descarboxilase (SAMDC) (BRUN *et al.*, 1996). Estudos experimentais mostram que em células de mamíferos a síntese de poliaminas ocorre devido à descarboxilação do aminoácido ornitina pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), enquanto os procariontes e eucariontes primitivos dão início a síntese através da descarboxilação da arginina e agmatina ureidrolase, ambas precursoras da síntese de putrescina (TABOR e TABOR, 1985).

A partir da putrescina, a espermidina e espermina serão sintetizadas, ou seja, a espermidina será sintetizada pela putrescina e a espermina pela espermidina, por transferência da porção aminopropil descarboxilado da S-adenosilmetionina (S-AdoMet), sendo catalisadas pelas reações espermidina sintase e espermina sintase. Algumas enzimas promovem a retroconversão da espermina a espermidina e espermidina a putrescina: a espermina oxidase catalisa diretamente a conversão de espermina a espermidina e espermidina/espermina-1-N-acetiltransferase (SSAT), e a acetilpoliamina oxidase (PAO) catalisa a conversão da espermina a espermidina e espermidina a putrescina, porém algumas reações como as aminopropil transferases que sintetizam a formação da espermidina e espermina são consideradas irreversíveis (Figura 5) (PEGG *et al.*, 1988; NISHIMURA *et al.*, 2002; RUSSO *et al.*, 2014).

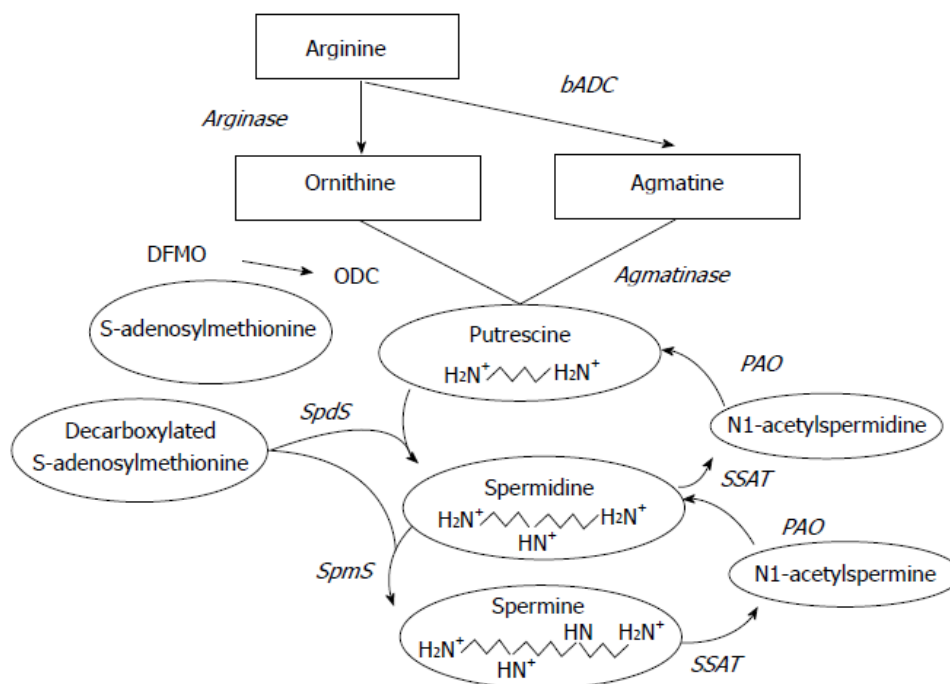


Figura 5: Representação esquemática do metabolismo das poliaminas. ODC: descarboxilase ornitina; PAO: Poliamina oxidase; SSAT: espermidina - espermina-1-N-acetiltransferase (RUSSO *et al.*, 2014).

Nos eucariontes, principalmente nas células de mamíferos, a via de metabolismo das poliaminas ocorre através da síntese de putrescina pela descarboxilação da ornitina, realizada através da enzima ornitina descarboxilase (ODC), que apresenta um oncogene regulador fundamental para o controle do crescimento e diferenciação celular; em seguida, a putrescina é convertida em espermidina, e conseguinte é convertida em espermina (IGARASHI e PARK, 2013). Os procariontes, eucariontes primitivos e, principalmente, os protozoários parasitas e fungos, iniciam a síntese de putrescina da descarboxilação da arginina e agmatina ureidrolase, em sequência a enzima S-adenosilmetionina descarboxilase (AdoMetDC) catalisa a formação de S-adenosilmetionina descarboxilada, que doa o grupo aminopropil para a conversão de putrescina em espermidina (TABOR e TABOR, 1985). No entanto, diferente das células de mamíferos, estes não

produzem ou carecem da enzima espermina sintase, mas apresenta em pequena quantidade, a espermina, que provavelmente foi adquirida através da absorção do seu hospedeiro. Desta forma, a diferença da via de poliaminas entre parasitos e células de mamíferos pode ser considerada como um importante alvo quimioterápico para atuar seletivamente (HEBY *et al.*, 2003; REGUERA *et al.*, 2005).

## 1.6.2 Poliaminas: ciclo celular

A nível celular têm sido mostrado o envolvimento das poliaminas nos diferentes processos biológicos, tais como controle da expressão gênica, atividade enzimática, transcrição, processos de proliferação e diferenciação celular (GERNER, 2004). Em complemento a essas atividades, essas biomoléculas também têm sido relacionadas à proteção do DNA celular contra agentes externos e lesões radioativas (RIDER *et al.*, 2007; WARTERS *et al.*, 1999).

Alguns estudos indicam que uma consequência da ligação entre o DNA e a poliamina é a condensação cromática, que está relacionada com diversas funções celulares (IGARASHI *et al.*, 2010). Durante a progressão celular, a espermidina e espermina apresentam uma associação com os cromossomos mitóticos altamente compactados, induzindo efeitos estabilizadores sobre a estrutura da cromatina (LAITINEN *et al.*, 1998).

A síntese de poliaminas inicia-se precocemente durante a fase G1 do ciclo celular, sendo um requisito fundamental para o começo dos processos de proliferação celular, que intervém nas concentrações enzimáticas de ODC. Em seguida, após o aumento das concentrações de ODC e poliaminas na fase G2, essas regulam os pontos de checagem durante o ciclo celular e a degradação de ciclinas, regularizando as concentrações das mesmas (THOMAS e THOMAS, 2001; IACOMINO *et al.*, 2012). A elevada concentração intracelular de ODC e poliaminas é expressa principalmente em processos carcinogênicos,

sendo bem estabelecido em estudos oncogênicos que comprovam a alta atividade da ODC1 associadas ao crescimento de tumores severos (WALLACE e CASLAKE, 2001; GAMBLE *et al.*, 2012).

O baixo e o alto nível de poliaminas podem resultar em inibição de proliferação e diferenciação celular e, também ativar o gatilho de morte celular, apoptose ou necrose (SCHIPPER *et al.*, 2000; CRISS, 2003). No entanto, alguns estudos mostraram que as poliaminas também podem ter um efeito protetor contra a morte celular. Estudos conduzidos com a espermina, administrada por via exógena em células, preveniu o estresse oxidativo e a morte celular apoptótica através da estabilização da cromatina, exceto quando estas estavam em altas concentrações (HARADA e SUGIMOTO, 1997; LAITINEN *et al.*, 1998; WALLACE *et al.*, 2003). Contudo, as pesquisas mostram que a morte celular via apoptose é ocasionada via citocromo c mitocondrial, reduzindo o potencial de membrana e iniciando a atividade de caspase 3, além da associação do aumento da concentração de ODC (EREZ *et al.*, 2002; IGARASHI *et al.*, 2010).

### 1.6.3 Poliaminas em protozoários

Estudos sobre o metabolismo e o papel das poliaminas sob condições fisiológicas têm sido realizados, tanto em parasitos quanto em hospedeiros, devido à capacidade de protonação dos grupos amino que se tornam catiônicos no pH intracelular. Estes, por sua vez, interagem com macromoléculas aniônicas como ácidos nucleicos, lipídios e proteínas que estão intrinsecamente ligados aos processos celulares (REGUERA *et al.*, 2005). Além de estarem envolvidos em processos biológicos fundamentais como transcrição, tradução, diferenciação e proliferação celulares, também apresentam propriedades antioxidantes, reduzindo a lipoperoxidação de diversos agentes pró-oxidantes (BELLÉ *et al.*, 2004).

Alvos farmacológicos em protozoários podem ser identificados nas vias de transporte e conversão de poliaminas (MULLER *et al.*, 2001; BACCHI & YARLETT, 1995), a exemplo do bem sucedido uso da eflornitina em *Trypanosoma brucei* (BACCHI *et al.*, 1980), que permitiu o tratamento efetivo da doença do sono no continente africano. A DFMO (difluormetil ornitina) também tem efeito inibitório na proliferação axênica de *Giardia lamblia* (GILLIN *et al.*, 1994), bem como o análogo de putrescina 1,4-diamino-2-butanona (DAB) apresenta efeito citostático neste parasito (MAIA *et al.*, 2008). Alguns trabalhos de nosso grupo demonstram o efeito do análogo da putrescina (1,4-diaminobutano; tetrametileno-diamina), ocasionando aumento do estresse oxidativo pela destruição mitocondrial em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (MENEZES *et al.*, 2006; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2008). Este mesmo análogo também inibiu a proliferação de *Tritrichomonas foetus* (REIS *et al.*, 1999) tendo seu mecanismo de ação associado ao hidrogenossomo, organela redox presente neste protozoário. Em *Giardia lamblia*, houve interrupção da citocinese em trofozoítos tratados com DAB, além de uma tentativa de se diferenciar para a forma cística, uma provável resposta às condições de estresse (MAIA *et al.*, 2008).

Todos os protozoários apresentam em seu metabolismo as vias ligadas a poliaminas, cujas enzimas revelam potenciais alvos de novas terapias antiparasitárias, principalmente por apresentarem vias e necessidades metabólicas diferentes das presentes em células de mamíferos (MÜLLER *et al.*, 2001). Contudo, alguns análogos e derivados de aminas apresentaram uma significativa inibição do crescimento celular de *Giardia lamblia* quando comparados com o metronidazol (MAIA *et al.*, 2008; GIORDANI *et al.*, 2011). Desta forma, estes podem ser caracterizados como grandes alternativas promissoras para interferir nas vias metabólicas das poliaminas, já que apresenta importante modificação na biossíntese, captação e ligação das poliaminas primárias (MÜLLER *et al.*, 2001). Assim, a via metabólica das



poliaminas dos protozoários oferecer um importante alvo quimioterápico a ser estudado.

## 1.7 NOVAS ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

A giardíase é uma doença de distribuição mundial considerada negligenciada pela OMS e que apresenta um quadro de morbidade associado à síndrome de má absorção, diarreia, vômito e déficit cognitivo, acometendo principalmente crianças (SAVIOLI *et al.*, 2006). O desta enfermidade vem sendo realizado desde 1955 com fármacos da classe dos nitroimidazóis devido à alta eficácia em protozoários anaeróbicos, além de possuir uma boa absorção oral, metabolismo hepático e distribuição tecidual (UPCROFT e UPCROFT, 2001; RAETHER e HANEL, 2003).

Há uma variedade de fármacos sendo utilizados para o tratamento da giardíase, mas a droga de escolha permanece o metronidazol. No entanto, a maioria desses medicamentos exibe um efeito colateral significativo, contraindicados em alguns casos e apresentam uma resistência clínica com altas taxas de recorrência (ZAAT *et al.*, 1997; SADJJADI *et al.*, 2001; UPCROFT e UPCROFT, 2001). Devido a isto, tem aumentado a cada dia a procura por novas drogas que inibam a capacidade proliferativa do parasito, além de identificar novas vias específicas para o tratamento da giardíase (MULLER *et al.*, 2001).

Novos estudos com análogos e/ou inibidores da síntese de poliaminas podem levar à elucidação dos mecanismos de ação envolvidos, além da possibilidade de combinação aos já empregados no tratamento de giardíase (e.g.: metronidazol), favorecendo o estabelecimento de novos regimes terapêuticos mais seguros e eficazes. Diversos fármacos usados contra protozoários parasitas utilizam como mecanismo de ação a indução de estresse oxidativo através da ação pró-oxidante ou pela inibição de defesas anti-oxidantes. Sendo assim, uma alternativa quimioterápica para o controle de

infecções por *Giardia lamblia* seria o uso de substâncias que interfiram na resposta antioxidante do parasito.

A ciclohexilamina (CHA), é conhecida como antagonista da via de poliaminas devido à sua ação inibidora da espermina sintase (KOBAYASHI *et al.*, 2005; SAMEJIMA e YAKUGAKU, 2006). Num estudo realizado com tripanossomatídeos foi demonstrada a inibição da proliferação celular devido à redução dos níveis endógenos de espermidina ao utilizar CHA (GONZALEZ *et al.*, 2001). Assim, esta substância sugere uma possível ferramenta parasiticida.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar o efeito da ciclohexilamina em trofozoítos de *Giardia lamblia* como alvo farmacológico no metabolismo de poliaminas, buscando alternativas de tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais e aumentar a eficácia das drogas utilizadas atualmente contra a giardíase.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Padronizar as condições experimentais e avaliar o ensaio colorimétrico para quantificação de trofozoítos;
- Caracterizar a sensibilidade do metabolismo de poliaminas em trofozoítos de *Giardia lamblia*;
- Determinar a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) da proliferação celular da substância em trofozoítos de *G. lamblia* isoladas e/ou combinação com metronidazol;
- Determinar a citotoxicidade em culturas de esplenócitos murinos;
- Mensurar a peroxidação lipídica induzida através da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico induzida pela CHA;
- Avaliar as alterações ultraestruturais e morfológicas induzidas pelo tratamento de trofozoítos de *G. lamblia* com a CHA através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV), elucidando possíveis mecanismos de ação do composto testado.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 CULTIVO DE *G. LAMBLIA*

A cepa WB de *G. lamblia* utilizada neste estudo foi gentilmente cedida pela Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Frances D. Gillin, do departamento de Patologia da Universidade da Califórnia em San Diego.

Trofozoítos da cepa WB de *G. lamblia* foram axenicamente cultivados em meio TYI-S-33, suplementado com 10% (volume/volume) de soro bovino adulto (SBA), à temperatura de 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, por 48 a 72 horas. O meio TYI-S-33 é o pH é ajustado a 7,2, sendo este esterilizado em filtro o vácuo com membrana filtrante de 0,22 µm (Millipore) de porosidade.

