



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM PATOLOGIA DAS DOENÇAS TROPICAIS**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE MILTEFOSINA, ORIZALINA E
TC95 NO CRESCIMENTO DE *Entamoeba histolytica***

BETÂNIA MARA ALVARENGA

**Belém - Pará
2011.**

BETÂNIA MARA ALVARENGA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE MILTEFOSINA, ORIZALINA E TC95 NO
CRESCIMENTO DE *Entamoeba histolytica***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Medicina Tropical do Núcleo de
Medicina Tropical da Universidade
Federal do Pará para a obtenção
do título de Mestre em Patologia
das Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Dr. Evander de
Jesus Oliveira Batista

**Belém - Pará
2011.**

Alvarenga, Betânia Mara.

Avaliação *in vitro* dos efeitos de Miltefosina, Orizalina e TC95 no crescimento de *Entamoeba histolytica* / Betânia Mara Alvarenga; orientador, Evander de Jesus Oliveira Batista. – 2011

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2011.

1. Medicamentos – Microbiologia. 2. Ameba. I. Batista, Evander de Jesus Oliveira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 615.329579432

BETÂNIA MARA ALVARENGA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS DE MILTEFOSINA, ORIZALINA E TC95 NO
CRESCIMENTO DE *Entamoeba histolytica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Evander de Jesus Oliveira Batista - Orientador

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira/UFPA - Avaliador

Prof^a. Dr^a. HellenThais Fuzii/UFPA - Avaliador

Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa/UFPA - Avaliador

Aprovado em: ___ / ___ / _____

Conceito: _____

**Belém - Pará
2011.**

Dedicatória

À minha família, por sempre acreditar em mim...

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me enviar pelos caminhos que eu sempre quis percorrer e por não me deixar desistir diante de cada obstáculo.

A minha família, por me apoiar em qualquer decisão, principalmente meus pais, por me darem a vida e a opção de sempre fazer dela o melhor presente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Evander Batista, por me aceitar como aluna de mestrado, por todo aprendizado que me foi dado, não somente para essa dissertação.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. Edward Félix Silva, do Laboratório de Amebíase ICB/UFMG, por ter me aceitado em seu laboratório para a realização dos experimentos. Obrigada por me acolher e pelas opiniões. Agradeço também a Prof. Dr^a. Maria Aparecida, por também ter me aceitado no departamento e laboratório.

Ao João da Costa Viana, o Joãozinho. Obrigada por me ensinar os processos envolvidos neste maravilhoso mundo das amebas, por me apoiar quando ficava muito ansiosa, pelos puxões de orelha e pela grande amizade. A Edna Pires, que assim como o Joãozinho, foi sempre um anjo para mim, me auxiliando na hora dos cálculos, me dando conselhos e opiniões sobre o melhor a ser feito. Obrigada pelas horas de almoço e os papos divertidos que muito contribuíram para a realização do trabalho de uma forma mais leve.

Agradeço também a Prof. Dr^a. Juliany Cola Fernandes Rodrigues e ao Prof. Dr. Wanderley de Souza, do Instituto de Biofísica/UFRJ, por ceder todas as substâncias para os testes utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, do Departamento de Morfologia ICB/UFMG pelo apoio e ensinamentos.

Ao Caio e a Mônica, da UFPA, por toda ajuda na reta final deste trabalho.

Aos meus amigos de Belém: Carol, Marcela, Bruno, Érick, Rogério e Thiago que mesmo de longe me fizeram companhia, com bastante risada e me apoiaram sempre!

Aos meus amigos fora do trabalho, que mesmo em Itabira, Belo Horizonte ou Belém, estavam perto de mim, com pensamento positivo, torcendo para tudo dar certo.

RESUMO

A amebíase caracteriza-se como uma doença crônica, não inflamatória, afebril que envolve a parede do intestino grosso podendo invadir a mucosa intestinal e se disseminar para outros órgãos, principalmente o fígado. A infecção por *Entamoeba histolytica* é tratada pelo metronidazol, mas este apresenta efeitos colaterais, por isso buscam-se medicamentos mais eficazes e que não tragam nenhum efeito adverso ao paciente. Além disso, o teste de novos fármacos pode revelar importantes particularidades do parasito, tais como a descoberta de vias metabólicas ou mesmo possíveis diferenças em sua estrutura. No presente trabalho foi testado o efeito amebicida do metronidazol, da dinitroanilina orizalina, uma droga inibidora de microtúbulos, da aquilfosfocolina miltefosina, que inibe a síntese de fosfolipídios de membrana, e da droga híbrida TC95, que apresenta os grupos funcionais dinitroanilina e alquilfosfocolina. Realizou-se cultura com trofozoítos do protozoário, onde as drogas e o controle com os diluentes foram adicionados após 7 horas de cultivo. Foi feita a contagem dos trofozoítos viáveis após período de 12 horas da adição das drogas e do controle em intervalos de 12 a 60 horas. Após análise das curvas de crescimento, detectou-se que o TC95 foi a droga mais efetiva dos três tratamentos, a miltefosina obteve pouca inibição e a orizalina não foi efetiva. Isso se deve a maior suscetibilidade do parasito a danos de membrana, com pouca efetividade da inibição dos microtúbulos.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*. Quimioterapia antiparasitária. Microtúbulos. Divisão celular. Fosfolipídios.

ABSTRACT

Amebiasis is characterized as a chronic, noninflammatory, afebrile which involves the colon wall and can invade the intestinal mucosa and spread to other organs, especially the liver. *Entamoeba histolytica* infection is treated with metronidazole, but this one presents side effects, so researches have been done to find more effective drugs with no adverse effects to the patient. In addition, testing new drugs may reveal important features of the parasite, such as the discovery of metabolic pathways or possible differences in their structure. In the present study, it was tested the amoebicidal effect of metronidazole, dinitroaniline oryzalin, a microtubule inhibitor, miltefosine, an alkylphosphocholine, that inhibits the membrane phospholipids synthesis, and TC95, a hybrid drug that presents the functional groups dinitroaniline and alkylphosphocholine. It was performed a culture with protozoan trophozoites, where the drugs and the control with diluents were added after 7 hours of culture. It was made a count of the viable trophozoites 12 hours after the addition of the drugs and the control at intervals of 12 to 60 hours. After analyzing the growth curves, it was found that the TC95 was the most effective drug of the three treatments, miltefosine had little inhibition and oryzalin was not effective. This is due to greater susceptibility of the parasite to membrane damage, with little effectiveness on microtubules inhibition.

Keywords: *Entamoeba histolytica*. Antiparasitic chemotherapy.