### 3.2 ANIMAIS

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ). O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ.

### 3.3 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os procedimentos envolvendo manipulação de animais experimentais foram realizados, rigorosamente, segundo os princípios preconizados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, de acordo com a Lei Sergio Arouca 11.794 de 2008, tendo o

projeto sido aprovado pelo comitê supracitado com o número de licença 023/09.

### 3.4 PADRONIZAÇÃO E ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para análise da proliferação celular, inóculos de  $2,5$  a  $5 \times 10^5$  trofozoítos de *G. lamblia* foram incubados a  $37$  °C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de ciclohexilamina (CHA) (SIGMA Chem. Co), metronidazol (MTZ) (A QUÍMICA) e dimetilsulfóxido (DMSO) (SIGMA Chem. Co). Durante o período de 48 ou 72 horas foi realizada a avaliação da proliferação celular através da observação ao microscópio invertido e quantificada em fase logarítmica, pelo método colorimétrico desenvolvido por Busatti e Gomes (2007). Verificando a relação de linearidade entre número de células e detecção fotométrica do azul de metileno.

Em resumo, o sobrenadante contendo o meio de cultura é retirado e cada poço é lavado, cuidadosamente, duas vezes com 1 mL de salina tamponada com fosfato (PBS) à  $37$  °C, pH 7,2. Imediatamente após, os trofozoítos aderidos à placa foram fixados com 1 mL de metanol por 10 minutos. Em seguida nova lavagem foi realizada, com 1 mL de PBS, para retirar o excesso de metanol. As células foram coradas com 500 µL de azul de metileno a 0,1% em tampão borato 0,1 M, pH 8,7 por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por meio de sucessivas lavagens com 1 mL do mesmo tampão e o corante associado aos trofozoítos foi extraído pela adição de 500 µL de HCl a 0,1 M, por 10 minutos. A leitura foi realizada com 200 µL do HCL a 0,1M após 10 minutos de extração do corante através do leitor de ELISA VERSA max, Molecular Devices a 650 nm.

O percentual de proliferação foi calculado através da seguinte equação:

$$\% \text{ Proliferação} = (\text{Absorbância do tratado} / \text{Absorbância do controle}) \times 100$$

### 3.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO

Inóculos de 1 a  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *Giardia* foram incubados a 37°C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de DMSO, CHA e/ou metronidazol, por 48 horas. O crescimento das culturas foi avaliado pela observação em microscópio invertido e quantificado pelo método colorimétrico de Busatti & Gomes (2007).

O cálculo do percentual de inibição se deu através da equação abaixo. Em seguida, os dados são plotados no GraphPad Prism 5.0, determinando-se a IC<sub>50</sub>.

### 3.6 DETECÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

Os trofozoítos de *Giardia lamblia* foram incubados durante quatro horas em presença ou ausência de CHA e/ou espermidina. Após esta incubação, as células foram centrifugas por dez minutos a 1500 rpm, lavadas em PBS, pH 7,4, ressuspendidas em 200 µL da mesma solução, sendo acrescido 200 µL de 1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 50% de ácido acético, homogeneizado e incubado a 97-100°C para a obtenção da reação colorimétrica. Após a reação colorimétrica as amostras foram colocadas no gelo, adicionado 500 µL de n-butanol, sendo centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos em temperatura de 4°C e o sobrenadante foi utilizado para medir a quantidade de produção de substâncias reativas ao TBA numa absorvância de 532 nm em espectrofotômetro VersaMax comparando ao padrão obtido utilizando 1% TBA e PBS, à proporção de 1:2.

### 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os protozoários tratados com CHA foram fixados em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 4% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 durante 60 minutos. A pós-fixação foi realizada utilizando 1 % de tetróxido de ósmio, 0,8 % de ferricianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio no mesmo tampão por 40 minutos ao abrigo da luz.

Posteriormente, serão aderidos às lamínulas por meio de poli-L-lisina e após, foram desidratados em séries crescentes de acetona (30-100%). As amostras passaram pelo ponto crítico em um aparelho Balzers, para retirar a acetona e, posteriormente, estas lamínulas foram colocadas sob suportes metálicos para serem submetidas ao processo de metalização com uma camada de 20nm de ouro. Finalmente, foram observadas em um microscópio eletrônico de varredura modelo Jeol JSM-6390LV.

### 3.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

Os protozoários tratados com CHA foram fixados em 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 4% sacarose em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, em pH 7,2 por 60 minutos. Após a fixação, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão e em seguida foram pós- fixadas em solução de 1% tetróxido de ósmio em tampão de cacodilato de sódio à 0,1M contendo 0,8% de ferricianeto de potássio e 5mM de cloreto de cálcio, por 30 minutos ao abrigo

da luz. Em seguida os protozoários foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), repetindo-se a última concentração duas vezes.

Posteriormente, as amostras foram progressivamente infiltradas em resina Polybed® nas diluições 3:1, 2:1 e, por último, 100% de resina por 24 horas cada uma. As amostras foram incubadas por 72 horas à 60 °C para a polimerização da resina. Os blocos foram separados para a ultramicrotomia e, em seguida, foram obtidos cortes ultrafinos os quais foram coletados em grades de cobre de malha 400, limpas com ácido nítrico e lavadas com água. Logo após, contrastadas com 15% acetato de chumbo e 5% acetato de uranila por 5 minutos. Por último, as grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão analítico JEOL 1230, utilizando o programa Gatan DigitalMicrograph.

### 3.9 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

Para determinar a toxicidade das drogas foram utilizados  $1 \times 10^7$  esplenócitos, obtidos de camundongos Balb/c machos, que foram incubados por 24 horas em diferentes concentrações das drogas e de timidina tritiada (1  $\mu\text{Ci/poço}$ ) em meio RPMI 1640 com 5 % de soro fetal bovino, 0,08 % de gentamicina, 10 unidades/mL de penicilina e 0,01 % de estreptomicina. Em seguida, as amostras foram congeladas ou imediatamente as células foram obtidas por um coletor (MPXRI 96TI, Bradel, Gaithersburg, MD, USA), para posterior quantificação da radiação beta, emitida pela timidina tritiada, por um leitor (Multilabel Reader, Hidex, Turku, Finlândia). A vitalidade das células foi considerada como proporcional à incorporação de timidina tritiada e a toxicidade foi determinada subtraindo do grupo tratado com DMSO a 1 %, os grupos tratados com as drogas em questão, onde esse controle negativo foi considerado como 100 % de incorporação de timidina tritiada.

### 3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA



Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$  do programa GraphPad Prism, versão 6.00 – GraphPad Software Incorporate. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA TROFOZOÍTOS DE *GIARDIA LAMBLIA*

Para os experimentos com trofozoítos de *Giardia lamblia* em placas de 24 poços, uma curva padrão foi obtida inicialmente para demonstrar o grau de correlação entre a concentração de células, incubadas por 48 horas, e a absorbância encontrada através do método colorimétrico (figura 6). Foi encontrado um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) igual a 0,985, demonstrando que a linha de regressão amostral se ajusta aos dados.

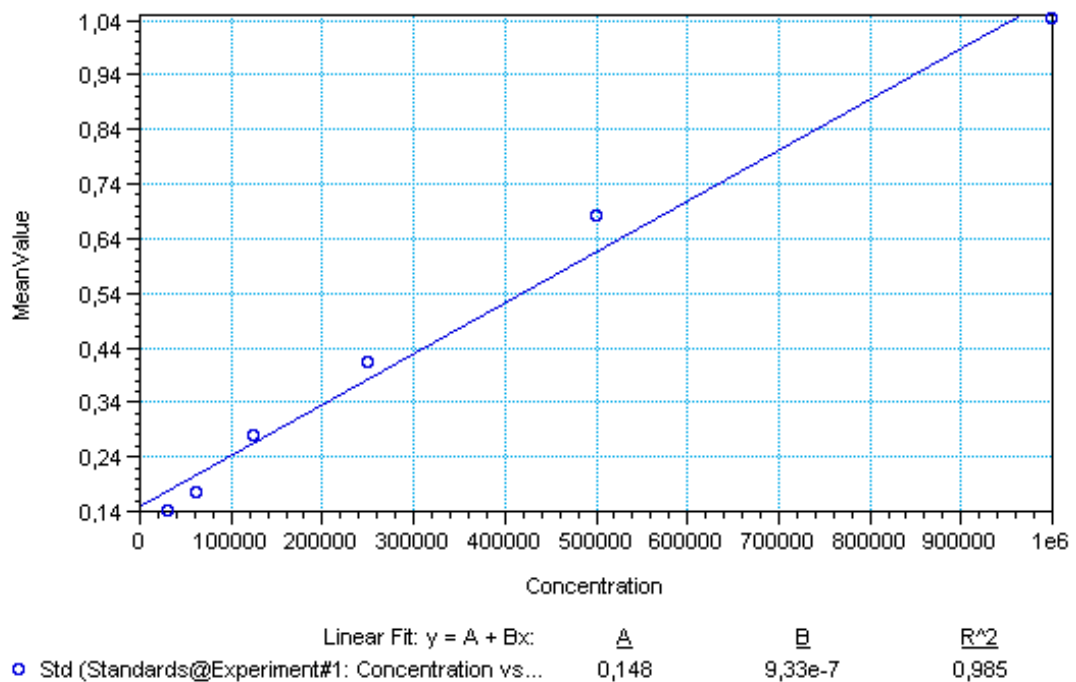
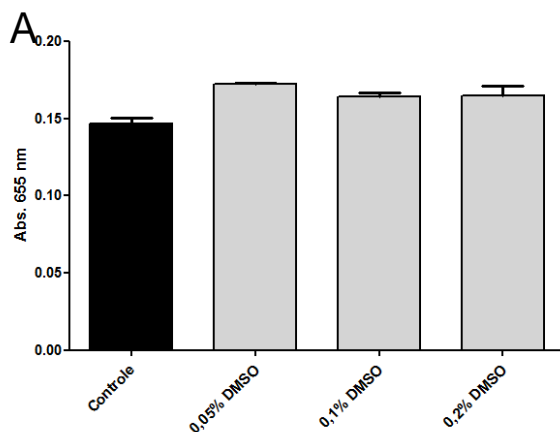


Figura 6: Curva padrão mostrando uma correlação positiva entre a concentração de trofozoítos de *G. lamblia* e a absorbância pelo método colorimétrico empregando o azul de metileno lido a 655 nm.

## 4.2 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE DO DMSO EM TROFOZOÍTOS DE *GIARDIA LAMBLIA*

Para a utilização do DMSO como diluente das substâncias testadas neste trabalho, experimentos para análise da citotoxicidade deste solvente orgânico foram realizados. As concentrações utilizadas foram 0,05%, 0,1% e 0,2% e as amostras foram coletadas em diferentes períodos (24, 48, 72 horas). Foi observado que curvas em diferentes concentrações de DMSO produziram o mesmo padrão de crescimento em comparação à curva controle, não havendo uma inibição significativa da proliferação (Figura 7).



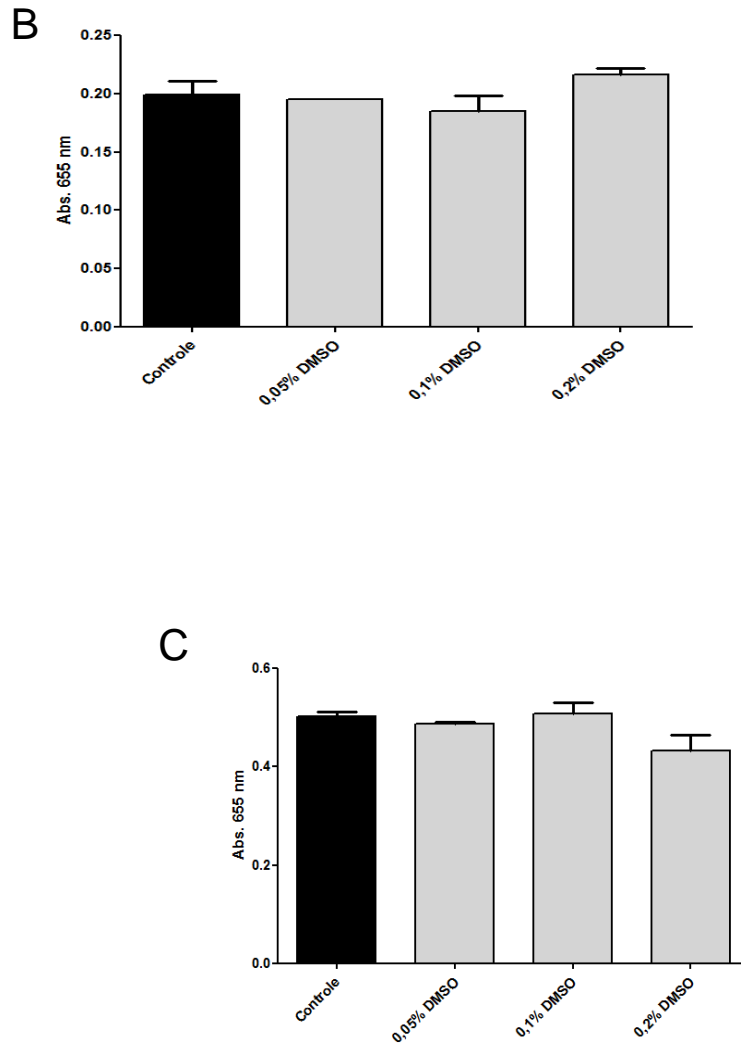
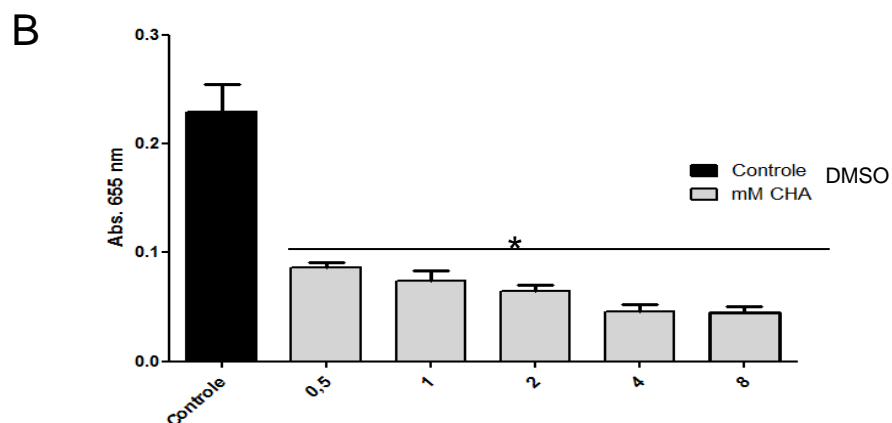
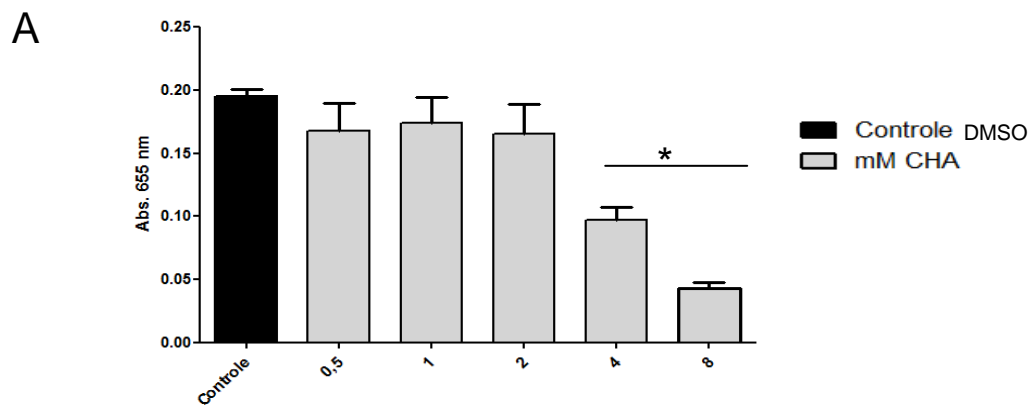


Figura 7: Curvas de crescimento do trofozoítos de *G. lamblia* em presença de DMSO nas diferentes concentrações (0,2; 0,1; e 0,05%) nos tempos de 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas.

### 4.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR DOS TROFOZOÍTOS DE *GIARDIA LAMBLIA* EM PRESENÇA DAS SUBSTÂNCIAS

A partir da padronização do método colorimétrico e avaliação da citotoxicidade do diluente utilizado, foi realizada uma curva dose-resposta da CHA em diferentes concentrações (8, 4, 2, 1 e 0,5 mM) e tempos (24, 48 e 72 horas) (Figura 8). A CHA diminuiu significativamente a proliferação dos

trofozoítos, demonstrando uma ação dose-dependente nestas concentrações. Foi determinada a concentração inibitória em 50% do crescimento ( $IC_{50}$ ) no período de 48 horas das cinco concentrações da CHA e do metronidazol (droga padrão ouro) (Figuras 8B). Na concentração de 4 mM, o CHA apresentou uma inibição superior a 80% (Figura 8C), sendo a sua  $IC_{50}$  em 48 horas aproximadamente 1,646 mM e o metronidazol cerca de 1,54  $\mu$ M (Figura 9). A efetividade da CHA contra trofozoítos de *Giardia lamblia in vitro* representa um efeito giardicida nestas concentrações.



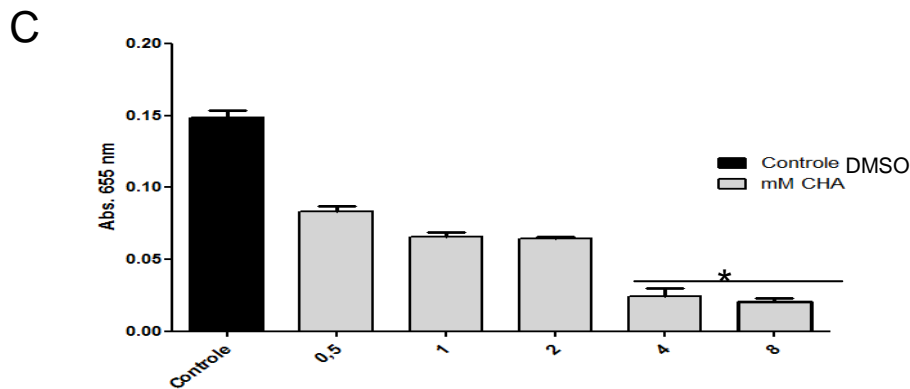


Figura 8: Avaliação da proliferação celular de trofozoítos de *Giardia lamblia* na presença de CHA em diferentes concentrações (8, 4, 2, 1 e 0,5 mM) nos tempos de incubação de 24 (A), 48 (B) e 72 (C) horas. \*  $p < 0,05$  pós-teste de Tukey.

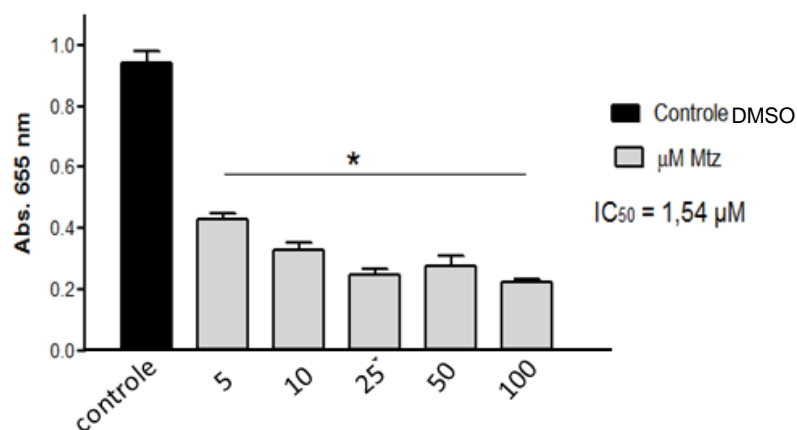


Figura 9: Avaliação da proliferação celular em diferentes concentrações de metronidazol em trofozoítos de *Giardia lamblia* para determinação da IC<sub>50</sub>. \*  $p < 0,05$  pós-teste de Tukey.

## 4.4 TOXICIDADE EM ESPLÊNÓCITOS

Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos da CHA em culturas de esplenócitos, nós realizamos a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, em um período de 24 horas. Em esplenócitos tratados com CHA, verificamos uma

diminuição na incorporação de timidina à medida que aumentamos a sua concentração, o que nos indica uma relação de dose-dependência (Figura 10). O valor de  $IC_{50}$  para este composto em esplenócitos foi cerca de 2 mM. Embora este seja um resultado desfavorável, a concentração em que o CHA causa seu efeito citotóxico em células do baço difere do utilizado contra trofozoítos de *Giardia lamblia*.

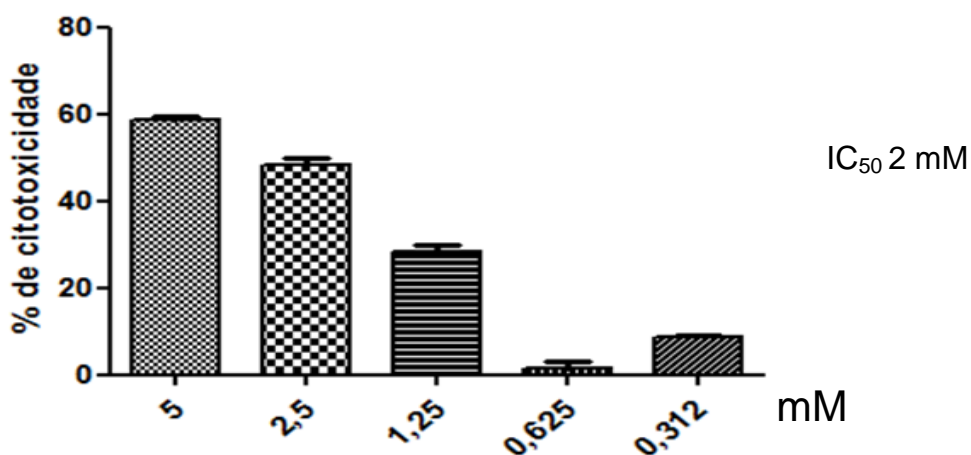


Figura 10: Inibição da incorporação de timidina tritiada por esplenócitos ( $1 \times 10^7$ ) de camundongos Balb/c machos, tratados com diferentes concentrações de CHA por 24 horas. Gráfico representativo de cinco experimentos independentes. pós-teste de Tukey .

## 4.5 DETECÇÃO DE TBARS

Com o objetivo de determinar os níveis de peroxidação lipídica apresentados por trofozoítos de *G. lamblia* submetidos ao tratamento com CHA, a técnica de detecção de TBARS foi realizada. As células foram incubadas em presença de CHA nas concentrações de 1, 2 e 4 mM e/ou espermidina, a 0,1 M. Observou-se uma redução parcial da produção de lipoperóxidos em parasitos tratados com a CHA nas concentrações utilizadas, porém sem significância estatística. A espermidina reverteu parcialmente o efeito deste análogo de poliamina, o que pode indicar a possível interferência do CHA no metabolismo de poliaminas em *Giardia lamblia* (Figura 11). Na concentração de 1 mM ocorreu a redução de Spd e inibição de PAO, enquanto que na concentração mais alta, 4 mM, a CHA pode exercer um papel antioxidante devido ao acúmulo de aminas.

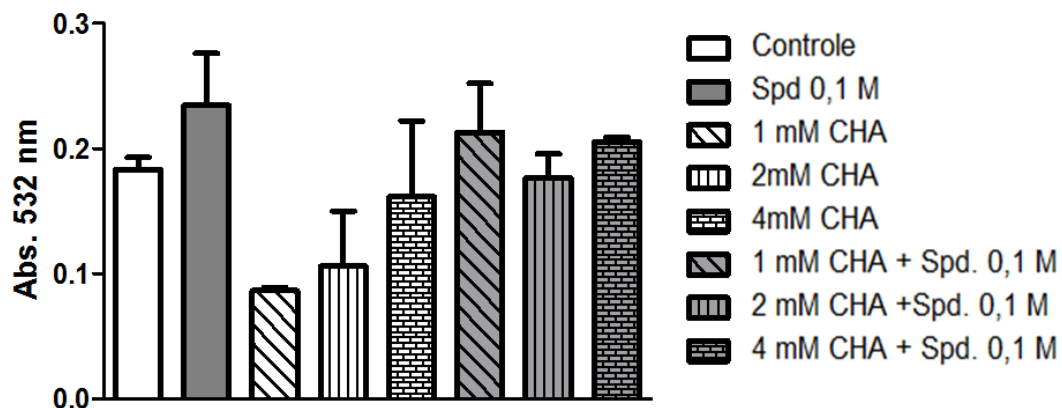


Figura 11: Detecção de lipoperóxidos pela produção de TBARS determinada a 532nm em trofozoítos de *G. lamblia* na presença de CHA (4, 2, 1 mM) e/ou espermidina (Spd) 0,1M. O tratamento nas diferentes concentrações de CHA não apresentou alteração no nível basal de peroxidação lipídica.

## 4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para verificar as possíveis ações da CHA na morfologia do trofozoíto *G. lamblia* tratados com CHA, nas concentrações 1, 2 e 4 mM, utilizando como controle o DMSO 0,05%, no período de 12, 24 e 48 horas, estes foram fixados e processados conforme a metodologia descrita. Desta forma, foi possível observar que os trofozoítos controle em todos os tempos apresentavam uma membrana levemente irregular com a aparência típica do protozoário, oito flagelos e discos adesivos íntegros (Figuras 12, 13 e 14) servindo como comparativo para os demais parasitos tratados.

Durante o tratamento com 1mM CHA em 12 horas, assim como o controle ( Figura 12A) apresentaram a membrana dorsal levemente irregular (Figura 12B) indicando que não houve alterações significativas em sua



morfologia. Porém, foi possível observar alterações de membrana, como pequenas protusões no dorso da célula nos tratados com 4mM CHA, 12horas (Figura12D), 1mM CHA, 24horas (Figura 13B), 2mM CHA, 48 horas( Figura 14B).

Processos característicos de encistamento foram vistos em todos os tempos do tratamento e em diferentes concentrações. Durante o período de 12 horas foi possível perceber uma possível internalização do disco adesivo (Figura 12C), assim como na concentração de 2mM de CHA em 24 horas que apresentou o disco adesivo bastante internalizado e coberto pela flange lateral (Figura 13C). Além disso, foram encontradas estruturas celulares sem flagelos (Figura 15A) e com aspecto ovalado (Figura 15B) que podem ser característicos da formação de pseudocistos.

Outra alteração importante foi a presença de trofozoítos com morfologias alteradas, presença de blebs na concentração de 2mM CHA, em 48 horas (Figura 14C), flagelos circundando o corpo de forma irregular nas concentrações de 1mM, em 48horas (Figura 14B) e 4mM CHA, em 12 horas (Figura 13D). Contudo, ainda foi observado a modificação no formato da célula e o rompimento da membrana dorsal nas células tratadas com 4mM CHA, em 48horas (Figura 14D).