Microtubules. Cell division. Phospholipids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Publicação feita por Lösh (1875) indicando microrganismo encontrado nas fezes de garoto com disenteria.....	19
Figura 2: Publicação de Kartulis (1886), inferindo patogenicidade às amebas, devido a observações do quadro clínico de pacientes com disenteria.....	20
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i> . Adaptado HAQUE et al., 2003...	27
Figura 4: Trofozoíto de <i>E. histolytica</i> . As setas indicam principais estruturas: ectoplasma, endoplasma, núcleo, cariossoma central e pseudópodo. Fonte: Facmed (Departamento de Microbiologia e Parasitologia).....	28
Figura 5: Cisto de <i>Entamoeba histolytica</i> . Fonte: CDC (Center for Disease Control).....	31
Figura 6: Via glicolítica de <i>E. histolytica</i>	35
Figura 7: Estrutura química do metronidazol.....	40
Figura 8: Estrutura química da miltefosina.....	42
Figura 9: Estrutura química da orizalina.....	43
Figura 10: Câmara de Neubauer; os quadrados maiores representam o quadrante A, utilizado para contagem de <i>E. histolytica</i> (LUCARINI et al., 2003).....	49
Figura 11: Curva de crescimento de <i>Entamoeba histolytica</i>	51
Figura 12: Tratamento com metronidazol comparado aos controles de <i>E. histolytica</i> e DMSO (concentrações de 5µM e 10µM).....	52

Figura 13: Tratamento com miltefosina comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5 μ M e 10 μ M).....53

Figura 14: Tratamento com orizalina comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5 μ M e 10 μ M).....53

Figura 15: Tratamento com TC95 comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5 μ M e 10 μ M).....54

Figura 16: Comparação dos tratamentos utilizando concentração de 5 μ M.....55

Figura 17: Comparação dos tratamentos utilizando concentração de 10 μ M.....56

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina Tri-fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	Fud and Drug Administration
FPP	Farnesil pirofosfato
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFOR	Piruvato: Ferredoxina Oxiredutase

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	14
1 – INTRODUÇÃO	16
2 – JUSTIFICATIVA	17
3 – REFERENCIAL TEÓRICO	
3.1 <i>Entamoeba histolytica</i> e amebíase	17
3.1.1 DEFINIÇÃO.....	17
3.1.2 HISTÓRICO.....	17
3.1.3 EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE.....	23
3.1.4 PATOGENIA E VIRULÊNCIA.....	24
3.1.5 CLASSIFICAÇÃO.....	25
3.2 Morfologia e biologia de <i>Entamoeba histolytica</i>	26
3.2.1 TROFOZOÍTOS.....	26
3.2.2 PRÉ-CISTOS.....	27
3.2.3 CISTOS.....	28
3.2.4 METACISTOS.....	28
3.2.5 CICLO BIOLÓGICO.....	29
3.2.6 ESTRUTURA.....	32
3.3 Metabolismo de <i>Entamoeba histolytica</i>	34
3.3.1 GLICÓLISE.....	34
3.3.2 METABOLISMO LIPÍDICO.....	36
3.4 Tratamento da amebíase	39
3.4.1 QUIMIOTERAPIA ANTIPARASITÁRIA.....	39
3.4.2 METRONIDAZOL.....	39
3.5 Drogas emergentes e promissoras na quimioterapia de protozoários parasitos	41
3.6 Objetivos	46
3.6.1 OBJETIVO GERAL.....	46
3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46

4 – MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 Cultura de células.....	47
4.2 Curvas de crescimento.....	47
4.3 Análise estatística.....	50
5 – RESULTADOS.....	51
6 – DISCUSSÃO.....	57
7 – CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICE	

1– INTRODUÇÃO

A amebíase é uma doença negligenciada que acomete milhões de pessoas no mundo. Ocorre principalmente em locais de clima tropical, onde não há perfeitas condições de saneamento básico. É causada pelo agente etiológico *Entamoeba histolytica* e pode manifestar-se de forma assintomática ou sintomática. Quando há sintomas, o paciente pode apresentar uma cólica intestinal branda, com diarreia, sendo autolimitada. Mas também pode ocorrer colite intestinal quando este protozoário invade a mucosa do intestino, sendo caracterizada pela presença de muco e sangue nas fezes, várias evacuações diárias, levando o paciente a adquirir um quadro mais grave. Além disso, em alguns casos, devido a invasão intestinal, pode ocorrer amebíase extra-intestinal, acometendo principalmente o fígado, causando o quadro de abscesso hepático amebiano.

Existe tratamento para a amebíase, porém, devido às diferentes regiões que ela atinge, o acesso e a utilização da medicação se tornam um agravante porque não há quantidade suficiente de medicamentos que atinjam toda a rede pública e nem sempre o esquema de doses estipulado é seguido. Além disso, pesquisas vêm demonstrando que o principal medicamento utilizado no tratamento, o metronidazol, apresenta características de toxicidade relacionadas a mutações em bactérias e formação de carcinomas em roedores, havendo também estudos relacionados a uma possível resistência adquirida nos protozoários tratados com esta droga.

Nos últimos anos, há uma escassez de trabalhos relacionados a teste de novos fármacos em *Entamoeba histolytica* principalmente pelo fato de já existir

tratamento e a doença apresentar diferenças nos quadros clínicos causados. Mesmo assim, ela pode ser grave, principalmente em crianças, e é preciso um enfoque maior no seu tratamento, controle e diagnóstico.

Com isto, é de extrema importância o teste de novos fármacos em *Entamoeba histolytica*. No presente trabalho, serão testadas três drogas em cultura de trofozoítos do protozoário e esta inibição da proliferação será acompanhada em função do tempo para indicar qual tratamento apresentou melhor efeito.

2 – JUSTIFICATIVA

A amebíase é considerada uma infecção de distribuição cosmopolita. Em escala mundial, cerca de 500 milhões de pessoas estão infectadas, com 10% apresentando as formas clínicas sintomáticas, como diarreia, colite e abscesso hepático (WALSH, 1986). Mesmo assim, é negligenciada, não há novos testes utilizando outros fármacos bem como medicamentos novos no mercado para seu tratamento.

Além disso, devido ao metronidazol apresentar diversos efeitos colaterais e alta toxicidade ao organismo, busca-se novos fármacos capazes de tratar a infecção eficazmente, de forma que não apresentem efeitos colaterais relevantes e toxidez, para um melhor tratamento ao paciente.

As vias do metabolismo lipídico de *E. histolytica* não foram totalmente descritas e uma abordagem farmacológica pode elucidar algum mecanismo importante destas vias, bem como particularidades da biologia celular do protozoário.

3 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Entamoeba histolytica* e amebíase

3.1.1 DEFINIÇÃO

As doenças diarréicas continuam sendo as maiores causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento. A disenteria bacilar é mais comumente causada por microrganismos pertencentes ao gênero *Shigela*, enquanto a disenteria amebiana é causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica* (HAQUE et al., 2003).

Amebíase é uma doença que pode se manifestar quando o protozoário *E. histolytica* está presente no organismo humano podendo ser assintomática ou não, caracterizando-se como uma doença de evolução crônica, algumas vezes pode ser inflamatória, frequentemente afebril e que, primariamente, envolve a parede do intestino grosso podendo por vezes invadir a mucosa intestinal e se disseminar para outros órgãos, principalmente o fígado (MUNOZ et al., 1989; OMS, 1997).

Uma estimativa da Organização Mundial da Saúde (1998) coloca *E. histolytica* em segundo lugar, após *Plasmodium falciparum*, como causa de morte entre os parasitos protistas, sendo responsável por cerca de 100.000 mortes/ano.

3.1.2 HISTÓRICO

As evidências acerca dos registros iniciais de casos de amebíase não são inequívocas, dado que existem diversas causas possíveis para os sintomas associados a essa doença além da presença do próprio parasito. É possível que o registro mais antigo seja um documento sânscrito, *Brigu-samhita*, escrito por volta de 1000 a. C., que descreve um caso de diarreia sangrenta (COX, 2002). Textos assírios e babilônicos da Biblioteca do Rei Ashurbanipal referem-se a sangue nas fezes, sugerindo casos de amebíase na bacia do Tigre-Eufrates antes do sexto século a. C. (LABAT, 1954). A amebíase espalhou-se pelo Ocidente e pelo Oriente na Idade Média, e existem diversos registros de “descarga sanguínea” na Europa, Ásia, Pérsia e nos Bálcãs nesse período (COX, 2002). A doença parece ter sido introduzida no Novo Mundo por europeus por volta do século XVI (CROSBY, 1986). No século XIX, o livro *Researches into the Causes, Nature and Treatment of the More Prevalent Diseases of India and of Warm Climate Generally*, de James Annersley, surge como o primeiro registro preciso das formas intestinal e hepática da amebíase (COX, 2002).

O primeiro registro de amebas encontradas em fezes humanas foi feito por Lambl, em 1860, em um caso de diarreia infantil (LAMBL, 1859). Em 1875, Fedor Aleksandrovich Lesh (também conhecido como Friedrich Lösch) publicou a identificação de um microrganismo que encontrou ao estudar as fezes de um garoto com quadro de disenteria (Figura 1). Nesse mesmo artigo, ele demonstrou que, após a inoculação de amebas em cães (o primeiro modelo experimental de amebíase), a intensidade da “inflamação intestinal” está diretamente relacionada ao número de

parasitos encontrados após dissecção (LÖSCH, 1875). Observando o curso temporal da disenteria clínica relatada e da disenteria experimental causada pela inoculação com amebas, ele concluiu que as amebas somente intensificavam os sintomas causados por uma causa anterior.



Figura 6: Publicação feita por Lösch indicando microrganismo encontrado nas fezes de garoto com disenteria.

Em 1886, Kartulis e 1887, Koch, atribuíram patogenicidade às amebas, responsabilizando-as pelos quadros observados em pacientes que apresentavam disenteria tropical (Figura 2).

Fig. 4. Dickerer Actinomycesfaden mit Kolben (Anilin-Safranin, Jod-Jodkalium-Behandlung).

Fig. 5. Amyloid entartete Leber mit neutralem Farbstoff behandelt. a Arterie, g Gallengang, bg Bindegewebe. b Blutkörperchenhaltige intralobuläre Capillare, e normale Leberzellen, f verfettete Leberzellen. d Amyloid.

XXIII.

Zur Aetiologie der Dysenterie in Aegypten.

Von Dr. Kartulis in Alexandrien.

(Hierzu Taf. XVII. Fig. I—III.)

Durch die Mittheilungen einiger Forscher wissen wir, dass bei gewissen Darmentzündungen, abgesehen von Bakterien, auch andere parasitische Organismen, Protozoen oder Mycetozoen, als die Ursache dieser Erkrankungen vermuthet wurden.

So fand im Jahre 1859 Lambl¹⁾ bei einem an Enteritis verstorbenen Kinde in dem Darmschleim ein amöbenartiges Thierchen von 0,004—0,006 mm und beschalte Difflugien und Ariellen von 0,01—0,016 mm Durchmesser.

Lösch²⁾ entdeckte später in St. Petersburg bei einem an Darmentzündung leidenden Bauer in den Stuhlausleerungen eine grosse Menge von Amöben. Die Wichtigkeit des Falles erfordert seine nachträgliche wortgetreue Wiedergabe. Ich lasse deshalb dieselbe im Nachstehenden folgen.

„Die Leibessubstanz der 0,02—0,035 mm messenden Art ist von ziemlich flüssiger und grobkörniger Beschaffenheit und bildet gewöhnlich nur einen oder einige wenige stumpfe und breite Fortsätze, die rasch entstehen, auch nicht selten eben so rasch eingezogen werden und dem rundlichen Körper eine bald

¹⁾ R. Leukart, Die Parasiten des Menschen. I. Bd. I. Lief. Leipzig und Heidelberg. 1879. — Lambl, Aus dem Franz Joseph-Kinderspitale. Bd. I. S. 363.

²⁾ Lösch, Massenhafte Entwicklung von Amöben im Dickdarm. Arch. für path. Anatomie. 1875. Bd. 65.

Figura 7: Publicação de Kartulis (1886), inferindo patogenicidade às amebas, devido a observações do quadro clínico de pacientes com disenteria.

Já em 1890, Osler descreve pela primeira vez, no Panamá, um caso de disenteria causado por ameba, além de ter associado casos de abscessos hepáticos como também sendo causado pelo protozoário (REYES, 2002).

No ano seguinte (1891), Councilman & Lafleur empregaram pela primeira vez os termos “disenteria amebiana” e “abscesso hepático amebiano”, descrevendo detalhadamente e denominando o parasito causador da amebíase como *Entamoeba dysenterae*, sugerindo também a existência de outra ameba que não seria patogênica (REYES, 2002).

Quincke e Ross (1893) identificaram a existência de mais de 12 diferentes espécies de ameba que podiam habitar o intestino humano, podendo ser diferenciadas microscopicamente. Descreveram o ciclo biológico do protozoário, inclusive a identificação da forma infectante e a demonstração de sua capacidade de infecção ao ser ingerido. Em 1903, um estudo realizado por Schaudin descreveu a *E. histolytica* e a diferenciou da *E. coli*. Em 1912, Prowazek descreveu uma ameba morfologicamente parecida com *E. histolytica*, embora menor, denominando-a *Entamoeba hartmanni*; e em 1913, Walker & Selards confirmaram que trofozoítos provenientes de indivíduos sem sintomas disentéricos podiam produzir infecções assintomáticas, caracterizando o portador assintomático; estabeleceram ainda que *E. histolytica* era uma espécie patogênica. Posteriormente Dobell (1919), formulou a **Teoria Unicista**, na qual *E. histolytica* constitui a única espécie parasito obrigatório dos tecidos, causando lesões. Com o advento do cultivo de amebas por Boeck & Drbohlav (1925) novos estudos puderam ser realizados, com importância marcante na história da amebíase e do parasito.

Em 1925, Brumpt, procurando explicar as diferenças geográficas das formas clínicas da doença e o grande número de indivíduos infectados e assintomáticos, formulou a **Teoria Dualista** e propôs a existência de duas espécies morfológicamente indistinguíveis: *Entamoeba dispar*, um organismo não patogênico; e *Entamoeba dysenteriae* (*E. histolytica*), que seria a forma patogênica. Como não existiam meios de distinguir os dois organismos, as idéias de Brumpt tiveram pouca aceitação.

Hoare (1961) propõe uma nova teoria, a **Teoria Pluralista** que diz existir cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência, o que justificaria casos de amebíase assintomática até formas mais graves da doença. Entretanto, ele não explica o fato da amebíase invasiva ser mais freqüente em países de clima tropical do que naqueles de clima temperado ou frio.

Na década de 70, utilizando Concanavalina-A (Con-A), Martinez-Palomo et al. (1982) demonstraram diferenças na aglutinação entre cepas de *E. histolytica* isoladas de indivíduos sintomáticos daqueles com infecção assintomática. Outro trabalho importante foi realizado por Sargeant et al. (1978) que demonstraram que *E. histolytica* poderia ser dividida em dois grupos através da eletroforese de isoenzimas, verificando diferenças no perfil isoenzimáticos (zimodema) de isolados amebianos classificados como "patogênicos".