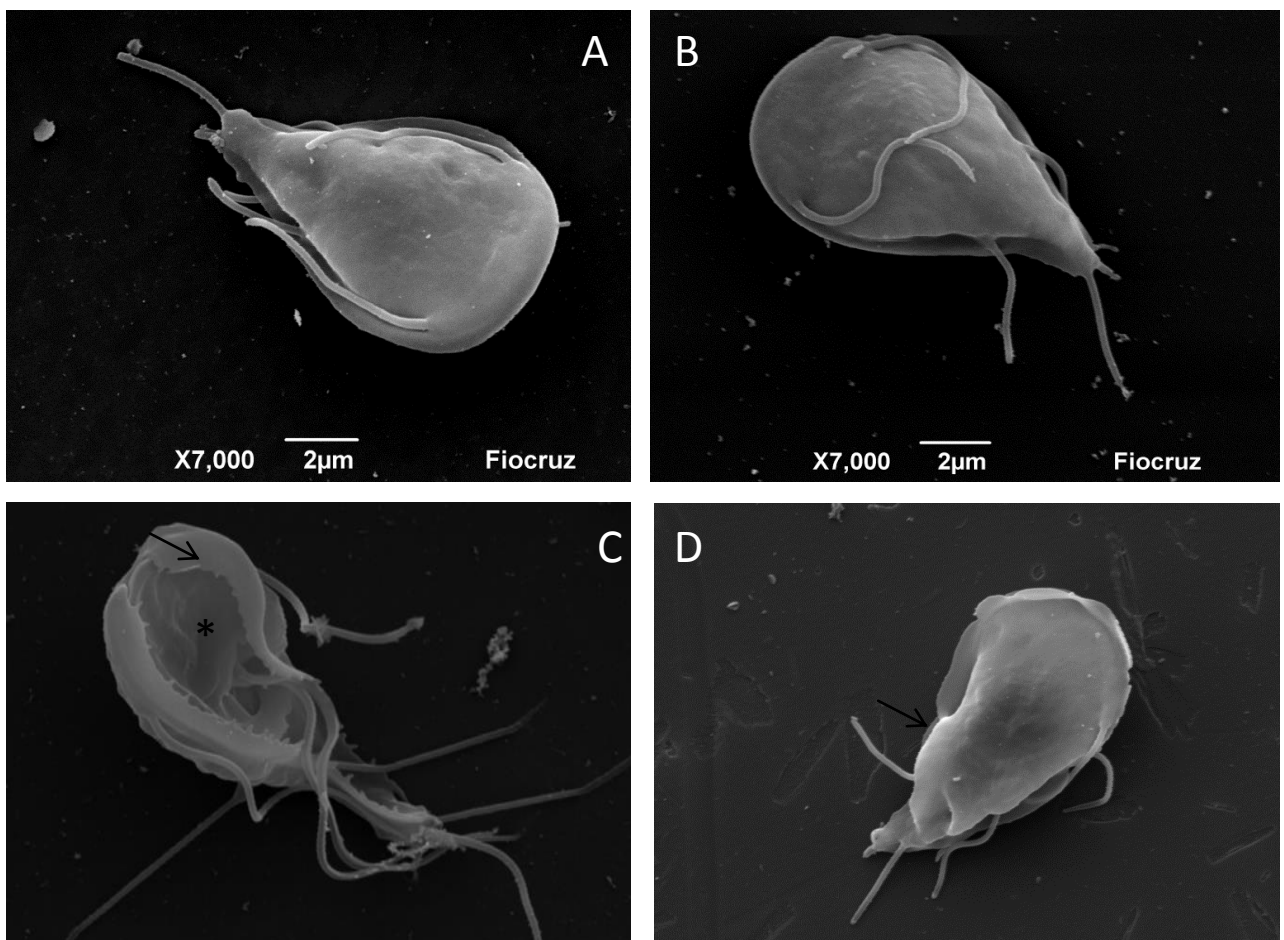


Figura 12: Alterações morfológicas em trofozoítos de *G. lamblia*, após 12 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C) e 4 mM (D) de CHA. Em A e B as células apresentaram a membrana dorsal levemente irregular; flange lateral (seta) internalizando o disco adesivo (\*) em C e em D alteração da morfologia geral da célula (seta).

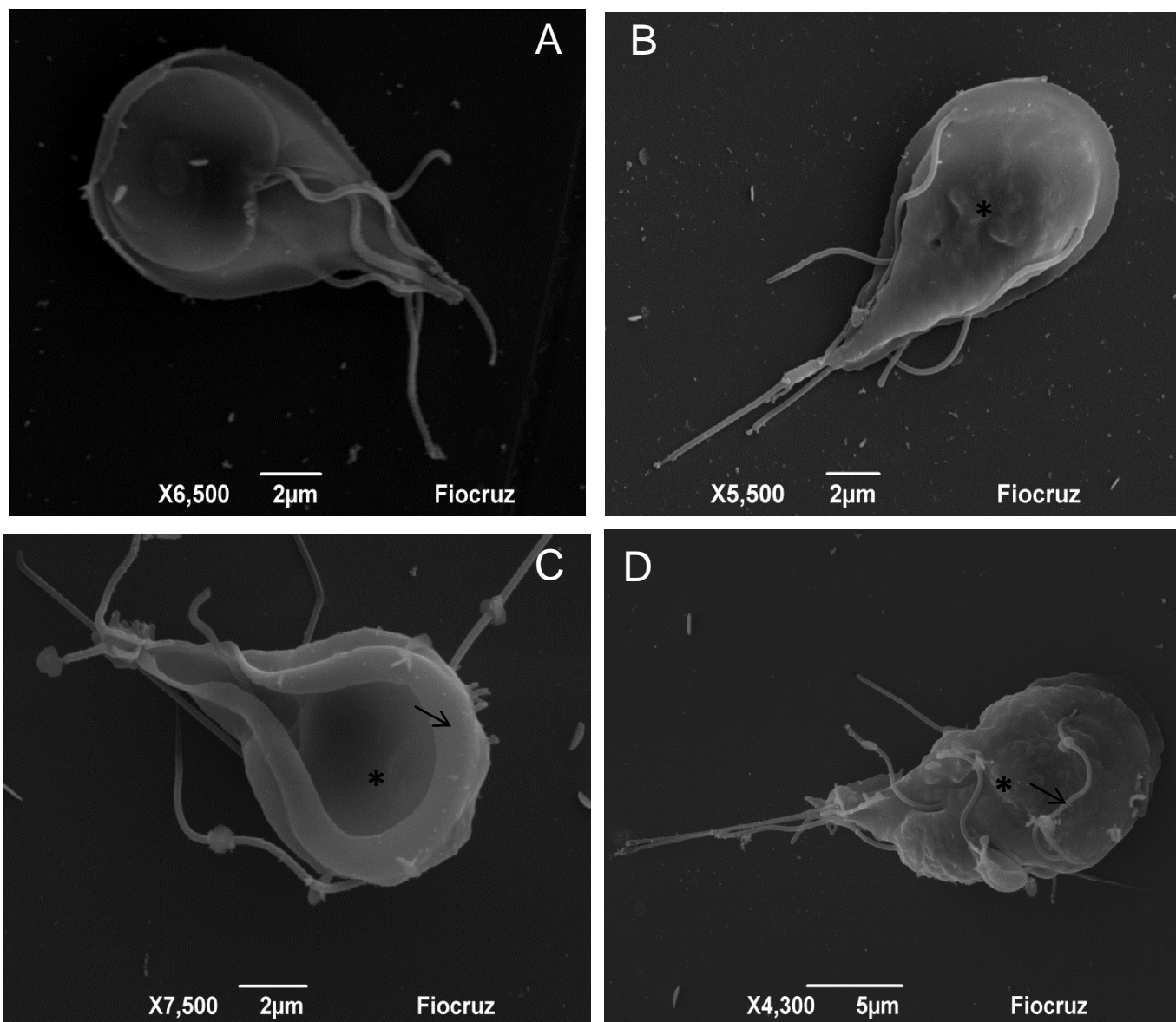


Figura 13: Alterações morfológicas em trofozoítos de *G. lamblia*, após 24 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C) e 4 mM (D) de CHA. Em A e B as células apresentaram a membrana dorsal levemente irregular; internalização do disco adesivo (\*) coberto pela flange lateral (seta) em C e em D alteração morfológica da membrana ventral e disco internalizado (seta).

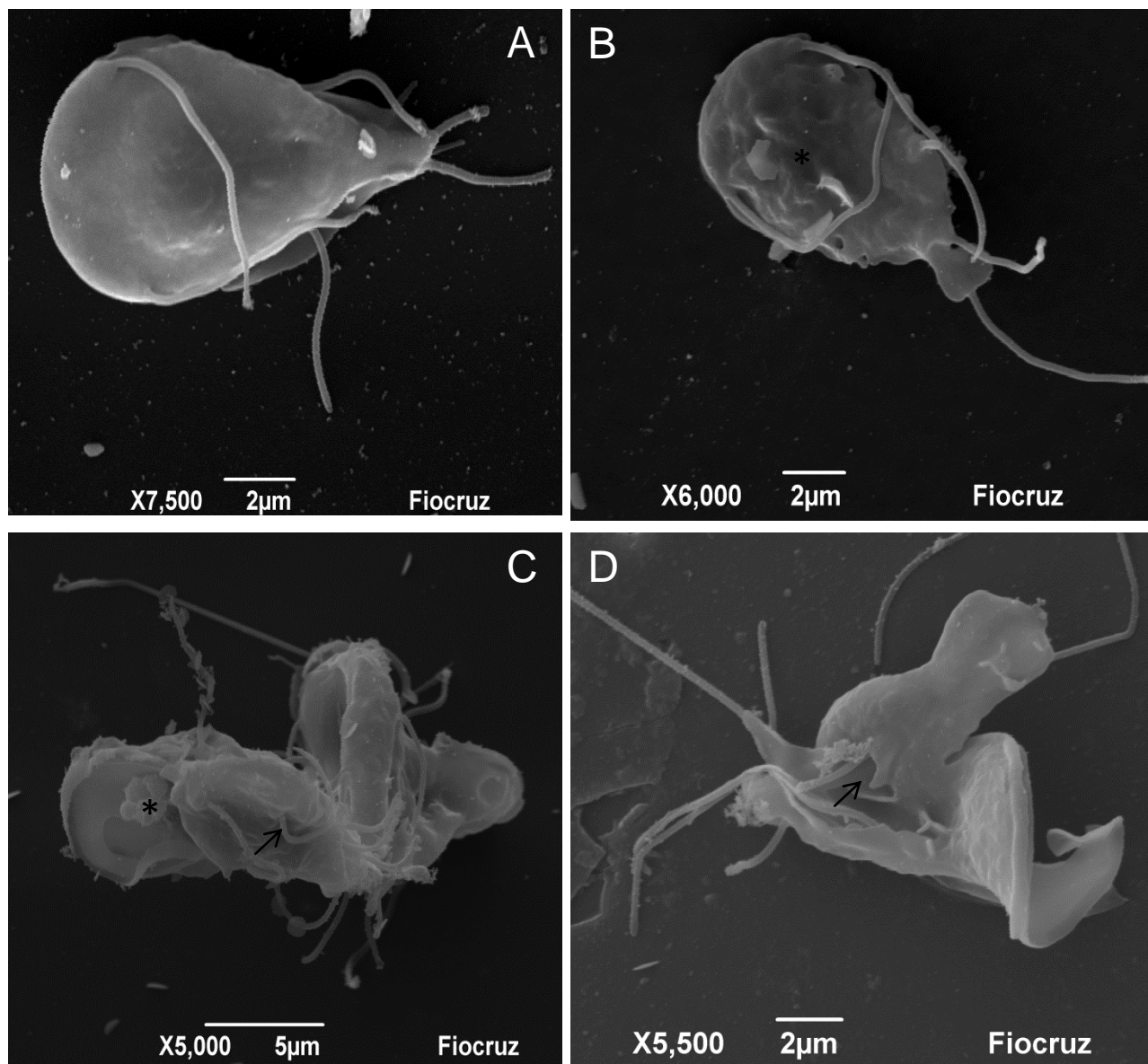


Figura 14: Alterações morfológicas em trofozoítos de *G. lamblia*, após 48 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C) e 4 mM (D) de CHA. A: a célula apresenta estrutura morfológica normal; B: a membrana apresentou irregularidades dorsais (\*); C: formação de blebs (\*), flagelos circundando o corpo celular de forma anormal (seta); D: rompido de membrana (seta) e alteração no formato da célula.

## 4.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Com a finalidade de compreender os efeitos associados à ação da CHA em trofozoítos de *G. lamblia* foi realizada a avaliação ultraestrutural. As células foram pré-incubadas por 12, 24 e 48 horas em presença de CHA, nas concentrações de 1, 2, 4 mM, apresentando como controle as células tratadas com 0,05% DMSO, sendo fixadas e processadas em seguida, de acordo com a metodologia descrita.

No período de 12 horas as células controle apresentavam-se integras, com grande quantidade de glicogênio e retículo endoplasmático distribuídos pelo citoplasma, disco adesivo, além da presença de vesículas periféricas subjacentes à membrana plasmática e estruturas do citoesqueleto, como os axonemas dos flagelos (Figura 15A). Em parasitos tratados com 1mM CHA, não foi possível observar alterações significativas de estrutura uma vez que estes apresentavam as estruturas como vesículas periféricas, membrana nuclear, axonemas aparentemente íntegros (Figura 15B). Na concentração de 2mM de CHA mais de 50% das células apresentavam estruturas reticulares que assemelham-se a formação de fendas ou “clefts” (Figura 15C), outras células apresentaram a formação de estruturas vesiculares circunscritas por figuras de mielina, sendo sugestivo de processos autofágicos (Figura 15D). Em 4mM de CHA os trofozoítos apresentaram a arquitetura celular diferente do controle, com vesículas periféricas aumentadas, além de internalização do disco adesivo, que está disperso no citoplasma e presença de clefts (Figura 15E), que são indicativos de encistamento.