Estes autores demonstraram existir perfis diferentes de bandas entre culturas de amebas provenientes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, quando submetidas à eletroforese das isoenzimas fosfoglicomutase (PGM), glicose fosfato isomerase (GPI), enzima málica (ME) e enzima hexocinase (HK). Foram descritos mais de 21 zimodemas e, de um modo geral, a ausência da banda alfa e a

presença da banda beta em PGM, assim como as bandas de corrida rápida em HK, são considerados marcadores de patogenicidade para *E. histolytica* (SARGEAUNT, 1978).

Posteriormente, a classificação entre formas “patogênicas” e “não patogênicas” pôde ser efetuada molecularmente, levando vários pesquisadores e a OMS a acatarem **Teoria Dualista** (DIAMOND & CLARK, 1993; OMS, 1997). A aceitação da *E. histolytica* e *E. dispar* como espécies diferentes trouxe mudanças graduais, porém profundas, no entendimento da epidemiologia, controle e tratamento da amebíase.

3.1.3 EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE

Estima-se que existam cerca de 500 milhões de pessoas no mundo infectadas com *E. histolytica*, destes, aproximadamente 40-50 milhões são casos de amebíase invasiva e abscessos no fígado (NEVES, 2000).

E. histolytica é considerada uma ameaça à saúde global. Apesar de ter distribuição mundial, na maioria das vezes afeta indivíduos de baixo poder econômico que vivem em condições precárias de saneamento básico, nos países em desenvolvimento (PINHEIRO et al., 2007). Em países desenvolvidos, onde a transmissão oral-fecal é pouco frequente, a amebíase é mais comumente observada em imigrantes e viajantes oriundos de países subdesenvolvidos (HAQUE et al., 2003).

No Brasil, a amebíase apresenta grande diversidade no número de indivíduos infectados ou com sintomatologia da doença, variando de região para região. No Sul e Sudeste do país, a prevalência varia de 2,5% a 11%, na região amazônica atinge até 19%, e nas demais regiões fica em torno de 10% (NEVES, 2000). Recentemente, foi encontrada na Grande Belém/PA uma prevalência de 29,35%, demonstrando uma relação significativa entre a presença de *E. histolytica* e o desenvolvimento de diarreia e cólicas intestinais em pacientes residentes nesta cidade (SILVA et al., 2005).

3.1.4 PATOGENIA E VIRULÊNCIA

A patogenia da amebíase está diretamente relacionada com a capacidade de síntese e secreção de moléculas responsáveis pela virulência dos trofozoítos. Há três mecanismos principais envolvidos: morte contato-dependente, lise osmótica da célula alvo e clivagem de barreiras físicas do hospedeiro.

Uma das características de patogenicidade da *E. histolytica* é a morte contato-dependente das células hospedeiras, onde o parasito é capaz de matar uma variedade de tipos de células (BURCHARD e BILKE, 1992; GUERRANT et al., 1981). Há um grupo de moléculas composto pelas lectinas, localizado na superfície dos trofozoítos que reconhece oligossacarídeos N- e O-ligados presentes na superfície das células-alvo, principalmente galactose e *N*-acetilgalactosamina (Gal / GalNAc) (CHADEE, et al., 1987; RAVDIN, et al., 1985). Há um contato entre as moléculas de lectina e os glicoconjugados ocorrendo uma mudança conformacional

da subunidade maior da lectina, disparando uma cascata de transdução de sinal responsável pela citólise da célula-alvo (CALALB et al., 1995; LAFLAMME, 1996). A morte celular ocorre dentro de 5-15 minutos e é geralmente seguida por fagocitose. Além dessa função, as lectinas protegem os trofozoítos do ataque do sistema complemento, pois parecem possuir similaridade funcional com a proteína regulatória do complemento, a CD59, a qual se liga às subunidades C8 e C9 do complexo C5b-9 (ROLLINS et al., 1991).

Os amebaporos são uma família de pequenas proteínas (77 aminoácidos) citotóxicas para células do hospedeiro humano, que mostram potente atividade antibacteriana e causam a formação de canais em membranas artificiais. São compostos pelas isoformas A, B e C, que foram isoladas como peptídeos biologicamente ativos a partir do citoplasma granular de cepas patogênicas (LEIPPE et al., 1994). Essas moléculas são capazes de penetrar na região hidrofóbica da membrana plasmática das células-alvo expondo o lado polar da cadeia para a água graças ao seu arranjo de α -hélices anfipáticas. Os monômeros tendem a oligomerizar-se, num processo dirigido por interação peptídeo-peptídeo, formando um canal preenchido por água através do qual íons e outras moléculas pequenas passam livremente, resultando em lise osmótica da célula (LEIPPE et al., 1992).

As cisteína-proteinases são enzimas proteolíticas presentes nos organismos eucariontes, sendo as enzimas mais encontradas nos lisados de *E. histolytica*, consideradas o fator mais importante de virulência deste protozoário (QUE e REED, 2000). A função dessas enzimas na invasão tecidual é atribuída à sua habilidade em clivar estruturas que compõem a matriz extracelular (colágeno laminina e fibronectina). As proteinases não agem somente na degradação das

barreiras físicas do hospedeiro, mas também clivam determinados isotipos de imunoglobulinas (SANTOS e SOARES, 2008).

3.1.5 CLASSIFICAÇÃO

A *Entamoeba histolytica*, segundo Levine (1980), pertence ao Sub-reino *Protozoa*, *Phylum Sarcomastigophora*, *Subphylum Sarcodina*, Superclasse *Rhizopoda*, Classe *Lobozia*, Ordem *Ameobida*, Família *Entamoebidae* e Gênero *Entamoeba*. Do Reino *Protozoa* fazem parte os organismos unicelulares pertencentes a vários filos diferentes, na qual sua diversidade é refletida pela extensa variedade de habitats nos quais podem ser encontrados e nos diferentes modos de vida que exibem (NEVES, 2000). A maioria das espécies do Gênero *Entamoeba* vive no intestino grosso do homem, à exceção da *Entamoeba gingivalis*, que vive na cavidade bucal e da *Entamoeba moshkovskii*, que é uma ameba de vida livre (NEVES, 2000).

3.2 Morfologia e biologia de *Entamoeba histolytica*

3.2.1 TROFOZOÍTOS

De acordo com Ravdin, (1988), os trofozoítos de *E. histolytica* medem de 20 a 40µm de diâmetro e sua locomoção é feita através de pseudópodes que são frequentemente estendidos, com diferenciação entre ectoplasma e endoplasma.

O citoplasma é rico em glicogênio e possui ribossomos agregados em forma de hélice. Não apresenta nenhuma mitocôndria ou aparelho de Golgi visível, centríolos, microtúbulos e retículo endoplasmático. Mesmo assim, *E. histolytica* é considerada célula eucariótica porque apresenta DNA confinado envolto em uma membrana nuclear (Figura 3) (RAVDIN, 1988).

Há normalmente um único núcleo esférico, medindo de 4 a 7µm de diâmetro, consistindo de delicada membrana apresentando uma camada com pequenos grânulos de cromatina de tamanho uniforme, muito próximos uns aos outros. O núcleo possui um pequeno cariossoma esférico (0,5 µm) de localização central (RAVDIN, 1988).