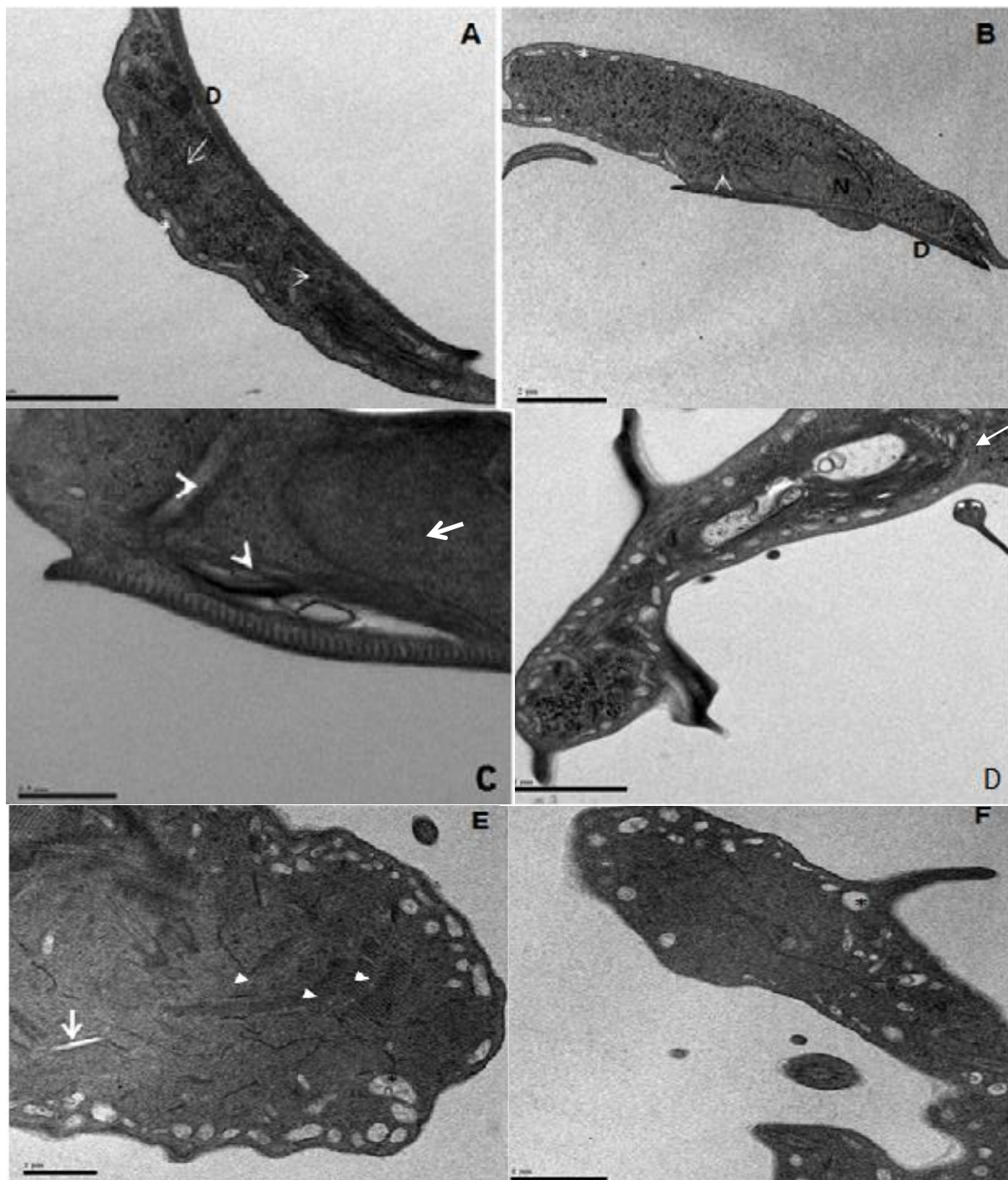


Figura 15: Alterações ultraestruturais em trofozoítos de *G. lamblia*, após 12 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C e D) e 4 mM (E e F) de CHA. Em A e B: células apresentaram disco adesivo (D), núcleo (N), vesículas periféricas (\*), retículo endoplasmático (seta) e axonemas (ponta de seta) íntegros; C: estruturas reticulares, clefts (pontas de seta); D: figuras de mielina (seta); E: aumento do tamanho da vesícula periférica (\*), disco adesivo interno (seta), presença de clefts (seta); F: aumento do tamanho da vesícula periférica. Barras de aumento representam 1  $\mu$ m, exceto em B com 2  $\mu$ m.

Após 24 horas os trofozoítos tratados com 1mM de CHA apresentam as vesículas próximas à membrana, material citoplasmático e o núcleo íntegros, enquanto que as proteínas de citoesqueleto que constituem o disco adesivo apresenta-se em múltiplas camadas sobrepostas (Figura 16B), possivelmente sendo internalizadas. Na concentração de 2mM de CHA os parasitas apresentavam a arquitetura celular e suas estruturas internas dispostas de forma irregular, diferente do controle, como os axonemas flagelares que estavam em posição que não habitual, um aumento no tamanho da vesícula periférica (Figura 16C). Em 4mM de CHA o trofozoíto a cromatina apresenta-se de forma condensada próximo do envoltório nuclear, sem evidencia de picnose, o citoplasma eletrofluente/extraído, arquitetura celular desorganizada (Figura 16D), sendo indicativos de necrose.

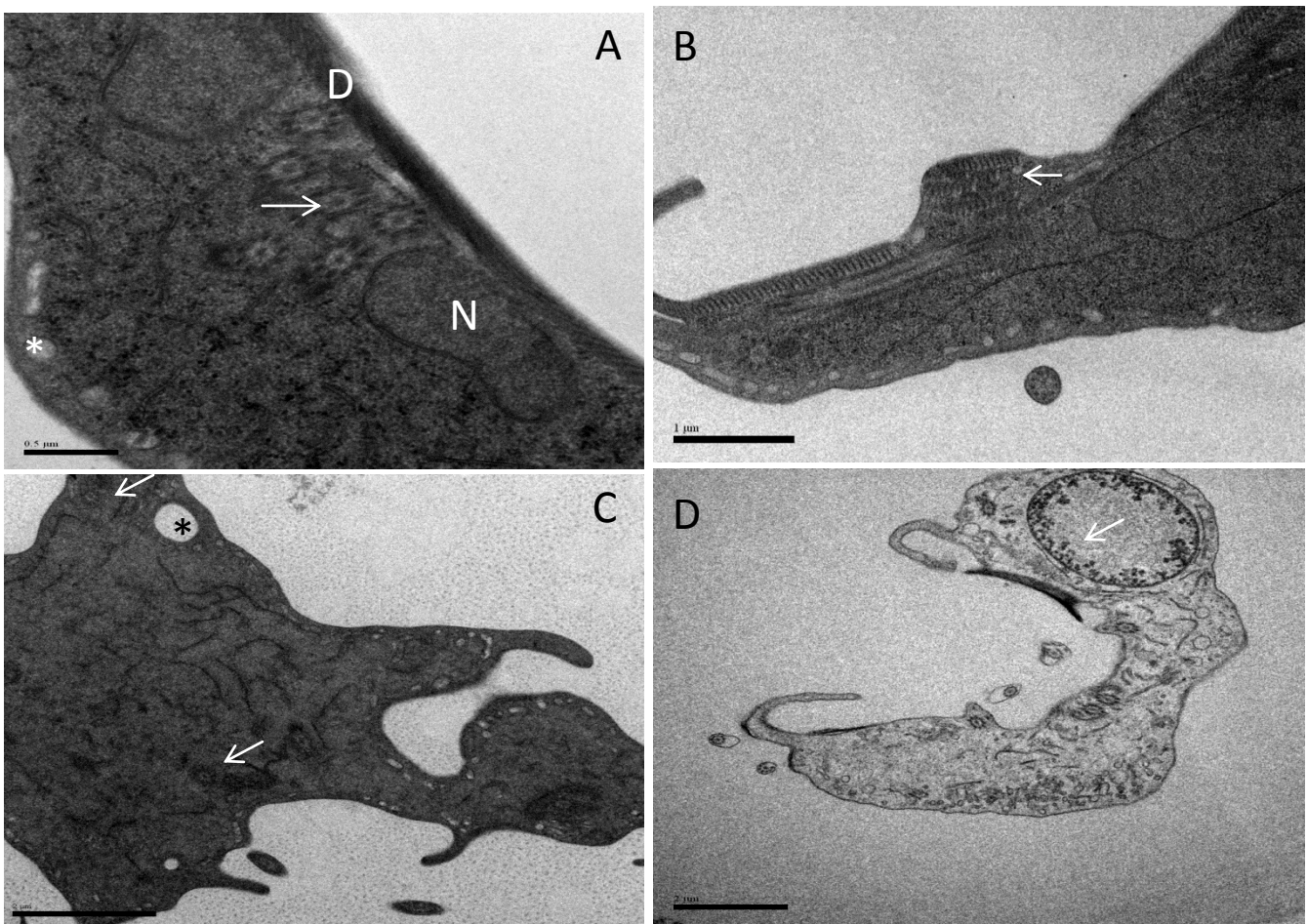


Figura 16: Alterações ultraestruturais em trofozoítos de *G. lamblia*, após 24 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C) e 4 mM (D) de CHA. A: células apresentaram disco adesivo (D), núcleo (N), vesículas periféricas (\*), e axonemas (seta) íntegros; B: o disco adesivo apresenta-se em multiplas camadas (seta); C: axonemas

ectópicos (seta), vesícula aumentada e dispersão do material citoplasmático ; D: condensação da cromatina próximo ao envoltório nuclear (seta), desorganização material citoplasmático. Barras de aumento representam A: 0,5  $\mu\text{m}$ ; B e C: 1  $\mu\text{m}$ ; D: 2  $\mu\text{m}$ .

Em 48 horas foi possível observar um aumento significativo de alterações de estruturas reticulares, formações de clefts, aumento no tamanho das vesículas, internalização do disco adesivo nas concentrações de 1 e 2 mM (Figura 17 B, C), contudo, na concentração de 1 mM estruturas de citoplasmáticas apresentavam-se de forma organizada, como por exemplo, axonema (Figura 18B). Enquanto que, na concentração de 4 mM de CHA pudemos verificar uma intensa vacuolização das células, uma vez que seus compartimentos citoplasmáticos eletrolucentes foram extraídos (Figura 17D), sugerindo que o processo necrótico inviabilizou o parasito.

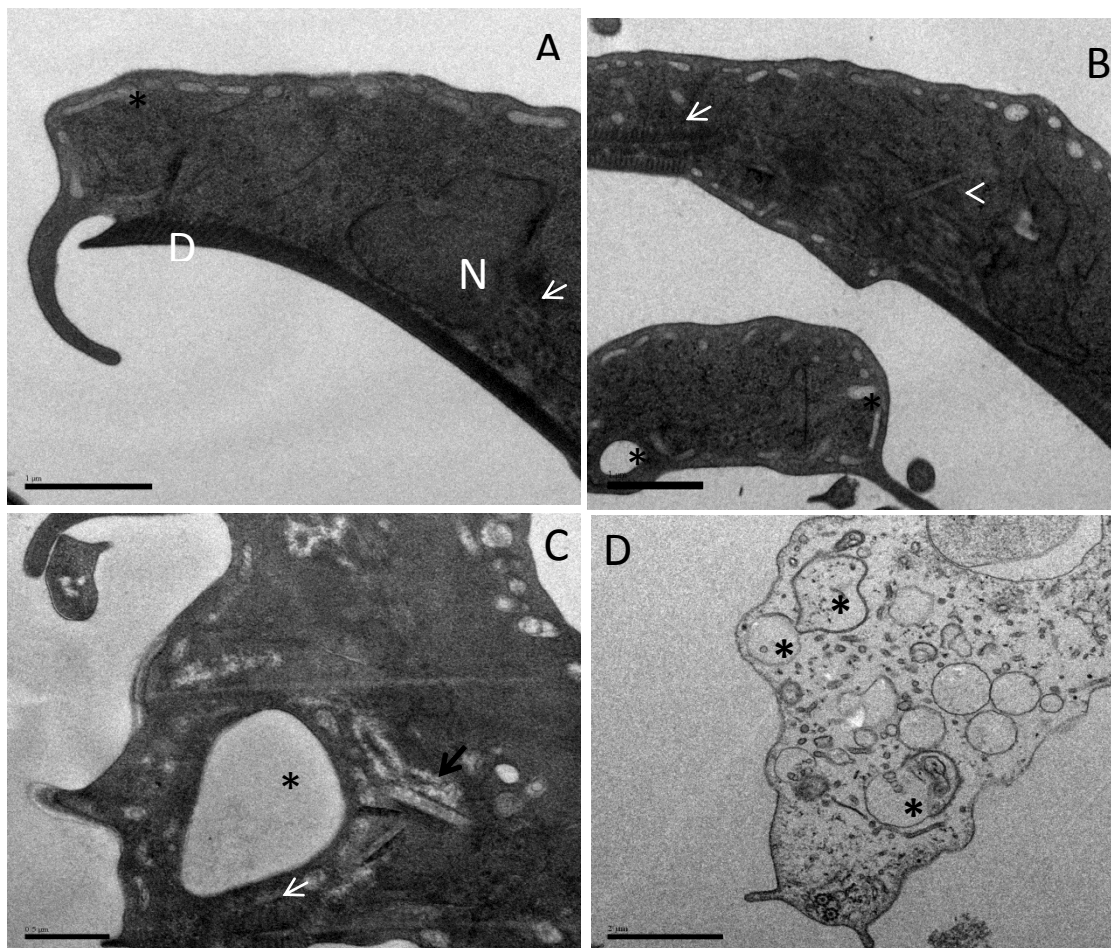


Figura 18: Alterações ultraestruturais em trofozoítos de *G. lamblia*, após 24 horas de tratamento *in vitro* com DMSO a 0,05 % (A), 1 mM (B), 2 mM (C) e 4 mM (D) de CHA. A: células apresentaram disco adesivo (D), núcleo (N), vesículas periféricas (\*), e axonemas (seta) íntegros; B: invaginação do disco adesivo (seta), presença de estruturas reticulares, cleft (ponta de seta), vesículas aumentadas (\*); C: invaginação do disco adesivo (seta branca), presença de estruturas reticulares, cleft (seta preta), vesículas aumentadas (\*); D: dispersão do material citoplasmático ; D: condensação da cromatina ao redor da membrana nuclear (seta),

desorganização material citoplasmático. Barras de aumento representam em A e B: 1  $\mu\text{m}$ , C: 0,5  $\mu\text{m}$  e D: 2  $\mu\text{m}$ .

## 5 DISCUSSÃO

A *G. lamblia* é um protozoário anaeróbico e necessita de mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo dentro do lúmen intestinal, que possui uma concentração de 60mM de oxigênio, para que seja estabelecida a patogênese. Diferente de células eucarióticas que utilizam mecanismos convencionais como óxido nítrico sintase (NOS) para converter a L-arginina livre em citrulina e óxido nítrico (NO), superóxido dismutase, catalase, peroxidase e glutatona (VOSSENAAR *et al.*, 2003), os procariotos assim como a Giardia utilizam como mecanismo a via desidrolase arginina, em que a arginina é rapidamente convertida em citrulina, em seguida ornitina que é liberado pelo sistema antiporte arginina-ornitina (TOUZ *et al.*, 2008).

As poliaminas conferem um papel protetor nas condições de estresse (RIDER *et al.*, 2007), mas o seu baixo nível pode resultar em inibição da proliferação e diferenciação celular, assim como a morte celular por apoptose ou necrose (CRISS, 2003). A putrescina, espermidina e espermina são exemplos de poliaminas que são descritas como polications orgânicos essenciais que estão envolvidos na multiplicação e diferenciação celular (REGUERA *et al.*, 2005).

A síntese de poliaminas inicia-se precocemente nas fases G1e G2 do ciclo celular regulando a divisão celular, por apresentarem-se como moléculas importantes nos pontos de checagem. A ação das poliaminas está relacionada à degradação de ciclinas, gerando assim uma interrupção nas etapas G1 e G2 (THOMAS e THOMAS, 2001; IACOMINO *et al.*, 2012).

Alguns estudos mostraram que células tratadas com análogos de poliaminas causaram uma diminuição nos níveis de putrescina, espermidina e espermina devido à redução dos níveis de ciclina na fase G1 (THOMAS *et al.*, 1997), podendo ser demonstrado através do tratamento com o análogo DAB (1,4-diamino-2-butanona) em trofozoítos de *G. lamblia* (MAIA *et al.*, 2008) que



apresentou sua citocinese interrompida, além do processo de encistamento e da inibição da proliferação de *Trichostrongylus axei* (REIS *et al.*, 1999).

A redução da proliferação celular na presença de CHA também foi observada corroborando dados apresentados na literatura (gráfico 8). Outro evento celular importante foi a formação do processo de encistamento reveladas pelas microscopias de varredura e transmissão, que apontam para uma possível mudança no ambiente que induz o trofozoíto alterar sua forma evolutiva para uma estrutura de baixo metabolismo e alta resistência. Nessas estruturas puderam ser visualizadas internalização do disco adesivo, vesículas de encistamento e ocorrência de cistos pré-formados. Dentre os possíveis fatores de indução de encistamento descritos podem ser citados: concentração de bile e variação de pH (induzidas por moléculas alcalinas) (GILLIN *et al.*, 1987; LANFREDI *et al.*, 2003).

As poliaminas e seus análogos, entretanto, também aparecem como possíveis moléculas giardicida sendo seu efeito tóxico, para este parasito, descrito para diversos compostos, tal como a DAB (MAIA *et al.*, 2008). Dentre os principais efeitos celulares podem ser citados o 'stress' oxidativo, autofagia e indução de morte celular, por exemplo (SCHIPPER *et al.*, 2000; CRISS, 2003). O primeiro destes pode ser gerado através de diferentes vias metabólicas e possuem como principais agentes as espécies reativas de oxigênio (ROS), que apresentam, por exemplo, o íon superóxido e peróxido de hidrogênio como representantes, e as espécies reativas de óxido de nitrogênio (RNOS), tal como o óxido nítrico (WANG *et al.*, 2006). Estes agentes são responsáveis por causar alterações celulares como alterações membranares, como os 'blebs' e alterações nos discos adesivos da giardia, aumento no número de vesículas como descrito anteriormente.

Outras alterações como as mudanças no perfil de esteróis podem ser relacionadas à processos intracelulares que também podem culminar em alterações metabólicas de estresse para o parasito e, portanto, induzir a formação de cistos. Esta tentativa celular, entretanto, pode ser uma medida ineficaz para alguns tipos de tratamento como o descrito para alguns tipos de análogos de poliaminas, como a DAB, que induziu a formação de cistos assim

como o descrito neste trabalho. Vale ressaltar que o DAB pode deflagrar a formação de pseudo-cistos de *Trichomonas vaginalis* (BENCHIMOL *et al.*, 2005).

O catabolismo de poliaminas pode induzir a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através da ação enzimática, onde acetilpoliaminas, acetilespermina e acetilespermidina, produzidas pelas SSAT (Espermidina - espermina-1-N-acetiltransferase) são metabolizadas pela PAO (Poliamina oxidase) e, conseqüentemente, liberando aldeídos e esta molécula oxidante (WALLACE *et al.*, 2003). Além disso, vale ressaltar que durante o catabolismo das poliaminas, principalmente, da espermidina podem estar relacionados à morte celular. Em alguns organismos eucarióticos esta morte é caracterizada pelo aumento de ODC e associada à apoptose (EREZ *et al.*, 2002). Outro fator que pode ser relacionado à apoptose é a interação das poliaminas aos canais de íons membranares, os quais podem ser desestabilizados por estes compostos graças à sua ligação aos grupamentos tiol destes canais. Os canais de K<sup>+</sup> e Ca<sup>+</sup> são exemplos de canais que podem sofrer alterações devidas à interação com as poliaminas e/ou seus análogos (WANG *et al.*, 2006). Este evento pode desencadear uma redução da polarização membranar e, conseqüentemente, reduzir sua seletividade ou mesmo gerar um processo de morte celular devido à alteração do fluxo de cálcio celular e induzindo uma morte programada (WANG *et al.*, 2006).

A peroxidação lipídica, um evento descrito para análogos de poliamina, forma uma via de mão-dupla, portanto o mesmo pode ser induzido ou bloqueado. Por isso os efeitos celulares podem ser distintos. É sabido que a putrecina pode estar ligada ao aumento deste processo, por isso, sua redução seria caracterizada pela redução do mesmo. Neste sentido o TBARS realizado evidencia esta dualidade onde diferentes concentrações podem gerar resultados antagônicos, neste caso o efeito lipo-oxidativo somente ocorreria nas concentrações mais elevadas do composto (neste caso a concentração de 4mM de CHA). Na concentração de 1 mM a CHA poderia atuar na redução das concentrações de espermidina e, como relatado anteriormente, desencadear uma morte celular programada.

A autofagia, por sua vez, é um mecanismo celular que tenta reestabelecer a homeostase, por meio de uma reciclagem de compostos e estruturas intracelulares. Caracterizada pela presença de vesículas circunscritas a autofagia pode, também, ser relacionada a processos de morte celular programada ou não (MIGUET-ALFONSI *et al.*, 2002).

Ao avaliar a ação da CHA pode-se observar que a homeostase celular foi desequilibrada e na tentativa de manterem-se viáveis os trofozoítos passaram utilizar além da tentativa de encistamento, como supracitado, a via autofágica foi evidenciada provavelmente como tentativa de escape de processos letais para as células. Apesar da ausência de microscopia de fluorescência com MDC, sonda utilizada evidenciar autofagia, foi possível observar este evento a partir da formação de vesículas alteradas e figuras de mielina, que por sua vez, podem ser caracterizadas pela formação de estruturas vesiculares circunscritas evidenciadas na microscopia de transmissão (MIGUET-ALFONSI *et al.*, 2002). Além da presença de vesículas e figuras de mielina como resposta ao estresse foi observado em microscopia de transmissão alterações estruturais no retículo endoplasmático que também pode ser um indicativo de autofagia (YORIMISTSU *et al.*, 2006), esta organela é responsável regulação de síntese e enovelamento de proteínas, tráfego de cálcio, e caso apresente um acúmulo de proteínas deformadas ou desdobradas poderá ocasionar um estresse oxidativo na célula e conseqüentemente morte celular (KIM *et al.*, 2009).

A extensão da autofagia, bem como, a concentração das proteínas mediadoras deste processo podem predizer a sobrevivência e a morte celular. Portanto, mesmo podendo ajudar na manutenção da célula os processos autofágicos podem induzir morte celular seja por necrose ou apoptose. O tipo de morte celular neste caso será dependente de um conjunto de eventos celulares que irá caracterizar as duas vias, contudo mais ensaios como a citometria de fluxo, utilizando PI e anexina-V, devem ser utilizados para a determinação do tipo de morte celular.

Por apresentar efeitos interessantes, testes de citotoxicidade em esplenócitos murinos foram realizados, contudo a CHA apresentou baixa seletividade celular, apresentando, portanto efeitos tóxicos para células animais. Esta baixa

seletividade pode estar relacionada à estruturas e/ou vias enzimáticas conservadas evolutivamente, entretanto mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar a semelhança e diferenças de tais vias metabólicas. Todavia, existe a descrição de combinações entre análogos de poliaminas e como os nitroimidazóis. Estas combinações, em geral, apresentam efeitos sinérgicos que culminam na redução da concentração de ambos os compostos. As baixas concentrações, conseqüentemente, tendem a apresentar efeitos tóxicos menores ou ausência dos mesmos. Este dado corrobora os dados de ensaios piloto realizados, combinando o metronidazol e a CHA.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação indicaram que a CHA apresenta uma atividade que antiparasitária sobre os trofozoítos de *Giardia lamblia*, uma vez pode interferir na via de poliaminas da célula.

Através dos resultados obtidos foi possível evidenciar alguns mecanismos de ação desta substância que reduziu a proliferação celular, que além de induzir a morte celular, como forma de defesa induziu o trofozoíto ao encistamento. Contudo, algumas vias bioquímicas, alvos celulares ainda são desconhecidos necessitando de mais estudos.

Ao realizar um teste piloto da combinação da droga com o metronidazol, apresentaram-se promissores uma vez que em ambos, as concentrações foram reduzidas, podendo estes reduzir a citotoxicidade em células animais, assim indicando um possível alvo terapêutico (dados não mostrados).

## 7 REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. C. *et al.* Parasitoses intestinais: Uma revisão sobre seus aspectos sociais, epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. **Rev. APS.**, v. 13, n. 2, p. 231-240, 2010.

BACCHI, C. J. *et al.* Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. **Science**, v. 210, p. 332-334, 1980.

BACHRACH, U. Naturally occurring polyamines: interaction with macromolecules. **Curr. Protein Pept Sci**, v. 6, p. 559-566, 2005.

BIENZ, M.; WITTEWER, P.; ZIMMERMANN, V.; MULLER, N. Molecular characterisation of a predominant antigenic region of *Giardia lamblia* variant surface protein H7. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 8, p. 827-832, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. **Portaria MS nº 518/2004**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005.

BRUN, R. *et al.* *In vitro* trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors. **Antim. Ag. Chem.**, v. 40, p. 1442-1447, 1996.

BURET, A. G. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. **Parasite J.**, v. 15, n. 3, p. 261-265, 2008.

CAETANO, J.; NEVES, M.; CARDOSO, F. Giardiasis as a common cause of iron-deficiency. **Rev. Clin. Hosp. Prof. Fernando Fonseca**, v. 1, n. 1, p. 45-48, 2013.

CARRILLO, C. ; S.; GONZÁLEZ, N. S.; ALGRANATI, I. D. **FEBS Letters**, v. 454, p. 192-196, 1999.

CARVALHO, T. B.; CARVALHO, L. R.; MASCARINI, L. M. Occurrence of enteroparasites in day care centers in Botucatu (São Paulo state, Brazil) with emphasis on *Cryptosporidium* sp., *Giardia duodenalis* and *Enterobius vermicularis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 48, n. 5, p. 269-273, 2006.

CARVALHO, T. T. R. Estado atual do conhecimento de *Cryptosporidium* e *Giardia*. **Rev. Patol. Trop.** v. 38, n. 1, p. 1-16, 2009.

CASERO, R.A.; MARTON, L.J. Targeting polyamine metabolismo and function in cancer and other hyperproliferative diseases. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 373-390, 2007.

CRISS, W.E. A review of Polyamines and Cancer. **Turk. J. Med. Sci.**, v. 33, p. 195-205, 2003.

DE CARLI, G.A.; TASCA, T.; MACHADO, A. R. L. Parasitoses Intestinais. In: DUNCAN, B.B.; SCHMIDT, M.I.; GIUGLIANI, E.R.J. **Medicina ambulatorial: Conduas de atenção primária baseadas em evidências**. Porto Alegre: Editora Artmed. 2004.

DUNN, L. A. *et al.* A new-generation 5-nitroimidazole can induce highly metronidazole-resistant *Giardia lamblia* in vitro. **Int. J. Ant. Ag.**, v. 36, p. 37–42, 2010.

EREZ, O. *et al.* Putrescine activates oxidative stress dependent apoptotic death in ornithine decarboxylase overproducing mouse myeloma cells. **Exp. Cell. Res.**, v. 281, p. 148- 156, 2002.

FREI, F.; JUNCANSEN, C.; RIBEIRO-PAES , J. T. Epidemiological survey of intestinal parasite infections: analytical bias due to prophylactic treatment. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 12, p. 2919-2925, 2008.

GALLEGO, V. *et al.* The 2014 FIFA World Cup: Communicable disease risks and advice for visitors to Brazil: A review from the Latin American Society for Travel Medicine (SLAMVI) **Trav. Med. Infec. Dis.**, xx, 1-11, 2014.

GARCIA, L. E.; GALVAN, S. C.; JIMENEZ, C. E. Phylogenetic distance between *Giardia intestinalis* isolates from symptomatic and asymptomatic children. **Rev. Invest. Clín.**, Mexico. v. 54, n. 2, p. 113-118, 2002.

GERNER, E.W.; MEYSKENS, F.L.J.R. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. **Nat. Rev. Canc.**, v. 4, v. 781–792, 2004.

GIORDANI, R. B. *et al.* Anti-protozoal activity of diamine derivatives. **Biomed. & Pharmacoth.**, v. 65, p. 60–62, 2011.

GÓMEZ, E. *et al.* Enfermedad diarréica aguda por *Giardia lamblia*. **An. Fac. Med.**, San Marcos, v. 63, n. 1, 25-31, 2002.

GUIMARÃES, S.; SOGAYAR, M. I.; FRANCO, M. F. Protease activity in *Giardia duodenalis* trophozoites of axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 77-81, 2003.

HALLIEZ, M.C.M.; BURET, A.G. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. **World. J. Gast.**, v. 19, n. 47, p. 8974-8985, 2013.

HARADA, J.; SUGIMOTO, M. Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. **Brain Res.**, v. 753, p. 251-259, 1997.

HEBY, O.; ROBERTS, S.C.; ULLMAN, B. Polyamine biosynthetic enzymes as drug targets in parasitic protozoa. **Bio. Soc. Trans.**, v. 31, n. 2, p. 415-419, 2003.

HUNTER, P.R.; THOMPSON, R.C.A. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. **Int. J. Paras.**, v. 35, n. 11, p. 1181-1190, 2005.

IACOMINO, G.; PICARIELLO, G.; D'AGOSTINO, L. DNA and nuclear aggregates of polyamines. **Bioch. Biop. Act.**, v. 1823, p. 1745-1755, 2012.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Modulation of cellular function by polyamines. **Int. J. Bioch. Cell. Biol.**, v. 42, p. 39-51, 2010.

IGARASHI, K.; KASHIWAGI, K. Polyamine transport in bacteria and yeast. **Bioch. J.**, v. 344, p. 633-642, 1999.

IGNATIUS, R. *et al.* High prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B infection and association with underweight in Rwandan children. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 6, p. e1677, 2012.

KUZANO, T. *et al.* Polyamines: essential factors for growth and survival. **Planta**, v. 228, p. 367-381, 2008.

LAITINEN, J. *et al.* Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle, **J. Cell. Bio.**, v. 68, p. 200-212, 1998.

LANFREDI-RANGEL, A. *et al.* The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J. Struct. Biol.**, v. 123, p. 225-235, 1998.

LANFREDI-RANGEL, A.; DINIZ, J.A. JR.; DE SOUZA, W. Presence of a protrusion on the ventral disk of adhered trophozoites of *Giardia lamblia*. **Parasitol. Res.**, v. 85, p. 951-955, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A. *et al.* Trophozoites of *Giardia lamblia* may have a Golgi-like structure. **FEMS Microb. Letters**, v. 15, p. 245-251, 1999.