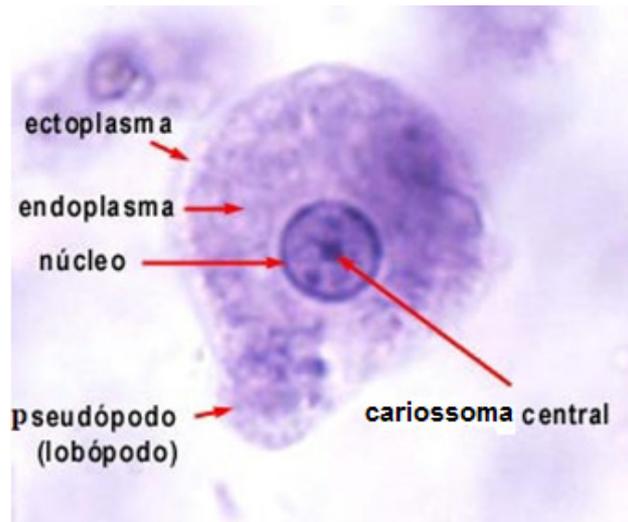


Figura 8: Trofozoíto de *E. histolytica*. As setas indicam principais estruturas: ectoplasma, endoplasma, núcleo, cariossoma central e pseudópodo. Fonte: Facmed.

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/generalidades.php>

3.2.2 PRÉ-CISTOS

Os pré-cistos são formas intermediárias entre os trofozoítos e os cistos. São geralmente arredondados ou ovais, menores que os trofozoítos. Possuem geralmente um só núcleo, cuja morfologia é semelhante à descrita para os trofozoítos. No citoplasma, muitas vezes são vistas estruturas em forma de bastonetes com extremidades ligeiramente arredondadas, denominadas de corpos cromatóides (FREITAS, 2007).

3.2.3 CISTOS

Os cistos são esféricos e medem de 8 a 20 μm de diâmetro, apresentando em seu envoltório parede refratária, bastante rígida, formada por quitina. Os núcleos variam de um a quatro e apresentam vacúolos de glicogênio e corpos cromatóides em forma de bastonetes. O núcleo é vesicular e esférico, sendo revestido por grânulos de cromatina, apresentando cariossoma situado no centro (Figura 4) (FREITAS, 2007).

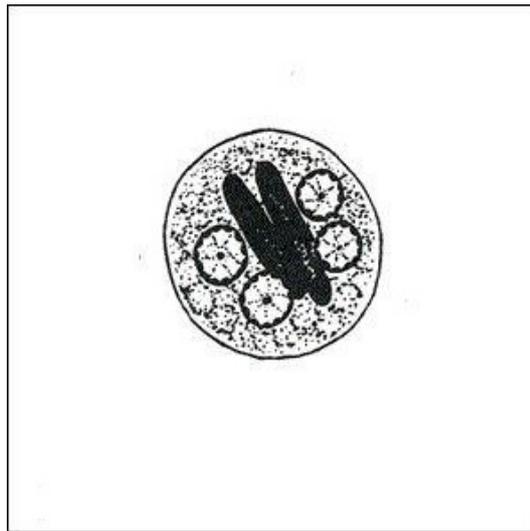


Figura 9: Representação esquemática de um cisto de *Entamoeba histolytica*. Apresenta 4 núcleos de localização central e cromatina periférica uniformemente distribuída. Fonte: Center for Disease Control http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Amebiasis_il.htm

3.2.4 – METACISTOS

São amebas uninucleadas menores do que os trofozoítos normais, sendo chamados trofozoítos metacísticos. Eles crescem e colonizam o intestino grosso, fechando, desta maneira, o ciclo (FREITAS, 2007).

3.2.5 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico é monoxênico e inicia-se com a ingestão de água e alimentos contaminados com cistos maduros da *E. histolytica*, pelo hospedeiro humano (Figura 5; Etapa 1). Após a ingestão, os cistos passam pelo estômago, sofrendo à ação do suco gástrico e chegam ao final do intestino delgado ou início do intestino grosso, onde começa o processo de desencistamento e a liberação do metacisto através de uma fenda na parede cística (Etapa 2, na Figura 5) (NEVES, 2000; HAQUE et al., 2003; LAUGHLIN e TEMESVARI, 2005).

Em seguida, o metacisto sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas, dando origem a quatro e depois oito trofozoítos (Etapa 3, na Figura 5). Estes trofozoítos migram e colonizam o intestino grosso. Normalmente, ficam aderidos à mucosa, vivendo como comensal, alimentando-se de detritos e de bactérias. Sob certas circunstâncias não bem esclarecidas, podem desprender-se da parede e, na luz do intestino grosso, sofrer desidratação, eliminar substâncias presentes no citoplasma e se reencistar transformando-se primeiramente em pré-cistos. Em seguida, secretam uma membrana cística e se transformam em cisto,

inicialmente mononucleado (Etapa 4, na Figura 5) Através de divisões nucleares sucessivas, se transformam em cistos tetranucleados, que são eliminados juntamente com as fezes. Geralmente não são encontrados em fezes liquefeitas ou disentéricas (NEVES, 2000; HAQUE et al., 2003; LAUGHLIN e TEMESVARI, 2005).

Ao contrário de alguns protozoários parasitos, a invasão de tecidos por *E. histolytica* não parece fazer parte do seu ciclo de vida. Nos tecidos, o trofozoíto não se diferencia em cisto e não é transmitido a outros hospedeiros (NEVES, 2000). O processo de invasão tecidual ocorre quando há uma quebra no equilíbrio parasito-hospedeiro e então os trofozoítos invadem a submucosa intestinal, multiplicando-se ativamente no interior das úlceras (Etapa 5 na Figura 5) e podem, através da circulação porta, atingir outros órgãos como o fígado e, posteriormente, pulmão, rim, cérebro ou pele, causando a amebíase extra-intestinal (Etapa 6 na Figura 5). O trofozoíto presente nestas úlceras é denominado forma invasiva ou virulenta (NEVES, 2000).

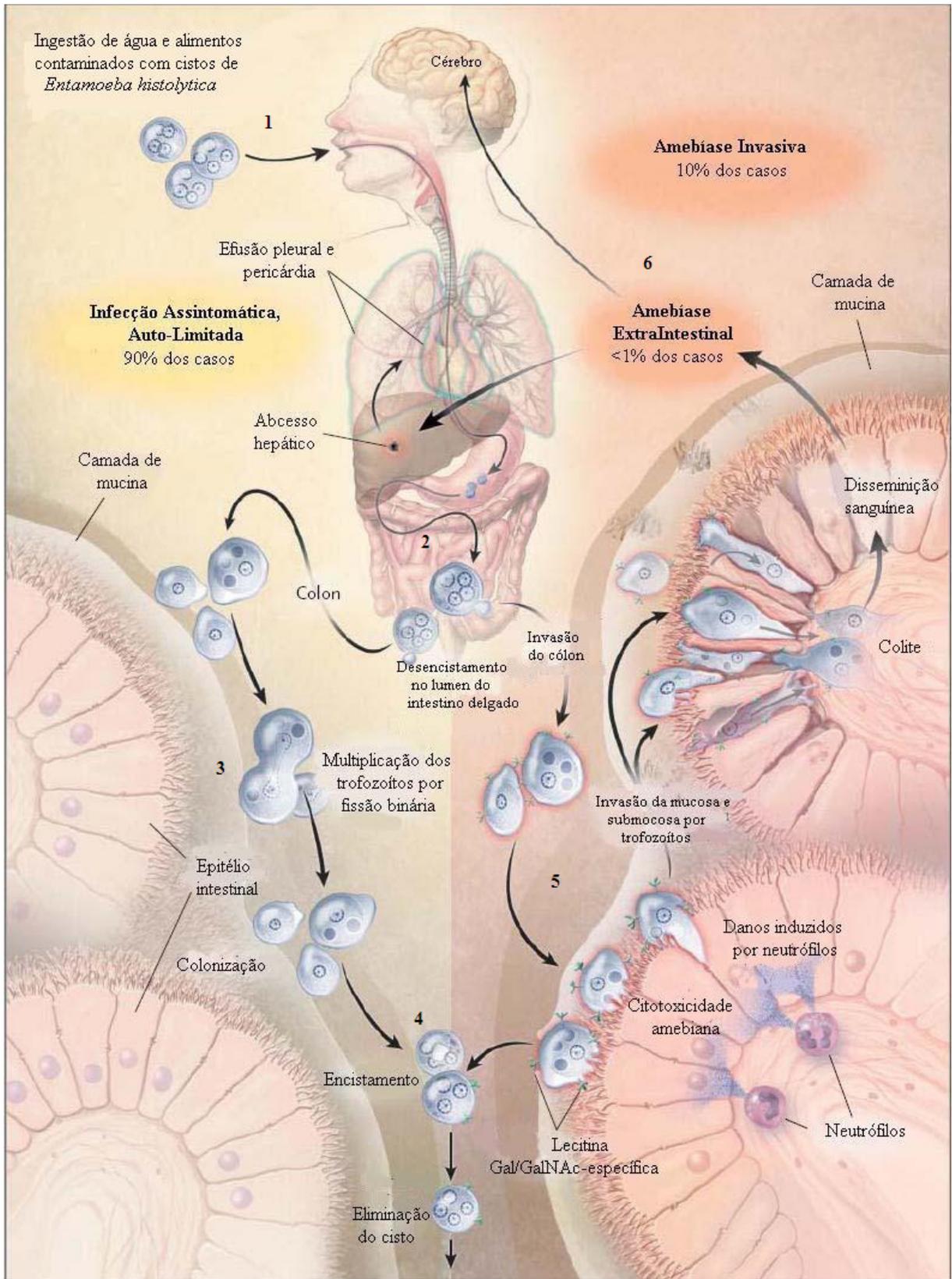


Figura 10: Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica*. Adaptado de HAQUE et al., 2003.

3.2.6 ESTRUTURA

O citoesqueleto dos eucariotos é composto por três elementos principais: microfilamentos de actina, microtúbulos de tubulina e filamentos intermediários. Uma característica marcante dos trofozoítos de *E. histolytica* é a sua alta mobilidade manifestada pela locomoção rápida, pleomorfismo e o movimento contínuo de componentes intracelulares. Durante a infecção do hospedeiro humano, a motilidade pode ser um dos principais determinantes para o comportamento de trofozoítos invasivos; após a infecção, os trofozoítos se tornam fagócitos ávidos ao ingerir células danificadas, matriz extracelular e eritrócitos (MEZA et al., 2006). A locomoção das amebas se dá através de pseudópodes e a energia para a movimentação provém da conversão anaeróbica da glicose e piruvato para etanol (STANLEY, 2003). A ingestão de alimentos se dá por fagocitose e pinocitose (MARTINEZ-PALOMO, 1988).

Apesar do fato de *E. histolytica* ser muito móvel e realizar a fagocitose de forma muito eficiente, seus componentes do citoesqueleto são simples (CLARK et al., 2007).

A actina precisa se unir a outras proteínas para formar as complexas estruturas responsáveis por movimentos celulares; os filamentos de actina se conectam em redes extensas que podem se ligar a outras proteínas no citoplasma ou a proteínas e lipídios na membrana plasmática (CUNNINGHAM et al., 1992). Em trofozoítos de *E. histolytica* várias proteínas foram identificadas pela sua associação com a actina, podendo formar estruturas ou fazendo ligação direta a monômeros e polímeros de actina. Em placas de adesão formadas durante a interação de *E.*

histolytica com proteínas da matriz extracelular, feixes de filamentos de actina foram encontrados associados à membrana celular. Além da actina, proteínas como vinculina, actinina e miosinas I e II foram identificadas como componentes dessas placas (VÁSQUEZ et al., 1995).

As miosinas são proteínas que funcionam como “motores moleculares”, sendo essenciais para o movimento celular. Esse processo é do tipo ativo, pois há conversão de energia química em trabalho mecânico através da hidrólise de ATP, produzindo a contração dos filamentos. Nas células eucarióticas há pelo menos 18 diferentes classes de miosinas com funções específicas, sendo a maioria delas encontrada em células eucarióticas superiores. Em *E. histolytica*, apenas duas miosinas foram identificadas (RAYMOND-DENISE, et al., 1993).

Microtúbulos citoplasmáticos não são observados em trofozoítos de *E. histolytica*. Estas estruturas são encontradas apenas dentro dos núcleos em divisão e podem ser identificados utilizando várias técnicas de microscopia. O fuso mitótico intranuclear é formado por um feixe de microtúbulos que não convergem nos pólos em ásteres bem definidos (ARGÜELLO et al., 1992).

O terceiro elemento importante no citoesqueleto de células eucarióticas, os filamentos intermediários, não foram descritos até o momento em trofozoítos de *E. histolytica*. Como estes tipos de filamentos são mais estáveis e contribuem para a rigidez da célula, é possível que em uma célula altamente móvel como a de *E. histolytica* estas estruturas não se formem e, conseqüentemente, as proteínas que as constituem não sejam expressas (MEZA et al., 2006).

3.3 Metabolismo de *Entamoeba histolytica*

3.3.1 GLICÓLISE

Entamoeba histolytica é um anaeróbio aerotolerante *in vitro*, respira e consome pequena quantidade de oxigênio. No entanto, pode ser sensível aos níveis mais altos de oxigênio quando a espécie invade os tecidos (RAVDIN, 1985). Os trofozoítos possuem um metabolismo principalmente anaeróbio, não sendo descrita a presença de atividades enzimáticas correspondentes ao ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa, porque o ATP provém exclusivamente da glicólise (REEVES, 1984; SAAVEDRA et al., 1996).

E. histolytica não é capaz de converter substâncias orgânicas como glicose em H₂O e CO₂, portanto, conta com a energia gerada por vários tipos de fosforilação em nível de substrato (REEVES, 1984). Para degradar a glicose e o piruvato o parasito utiliza a via glicolítica clássica. Em algumas reações não se utiliza ATP e sim o pirofosfato inorgânico como cofator (REEVES, 1984; SAAVEDRA et al., 2004).