LANFREDI-RANGEL, A. *et al.*; TTIAS, M.; REINER, D.S.; GILLIN, F.D., DE SOUZA, W. Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. **J. Struct. Biol.**, v. 143, p. 153-163, 2003.

LUJÁN, H.D. *et al.* Cholesterol starvation induces differentiation of the intestinal parasite *Giardia lamblia*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 23, p. 7628-7633, 1996.



MAMUS, C.N.C. *et al.* Enteroparasitoses em um centro de educação infantil do município de Iretama/Pr. **Rev. Saúde Biol.**, v. 3, n. 2, p. 39-44, 2008.

MANDELL, G. L., BENNETT, J. E., DOLIN R. M. **Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010.

MATOS, S.M.A. *et al.* Giardia duodenalis infection and anthropometric status in preschoolers in Salvador, Bahia State, Brazil. **Cad. Saúde Públ.**, v. 24, n. 7, p. 1527-1535, 2008.

MEYERS, J. D.; KUHARIC, H. A.; HOLMES, K. K. *Giardia lamblia* infection in homosexual men. **Br. J. Vener.**, v. 53, p. 54-55, 1977.

MIGUET-ALFONSI, C., *et al.* Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 $\beta$ -hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. **Bioch. Pharm.**, 2002.

MOHAMEDA, A.S. *et al.* Temporal patterns of human and canine Giardia infection in the United States: 2003–2009. **Prev. Vet. Med.**, v. 113, p. 249–256, 2014.

MONIS, P.T.; THOMPSON, R.C. Cryptosporidium and Giardia-zoonoses: fact or fiction? **Infect. Genect. Evol.**, v. 3, n. 4, p. 233-244, 2003.

MULLER, S., COOMBS, G.H., WALTER, R.D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 242-249, 2001.

NEVES, D. P. *et al.* **Parasitologia Humana**. 11. ed. Ed. Atheneu. 2001.

NIEHAUS, M.D. *et al.* Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a northeast Brazilian shantytown. **Am. J. Trop. Med .Hyg.**, v. 66, p. 590-593, 2002.

NISHIMURA, K. *et al.* Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. **Genes Cells**, v. 7, p. 41–47, 2002.

NYINDODO-OGARI, L.; SCHWARTZBACH, S.D.; ESTRANO, C.E. Giardia mitosomal protein import machinery differentially recognizes mitochondrial targeting signals. **Infect. Disord. Drug Targ.**, v. 14, n. 1, p. 23-29, 2014.

PARK, M.H.; IGARASHI, K. Polyamine Metabolites as Markers of Cancer and Stroke. **Biomol. Ther.**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2013.

PEDRAZA, D.F.; QUEIROZ, D.; SALES, M.C. Infectious diseases among Brazilian preschool children attending daycare centers. **Ciência & Saúde Col.**, v. 19, n. 2, p. 511-528, 2014.

PEGG, A. E. Mammalian polyamine metabolism and function. **IUBMB Life**, v. 61, p. 880–894.

PEGG, A. E. Regulation of ornithinedecarboxylase. **J. Biol. Chem.**, v. 281: p. 14529–14532, 2006.

PEGG, A.E.; SECRIST, J.A.; MADHUBALA, R. Properties of L1210 cells resistant to alpha-difluoromethylornithine. **Cancer Res.**, v. 48, n. 10, p. 2678-2682, 1988.

PITTNER, E., *et al.*, Enteroparasitoses em crianças de uma comunidade escolar na cidade de Guarapuava, PR. **Rev. Sallus.**, v. 1, n. 1, p. 97-100, 2007.

RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Paras. Res.**, v. 90, p. 19-39, 2003.

RAJURKAR, N.M. *et al.* A Simple Method for Demonstrating the Giardia Lamblia Trophozoite. **J. Clin. Diag. Res.**, v. 6, n. 9, p. 1492-1494, 2012.

RAKESH, M.; RAJTILAK, M.; SUBHASHC, M. Polyamines and abiotic stress in plants: a complex relationship. **Front. Plant Sci.**, v. 5, p. 175, 2014.

REGUERA, R.M.; TEKWANI, B.L.; BALAÑA-FOUCE, R. Polyamine transport in parasites: A potential target for new antiparasitic drug development. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, p. 151-164, 2005.

REY, Luís. **Parasitologia**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.403. 2001.

RIDER, J.E. *et al.* Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Amino Acids**, v. 33, p. 231–240, 2007.

SADJJADI, S.M.; ALBORZI, A.W.; MOSTOVF, I. H. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. **J. Trop. Pediatr.**, v. 47, p.176–178, 2001.

SAMUELSON, J. *et al.* Strategies to discover the structural components of cyst and oocyst walls. **Eukaryotic Cell.**, v. 12, p. 1578-1587, 2013.

SANAD, M.M. *et al.* Giardia lamblia and chronic gastritis. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 26, n. 2, p. 481-495, 1996.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. A Giardia and Cryptosporidium join the Neglected Diseases Initiative. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 5, p. 203-208, 2006.

SILVA, R.R. *et al.* Association between nutritional status, environmental and socio-economic factors and Giardia lamblia infections among children aged 6-

71 months in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103, n. 5, p. 512-519, 2009.

SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, p. 7–15, 2011.

SCHIPPER, R.G.; PENNING, L.C.; VERHOFSTAD, A.A. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? **Semin. Cancer Biol.**, v. 10, p. 55-68, 2000.

SMITH, A. *et al.* Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Epidemiol. Infect.**, v. 134, p.1141–1149, 2006.

SMITH, H.V. *et al.* Tools fo investigating the environmental transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* in humans. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 4, p. 160-167, 2006.

STEVENS, W. J.; VERMEIRE, P. A. *Giardia lamblia* in bronchoalveolar lavage fluid. **Thorax.**, v. 36, p. 875, 1981.

TABOR, C.W.; TABOR, H. Polyamines in microorganisms. **Microbiol. Rev.**, v. 49, p. 81–99, 1985.

TACHEZY, J.; SÁNCHEZ, L.B.; MÜLLER, M. Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, p. 919-928, 2001.

TEJMAN-YARDEN, N. *et al.* Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. **Antim. Ag. Chem.**, v. 55, p. 4643–4651, 2011.

THOMAS, T.; THOMAS, T.J. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, p. 244-258, 2001.

THOMPSON, R. C. A.; HOPKINS, R.M.; HOMAN, W.L. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. **Parasitol. Today**, v.16, n. 5, p. 210-213, 2000.

THOMPSON, R.C.; MONIS,P.T. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. **Adv. Parasitol.**, v. 58, p. 69-137, 2004.

TOUZ, M.C., *et al.* Arginine deiminase plays multiple regulatory roles in the biology of *giardia lamblia* **J. Cell. Sci.**. v. 121, p. Pt 17, p. 2930–2938, 2008

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. **Alternative disinfectants and oxidants guidance manual.** New York, USA, 1999.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. **National Primary Drinking water Regulations**. Surface Water Treatment Rule. 141.70-141. v. 80, p. 136-138, 1989.

VEENEMANS, J. *et al.* Protection against diarrhea associated with *Giardia intestinalis* is lost with multi-nutrient supplementation: a study in Tanzanian children. **PLoS Negl.Trop. Dis.**, 5, e1158, 2001.

VOSSENAAR, E.R.; ZENDMAN, A.J.; VAN VENROOIJ, W.J.; PRUIJN, G.J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. **Bioessays**, v. 25, p. 1106–1118, 2003.

WALLACE, H.M.; CASLAKE, R. Polyamines and colon cancer. **Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 13, p. 1033-1039, 2001.

WALLACE, H.M.; FRASER, A.V.; HUGHES, A. A perspective of polyamine metabolism. **Biochem. J.**, v. 376, p. 1–14, 2003.

WANG, J.Y.; ROBERT, A.; CASERO, J. R. **Polyamine Cell signaling Physiology, Pharmacology, and Cancer Research**. Humana press, 2006.

WARTERS, R.L. *et al.* Radioprotection of human cell nuclear DNA by polyamines: radiosensitivity of chromatin is influenced by tightly bound spermine. **Radiat. Res.**, v. 151, p. 354–362, 1999.

WOLFE, M.S. Giardiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 93-100, 1992.

YODER, J. S.; BEACH, M. J. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2007. Giardiasis Surveillance – United States, 2003–2005. **MMWR Surveill Summ**, v. 56, p. 11–8, 2007.

YODER, J.S.; HARRAL, C.; BEACH, M.J. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010. Giardiasis Surveillance – United States, 2006–2008. **MMWR Surveill Sum**, v. 59, p. 15–25, 2010.

# APÊNDICE 1 – Manuscrito em preparação

## CYCLOHEXYLAMINE EFFECT OF TROPHOZOITES OF *Giardia lamblia*

---

Tayane Gonçalves Fernandes<sup>1</sup>, Carlos Gustavo Regis da Silva<sup>1</sup>, Marcos André Vannier dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Advanced Laboratory of Public Health/Gonçalo Moniz Research Center - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil.

**Corresponding author:**

Dr.<sup>a</sup> Marcos André Vannier dos Santos,

LASP/CPqGM/FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brazil.

Phone: 55 71 3176 2236

Email: [vannier@bahia.fiocruz.br](mailto:vannier@bahia.fiocruz.br)

## ABSTRACT

Giardiasis is a disease caused by the flagellate protozoan *Giardia lamblia*, and its symptomatology is characterized by steatorrhea, abdominal pain and nausea. According to the CDC, an estimate number of 1.2 million cases of giardiasis happen every year, affecting especially schoolchildren. Nowadays, giardiasis treatment is based on drugs from the 5-nitroimidazole family, particularly metronidazole (Flagyl), secnidazole and tinidazole. Those drugs are indiscriminately used by the population, and it's not uncommon to find them causing clinical resistance due to inappropriate utilization and/or treatment abandon. Besides that, metronidazole can present longterm carcinogenic effect in humans. Thus, new studies with analogs and/or polyamines inhibitors can lead to the clarification of the drugs action mechanism, favouring the establishment of new, safer and more efficient therapeutic regimens. Our work tested cyclohexylamine (CHA) and metronidazole, which are synthetic products, in order to evaluate their effects on cell proliferation and on changes in redox potential, characterize polyamines metabolism modulator and describe their possible action mechanisms on *Giardia lamblia* trophozoites. We evaluated *Giardia lamblia* trophozoites cell proliferation in the presence of CHA; it was observed that the substance shows significant action, presenting dose-dependent effect. We also observed that *G. lamblia* trophozoites presented significant growth inhibition when exposed to millimolar concentrations of CHA - its IC50 in 72 hours was 1,646mM. When assessed the lipoperoxides production in trophozoites, we observed a possible role of CHA as an oxidative stress promoter in the parasite. Under Scanning Electron Microscopy, trophozoites showed completely irregular morphologies in different CHA concentrations, with internalization of the adhesive disc; this results are corroborated by the Transmission Electron Microscopy results, which showed the process of encystment followed by cell necrosis. This makes CHA a possible candidate for therapeutic use against giardiasis.

Keywords: *G. lamblia*, cyclohexylamine and polyamine.

## Introduction

Parasitic diseases are worldwide problems that have a deep impact on public health, especially in developing countries. The protozoan *Giardia lamblia* (*syn. G. intestinalis, G. duodenalis*) is the major cause of parasitic waterborne diarrheal outbreaks with about 400 million clinical annual cases worldwide reported by WHO. According to the Center for Disease Control and Prevention (CDC) have been reported annually about 20,000 cases of giardiasis in humans, in the period 2002-2009 (1), in addition, the CDC estimates that the number of cases per year may be close to 1.2 million due to underreporting and lack of diagnosis (2). This is a worldwide distribution of disease considered neglected by WHO and presenting a framework morbidity associated with malabsorption syndrome, diarrhea, vomiting and cognitive deficit, affecting mainly children (3). The of this disease has been carried out since 1955 with drugs of the nitroimidazoles class due to high efficacy in anaerobic protozoa, as well as having good oral absorption, hepatic metabolism and tissue distribution (4).

There are a variety of drugs being used to treat giardiasis, but remains the drug of choice metronidazole. However, most of these drugs shows significant side effects, contra-indicated in some cases and present a clinical resistance with high recurrence rates (5). Because of this, the rise every day to search for new drugs that inhibit the proliferative capacity of the parasite, and identify specific new avenues for the treatment of giardiasis (6).

New studies with similar and / or polyamine synthesis inhibitors may lead to the elucidation of the mechanisms involved and the possibility of combining those already employed in the treatment of giardiasis (eg.: metronidazole), favoring the establishment of new and safer therapeutic regimens and effective. Several drugs used against protozoan parasites use as an action mechanism of the oxidative stress induced by the pro-oxidant action or by inhibition of antioxidant defenses. Thus, a chemotherapy alternative for the control of infections by *Giardia lamblia* is the use of substances that interfere with the parasite antioxidant response.

The cyclohexylamine (CHA) is known as an antagonist of the polyamine pathway due to their inhibitory action of spermine synthase (7). In a study of trypanosomes was demonstrated inhibition of cell proliferation due the reduction of endogenous levels of spermidine to use tea (8). Therefore, this substance suggests a possible parasitocidal tool.

## **Materials and Methods**

### **Cultures and growth conditions**

The WB strain of *G. lamblia* in this study was kindly provided by Prof. Dr. Frances D. Gillin, the Pathology Department of the University of California at San Diego.

Trophozoites of *G. lamblia* strains WB axenicamente were cultured in TYI-S-33 medium supplemented with 10% (v / v) adult bovine serum (SBA), at a temperature of 37 ° C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 48 to 72 hours.

### **Animals**

Balb / C mice (4-6 weeks) were created and maintained in the animal facilities of the Research Center Gonçalo Moniz (CPqGM - FIOCRUZ). The project was approved by the Animal Ethics Committee of CPqGM - FIOCRUZ.

### **Ethical considerations**

All procedures involving manipulation of experimental animals were performed strictly according to the principles recommended by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA), Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, according to Sergio Arouca Law 11.794 of 2008 and the project was approved by the above committee with the license number 023/09.