Na maioria dos organismos a transformação de fosfoenol piruvato a piruvato se realiza pela enzima piruvatocinase. Em *E. histolytica* esta reação é catalisada pela piruvato fosfodiquinase, outra enzima dependente de pirofosfato (SAAVEDRA-LIRA e PERÉZ-MONFORT, 1996). Da mesma forma, na maior parte dos organismos o piruvato sofre uma descarboxilação oxidativa para formar acetil-CoA. Em mitocôndrias e bactérias aeróbicas esta reação é catalisada por um

complexo chamado piruvato desidrogenase e os elétrons gerados durante a reação são transferidos ao NAD^+ . Em *E. histolytica* esta mesma reação é catalisada pela enzima dimérica piruvato ferredoxina:oxiredutase (PFOR) e os elétrons são transferidos a uma ferredoxina (SAAVEDRA-LIRA e PERÉZ-MONFORT, 1996). A PFOR é uma enzima de grande importância para *E. histolytica*, já que o parasita não tem NAD^+ piruvato desidrogenase dependente e piruvato descarboxilase (REEVES, 1984). A PFOR descarboxiliza oxidativamente o piruvato a acetil-CoA. Os elétrons são transferidos para ferredoxina que, na sua forma reduzida, pode ativar e reduzir o metronidazol, a droga anti-amebiana mais utilizada (MÜLLER, 1986).

A figura 6 mostra a via glicolítica de *E. histolytica* e o papel da ferredoxina na redução do radical nitro do metronidazol.

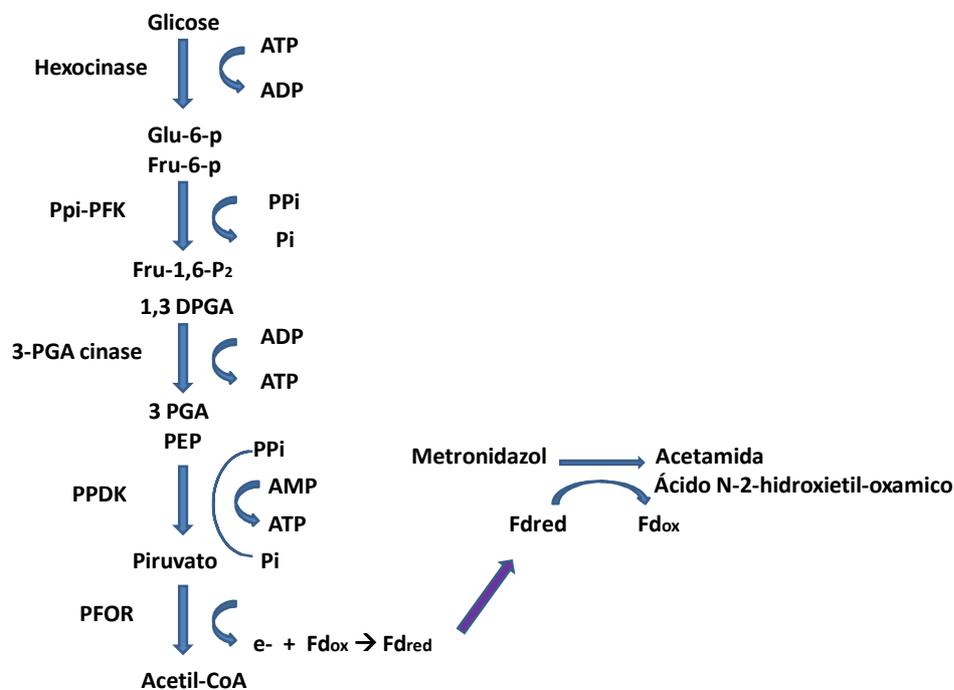


Figura 6: Via glicolítica de *E. histolytica*. Abreviações: 1,3-DPGA, 1,3-difosfoglicerato; Fru-1,6-P₂, frutose-1,6-bisfosfato; Fru-6-P, frutose-6-fosfato; Glu-6-P, glicose-6-fosfato; 3-PGA,

3-fosfoglicerato; PEP, fosfoenolpiruvato; PDK, piruvato ortofosfato dicinase; P_{Pi}-PFK, fosfofrutocinase P_{Pi}-dependente; PFOR, piruvato ferredoxina óxiredutase; Fdox, ferredoxina oxidada; Fdred, ferredoxina reduzida. PFOR descarboxiliza o piruvato a Acetil-CoA, os elétrons gerados são doados a uma ferredoxina que pode reduzir o grupo nitro do metronidazol, ativando-o e formando o acetamida e ácido N-2-hidroxi-etil-oxamico. Adaptado de Plaxton *et al.*, 2006.

O citoplasma dos trofozoítos contém numerosos grânulos de glicogênio que foram observadas pela primeira vez por microscopia eletrônica (ROSENBAUM e WITTNER, 1970) e posteriormente caracterizadas bioquimicamente (TAKEUCHI *et al.*, 1977). *E. histolytica* utiliza o glicogênio como seu armazenamento de energia. Em *E. histolytica*, o glicogênio possui uma estrutura compacta, tal como sugerido por pontos de ramificação a cada 5-6 resíduos de glicose (BAKKER-GRUNWALD *et al.*, 1995).

3.3.2 METABOLISMO LIPÍDICO

Protozoários anaeróbios/microaerófilos como *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* possuem capacidade limitada de síntese lipídica. A composição dos lipídios de membrana destes protozoários pode ser modificada em resposta às condições intestinais e vaginais que os mesmos colonizam, mas os detalhes desta via ainda não são bem entendidos (DAS *et al.*, 2002).

Embora o colesterol e os fosfolipídios sejam obtidos principalmente a partir dos alimentos ou do hospedeiro humano, *Entamoeba histolytica* tem alguma capacidade de biossíntese, bem como remodelação de lipídios e união destes às proteínas (CLARK et al., 2007). O colesterol é um lipídio anfipático, componente estrutural de membranas de células e camadas exteriores de lipoproteínas do plasma. Está presente nos tecidos ligados à lipoproteínas do plasma como éster de colesterol ou combinado com ácidos graxos de cadeia longa e é formado a partir de precursores de isopreno C₅ (REEVES, 1984; BANSAL et al., 2005).

E. histolytica carece de várias enzimas para a biossíntese clássica do esterol (SCHROEPFER, 1981). A primeira etapa da biossíntese de esteróis é a formação de isopentenil ou dimetilalil difosfato. No genoma de *E. histolytica* nenhum gene foi encontrado para geração desses intermediários (ROHMER et al., 1993; HUNTER et al., 2003).

Em etapa posterior para a síntese de colesterol, duas moléculas de C₁₅ farnesil difosfato são dimerizadas em C₃₀ presqualeno difosfato pela enzima esqualeno sintetase. Esta atividade enzimática e os catalisadores das etapas subsequentes também parecem estar ausentes (HUNTER et al., 2003; ROHMER et al., 1993).

Entretanto, foi descoberto que o genoma de *E. histolytica* parece codificar enzimas envolvidas nas etapas intermediárias da biossíntese do colesterol, na conversão de C₅ isopentenil difosfato para C₁₅ farnesil difosfato. Estas substâncias, juntamente com geranylgeranyl difosfato podem servir como precursores para a modificação hidrofóbica das proteínas GTP-obrigatórias, permitindo que elas se liguem à membrana (GRUNLER et al., 1994).

O genoma deste parasito contém todos os genes necessários para codificar o caminho de isopentenil difosfato para processamento da proteína geranylgeranyl ou farnesil. A fonte de matéria, isopentenil difosfato, ainda não é conhecida, podendo haver um caminho desconhecido para sua síntese ou o parasito ser capaz de adquiri-la em seu ambiente (CLARK et al., 2007).