### **Standardization and Analysis of cell proliferation**

For analysis of cell proliferation, inocula from  $2.5$  to  $5 \times 10^5$  *G. lamblia* trophozoites were incubated at 37 ° C in 24-well plates in the presence or absence of different concentrations of cyclohexylamine (CHA) (Sigma Chem. Co.) metronidazole (MTZ) (Chemistry), and dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma Chem. Co.). During the 48 or 72 hours the assessment of cell proliferation was performed by observation under an inverted microscope and measured in logarithmic phase, the colorimetric method developed by Busatti and Gomes (2007). Verifying the linear relationship between cell number and photometric detection of methylene blue. Briefly, the supernatant containing the culture medium is removed and each well is rinsed carefully twice with 1 ml of phosphate buffered saline (PBS) at 37 ° C, pH 7.2. Immediately thereafter, the plate adhering trophozoites were fixed with 1 ml of methanol for 10 minutes. After further washing was performed with 1 ml of PBS to remove excess methanol. Cells were stained with 500 uL of methylene blue 0.1% in 0.1 M borate buffer, pH 8.7 for 10 minutes. The excess dye was removed by successive washes with 1 ml of the same buffer and the



dye associated with trophozoites was extracted by adding 500  $\mu$ L of 0.1 M HCl for 10 minutes. The reading was performed using 200  $\mu$ L of 0.1 M HCl at 10 minutes after extraction of the dye by ELISA reader VERSA max, Molecular Devices at 650 nm. The rate of proliferation was calculated by the following equation:

$$\text{Proliferation\%} = (\text{Absorbance of treated} / \text{control absorbance}) \times 100$$

### **Inhibition assays**

Inocula of 1 to 2 x 10<sup>5</sup> giardia trophozoites were incubated at 37 ° C in 24-well plates in the presence or absence of different concentrations of DMSO, tea and / or metronidazole for 48 hours. The growth of the cultures was evaluated by observation under an inverted microscope and quantified by the colorimetric method of Busatti & Gomes (2007). The inhibition percentage calculation is given by the equation below. Then, the data are plotted in GraphPad Prism 5.0, by determining the IC50.

### **Lipid peroxidation**

Lipid peroxidation Trophozoites were washed twice by centrifugation at 500xg for 15 min in phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2. After centrifugation, 200  $\mu$ L of 0.1% thiobarbituric acid (TBA) were added to 200  $\mu$ L of cell suspension and incubated at 100°C for 3 h. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) produced were measured at 532 nm using TBA in PBS as standard.

### **Transmission electron microscopy**

Parasites were fixed in 4% paraformaldehyde (Polysciences), 1% glutaraldehyde (Polysciences), 4% sucrose in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, postfixed in 1% osmium tetroxide (Polysciences) and 0.08% potassium ferricyanide in the same buffer, dehydrated in acetone series, and embedded in Polybed resin (Polysciences). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed under a JEOL 1230 transmission electron microscope (TEM).

### **Scanning Electron Microscopy**

Samples were fixed and postfixed as described above, dehydrated in ethanol series, dried by the critical point method in a Balzers apparatus, mounted on stubs, and covered with a 20 nm-thick gold layer. Specimens were observed in a Jeol JSM-6390LV scanning electron microscope (SEM).

## **In vitro cytotoxicity**

To determine the toxicity of the drugs were used  $1 \times 10^7$  spleen cells obtained from Balb / c mice and incubated for 24 hours at different concentrations of drugs and tritiated thymidine (1  $\mu$ Ci / well) in RPMI 1640 medium with 5% fetal bovine serum, 0.08% gentamycin, 10 units / ml penicillin streptomycin and 0.01%. Then the samples were frozen immediately and the cells were collected by a collector (MPXRI 96TI, Bradel, Gaithersburg, MD, USA) for further quantification of beta radiation emitted by tritiated thymidine for a player (Multilabel Reader Hidex, Turku, Finland). The vitality of the cells was considered to be proportional to the incorporation of tritiated thymidine and the toxicity was determined by subtracting the group treated with 1% DMSO, the groups treated with the drugs in question where this negative control was considered as 100% of thymidine incorporation tritiated.

## **Statistical analysis**

The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation and were statistically analyzed by Student t test or ANOVA and Tukey's test with a significance level of  $p < 0.05$  the GraphPad Prism program, version 6.00 - GraphPad Software Incorporate. All experiments were performed in triplicate independent.

## **Results**

### **Parasite proliferation**

From the standardization of the colorimetric method and evaluation of the cytotoxicity of the diluent used, CHA dose-response curve was performed at different concentrations (8, 4, 2, 1 and 0.5 mM) and times (24, 48 and 72 hour ) (Figure 8). CHA significantly decreased the proliferation of trophozoites, showing a dose-dependent action at these concentrations. We determined the inhibitory concentration 50% growth ( $IC_{50}$ ) within 48 hours of the five concentrations of CHA and metronidazole (gold standard drug) (Figures 8B). In concentration of 4 mM, tea showed a greater than 80% inhibition (Figure 8C), and its  $IC_{50}$  within 48 hours approximately 1,646 mM metronidazole and about 1.54  $\mu$ M (Figure 9). The effectiveness of CHA against *Giardia lamblia* trophozoites in vitro represents a giardicidal effect on these concentrations. Drug-induced alterations in cell architecture were analyzed by SEM and TEM. Contrary to control dividing cells (Fig. 12 a, 13 a, and 14 a), trophozoites exposed to CHA presented increased flagella numbers, and sometimes four

ventral disks could be observed (Fig. 13 c and d). Abnormal ventral disk disposition was commonly observed after CHA treatment. The large number of cells undergoing incomplete asymmetric (Fig. 14 b–d) division processes indicate that the anti-giardial effect may be attributed, at least in part, to the impaired or deregulated cytokinesis.

### **Toxicity splenocytes**

In order to investigate the cytotoxic effects of CHA in splenocytes cultures, we held the mouse spleen extraction BALB / c to evaluate the incorporation of tritiated thymidine by these cells, in a 24 hour period. In splenocytes treated with CHA, we see a decrease in thymidine incorporation as we increase the concentration, indicating in a dose-dependent relationship (Figure 10). The IC50 value for this compound in splenocytes was approximately 2 mM. Although this is an unfavorable outcome, the concentration in the CHA because its cytotoxic effect on spleen cells differ from that used against trophozoites of *Giardia lamblia*.

### **Oxidative stress**

In order to determine the lipid peroxidation levels presented by *G. lamblia* trophozoites undergoing treatment with CHA, the TBARS detection technique was performed. The cells were incubated in the presence of CHA at concentrations of 1, 2 and 4 mM and / or spermidine, 0.1 M observed a partial reduction of lipoperoxide production parasites treated with CHA concentrations used, but without statistical significance. The spermidine partially reversed the effect of polyamine analogue, which may indicate the possible interference of the CHA in polyamine metabolism in *Giardia lamblia* (Figure 11). At the concentration of 1 mM was Spd reduction and inhibition of bread, while the highest concentration 4mM, the CHA can exert an antioxidant role due to accumulation of amines

### **Discussion**

The *G. lamblia* is an anaerobic protozoa and needs protection mechanisms against oxidative stress within the intestinal lumen, which has a concentration of 60 mM of oxygen, so that the pathogenesis is established. Unlike eukaryotic cells using conventional mechanisms such as nitric oxide synthase (NOS) to convert free L-arginine to citrulline and nitric oxide (NO), superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (9) prokaryotes and giardia used as the mechanism via deidrolase arginine, wherein arginine is rapidly converted to citrulline, ornithine in which is then released by the arginine-ornithine antiporter system (10).

Polyamines provide a protective role in stress conditions (11), but their low level may result in inhibition of cell proliferation and differentiation as well as cell death by apoptosis or necrosis (12). The putrescine, spermidine and spermine are examples of polyamines which are described as essential organic polycations that are involved in cell proliferation and differentiation (13).

Some studies showed that polyamine analogs with untreated cells caused a decrease in the levels of putrescine, spermidine and spermine due to the reduction in the levels of cyclin G1 phase, may be demonstrated by treatment with corresponding DAB (1,4-diamino-2-butanone) for *G. lamblia* trophozoites showed that his interrupted cytokinesis, in addition to the process of encystment and inhibition of proliferation of *Trichomonas fetus* (13).

The reduction of cell proliferation in the presence of tea was also observed confirming the data published in the literature (Figure 8). Another important cellular event was the formation of encystment process revealed by microscopy scanning and transmission, pointing to a possible change in the environment that induces the trophozoite change your flexibly to a low metabolism and high strength structure. Granddaughters structures could be visualized internalization of the adhesive disk, encystment vesicles and occurrence of pre-formed cysts. Among the possible encystment-inducing factors described can be cited: bile concentrations and varying pH (alkaline induced molecules) (14, 15).

Polyamines and their analogs, however, also possible giardicidal molecules appear as being its toxic effect, for this parasite for various compounds described as DAB. Among the main cellular effects can cite the Oxidative stress, and autophagic cell death induction, for example (12, 16). The first of these can be generated by different metabolic pathways and have as main agents reactive oxygen species (ROS), which are, for example, superoxide ion and hydrogen peroxide as representatives, and reactive nitrogen species oxide (R-Us), such as nitric oxide (7). These agents are responsible for causing changes such as cell membrane changes, such as 'blebs' and alterations stickers giardia disks, increase in the number of vesicles as described previously.

Other changes such as changes in sterols profile may be related to intracellular processes that can also lead to changes in metabolic stress on the parasite and thus induce the formation of cysts. This cell attempt, however, can be inefficient as for some types of treatment as described for some types of polyamine analogues, such as DAB, which induced the formation of cysts as well as described. It is noteworthy that the DAB can trigger the formation of pseudo-cysts of *Trichomonas vaginalis*.

Lipid peroxidation, an event described for polyamine analogs forms a two-way road, it can therefore be induced or blocked. So the cellular effects can be distinguished. It is known that putrescina may be linked to this process increase, so its reduction would be characterized by reduction. In this sense TBARS carried shows this duality which can generate different concentrations antagonistic results, in this case the fat-oxidative effect occurred only at the highest concentrations of compound (in this case CHA concentration of 4mM). At the concentration of 1mM CHA could act on reducing and spermidine concentrations, as previously reported trigger programmed cell death.

To evaluate the effect of tea can be observed that cellular homeostasis is unbalanced and attempting to remain viable trophozoites passed beyond the attempt to use encystment, as aforesaid, the autophagic route was probably as evidenced exhaust process attempts to lethal to the cells. Despite the absence of fluorescence microscopy with MDC show autophagy probe used was possible to observe the event through the formation of vesicles and altered myelin figures, in turn, may be characterized by the formation of vesicular structures circumscribed evidenced in microscopic transmission . In the presence of vesicles and myelin figures in response to stress was observed in TEM structural changes in the endoplasmic reticulum it may also be indicative of autophagy (16), this is the organelle responsible for the regulation of synthesis and folding protein, calcium traffic, and if she has an accumulation of misfolded proteins or split may cause oxidative stress in the cell and consequently cell death (17).

The extent of autophagy, as well as the concentration of mediator proteins this process may predict survival and cell death. So even helping in the maintenance of cell the autophagic processes can induce cell death either by necrosis or apoptosis. The type of cell death in this case is dependent on a number of cellular events that will characterize the two paths, yet more tests such as flow cytometry using annexin-V and PI, are to be used for determining the type of cell death.

By presenting interesting effects, cytotoxicity tests in murine splenocytes were performed, however the CHA had low cell selectivity, thus presenting toxic effects on animal cells. This low selectivity may be related to structures and / or enzymatic pathways evolutionarily conserved, but more studies are needed to elucidate the similarities and differences of these metabolic pathways.

## References

1. YODER, J.S.; HARRAL, C.; BEACH, M.J. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2010. Giardiasis Surveillance – United States, 2006–2008. **MMWR Surveill Sum**, v. 59, p. 15–25, 2010.
2. SCALLAN, E. *et al.* Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, p. 7–15, 2011.
3. SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. A *Giardia* and Cryptosporidium join the Neglected Diseases Initiative. **Trends Parasitol.**, v. 22, n. 5, p. 203–208, 2006.
4. RAETHER, W., HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Paras. Res.**, v. 90, p. 19–39, 2003.
5. SADJJADI, S.M.; ALBORZI, A.W.; MOSTOVF, I. H. Comparative clinical trial of mebendazole and metronidazole in giardiasis of children. **J. Trop. Pediatr.**, v. 47, p.176–178, 2001.
6. MULLER, S., COOMBS, G.H., WALTER, R.D. Targeting polyamines of parasitic protozoa in chemotherapy. **Trends Parasitol.**, v. 17, p. 242–249, 2001.
7. WANG, J.Y.; ROBERT, A.; CASERO, J. R. **Polyamine Cell signaling Physiology, Pharmacology, and Cancer Research**. Humana press, 2006.
8. GIORDANI, R. B. *et al.* Anti-protozoal activity of diamine derivatives. **Biomed. & Pharmacoth.**, v. 65, p. 60–62, 2011.
9. VOSSENAAR, E.R.; ZENDMAN, A.J.; VAN VENROOIJ, W.J.; PRUIJN, G.J. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. **Bioessays**, v. 25, p. 1106–1118, 2003.
10. TOUZ, M.C., *et al.* Arginine deiminase plays multiple regulatory roles in the biology of *giardia lamblia* **J. Cell. Sci.** v. 121, p. Pt 17, p. 2930–2938, 2008
11. RIDER, J.E. *et al.* Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. **Amino Acids**, v. 33, p. 231–240, 2007.
12. CRISS, W.E. A review of Polyamines and Cancer. **Turk. J. Med. Sci.**, v. 33, p. 195–205, 2003.
13. REGUERA, R.M.; TEKWANI, B.L.; BALAÑA-FOUCE, R. Polyamine transport in parasites: A potential

- target for new antiparasitic drug development. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 140, p. 151-164, 2005.
14. LANFREDI-RANGEL, A. et al.; TTIAS, M.; REINER, D.S.; GILLIN, F.D., DE SOUZA, W. Fine structure of the biogenesis of *Giardia lamblia* encystation secretory vesicles. **J. Struct. Biol.**, v. 143, p. 153–163, 2003.
  15. LANFREDI-RANGEL, A. *et al.* The peripheral vesicles of trophozoites of the primitive protozoan *Giardia lamblia* may correspond to early and late endosomes and to lysosomes. **J. Struct. Biol.**, v. 123, p. 225-235, 1998.
  16. SCHIPPER, R.G.; PENNING, L.C.; VERHOFSTAD, A.A. Involvement of polyamines in apoptosis. Facts and controversies: effectors or protectors? **Semin. Cancer Biol.**, v. 10, p. 55-68, 2000.
  17. MIGUET-ALFONSI, C., *et al.* Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potencial during 7 $\beta$ -hidroxycholesterol and 7-ketcholesterol-induced apoptosis: comparation with various pro-apoptotic chemicals. **Bioch. Pharm.**, 2002.