Os fosfolipídeos representam 60-70% dos lipídeos totais em *E. histolytica* (SAWYER et al., 1967). Até agora, poucas informações estão disponíveis sobre como essas moléculas são sintetizadas, adquiridas ou remodeladas. O projeto genoma revelou uma série de genes relacionadas a esse processo, indicando que o metabolismo de fosfolipídios poderia ser mais complexo do que o esperado (CLARK et al., 2007). Para algumas etapas da formação de fosfolipídios foram identificados alguns genes de *E. histolytica*, codificando determinadas enzimas:

1ª etapa: formação de fosfadidato (intermediário do fosfolipídio) através da fosforilação e acilalação do glicerol;

2ª etapa: transferência do grupo acil do glicerol-3-fosfato (gene não encontrado para essa etapa);

3ª etapa: fosfato é removido, resultando em diacilglicerol;

4ª etapa: fosforilação para ativar etanolamina e colina para fixação ao fosfadidato;

5ª etapa: fosfato de etanolamina e fosfato de colina são convertidos em CDP-etanolamina e CD-colina;

6ª etapa: etanolamina é anexada ao diacilglicerol, produzindo fosfatidiletanolamina e colina é anexada ao ácido linolênico do diacilglicerol, produzindo fosfatidilcolina.

Para a realização da 4ª até a 6ª etapas, foram encontrados 8 genes (CLARK et al., 2007).

3.4 Tratamento da amebíase

3.4.1 QUIMIOTERAPIA ANTIPARASITÁRIA

Em 1912, a emetina foi indicada para tratamento da infecção por *E. histolytica* (ROGERS, 1912A, 1912B). Atualmente, as drogas antiamebianas utilizadas são os 5-nitroimidazóis (metronidazol e tinidazol) (KNIGHT, 1980). A cloroquina, emetina e desidroemetina são utilizadas para os casos em que não há uma resposta apenas utilizando o metronidazol e tinidazol (BASSILY et al., 1987).

Várias drogas nitroimidazólicas, incluindo Nitazoxanida, Paromomicina e Niridazol têm potencial para o tratamento de infecções por protozoários microaerófilos. Nitazoxanida tem amplo espectro de atividade antiparasitária e poderia ser usada como agente de primeira linha contra amebíase e outras doenças parasitárias no futuro. Seu mecanismo prevê a inibição da enzima piruvato:ferredoxina oxireductase - PFOR (PETRI, 2003; CUDMORE et al., 2004).

Drogas com ação no lúmen intestinal tais como Furoato de Diloxanida (Furamida), Iodoquinol (Yodoxin) e Paromomicina (Humatin), têm sido usadas para eliminar os cistos do lúmen e prevenir recaídas. No entanto, casos assintomáticos que não respondem à terapia prolongada são observados ocasionalmente (WEBER et al., 1990).

3.4.2 METRONIDAZOL

O metronidazol (1- (β -hidroxietil)-2-metil-nitroimidazol), é um agente antibacteriano e antiparasitário sintético, da classe dos nitroimidazóis, utilizado há mais de 35 anos. Sua indicação inicial foi o tratamento de infecções causadas por *Trichomonas vaginalis*, mas ao longo dos anos houve um aumento no espectro de sua ação, sendo utilizado atualmente no tratamento de uma variedade de infecções causadas por diferentes tipos de organismos, como *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* (BENDESKY e MENÉDEZ, 2001).

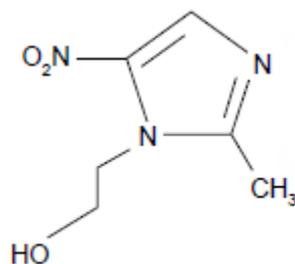


Figura 7: Estrutura química do metronidazol.

Após a administração oral, é totalmente absorvido e penetra nos tecidos e secreções corporais, sendo metabolizado principalmente no fígado e excretado na urina (LAU et al., 1992; TRACY et al., 1996). O passo inicial para ativação da droga é a transferência de elétrons para o grupo nitro. O piruvato e a ferredoxina parecem ser a principal fonte de elétrons para esta reação. Em anaerobiose, a descarboxilação do piruvato pela enzima PFOR está acoplada à redução da ferredoxina, a qual, por sua vez é capaz de ativar o metronidazol, no meio intracelular, gerando radical nitro tóxico pela redução do grupo nitro (EDWARDS, 1993; TOWNSON et al., 1994). O metronidazol reduzido, acceptor terminal de elétrons, liga-se covalentemente à molécula de DNA, promovendo a perda da estrutura helicoidal e desestabilização molecular do DNA, com subsequente morte do trofozoíto (EDWARDS, 1993).

A ativação do metronidazol pelo processo de redução gera ainda a liberação de radicais tóxicos que reagem com componentes celulares essenciais, interferindo no metabolismo celular. Organismos com via metabólica ligada a ferredoxina podem reduzir o grupo nitro, enquanto que organismos onde esta via é ausente ou pouco usada são ineficientes para ativar o metronidazol (EDWARDS, 1993).

Vários efeitos colaterais são ocasionados aos pacientes tratados com metronidazol, dentre eles: gosto metálico na boca, dores de cabeça, náusea e vômitos. O tratamento não é prolongado e o período a que o paciente é submetido varia de acordo com a dose do fármaco a ser administrada (BENDESKY e MENÉDEZ, 2001).

Metronidazol também é conhecido por atravessar a barreira placentária e a Food and Drug Administration (FDA) classificou este medicamento como um fator de risco classe B para gravidez (COUSTAN, 1999). Além disso, é conhecido por ser mutagênico em bactérias e carcinogênico em roedores, tornando-se uma preocupação em relação à teratogenicidade (CONNOR, et al., 1977; CANTELLI-FORTI et al., 1983; BENDESKY et al., 2002).

3.5 Drogas emergentes e promissoras na quimioterapia de protozoários parasitos

A procura por drogas que inibam o crescimento e a proliferação de parasitos tem aumentado a cada dia. Alguns compostos vêm sendo desenvolvidos para atingir partes da estrutura ou o metabolismo de determinado parasito, a fim de se tornar viáveis para o tratamento das doenças parasitárias. Além disso, vários compostos utilizados para outro fim vêm sendo investigados devido às descobertas realizadas sobre sua ação em determinados protozoários, o que desencadeou testes em parasitos semelhantes.

A miltefosina (1-*O*-hexadecilfosfocolina) é uma alquilfosfocolina, sintetizada no final de 1980. Foi originalmente desenvolvida para o tratamento de tumores sistêmicos, mas apresentou efeito apenas em tumores tópicos (HILGARD et al., 1993; LEONARD et al., 2001). Os alvos moleculares estão localizados primeiramente nas membranas celulares, a seletividade pela membrana plasmática se deve à sua estrutura química formada por uma cabeça colina polar e uma cadeia longa hidrocarbônica apolar, apresentando propriedades detergentes que levam à

lise celular em altas concentrações. O exato mecanismo de ação da miltefosina é desconhecido. Em culturas celulares de mamíferos, os efeitos estão na transdução de sinal, metabolismo de lipídios e homeostase de cálcio (RAKOTOMANGA ET AL., 2007).

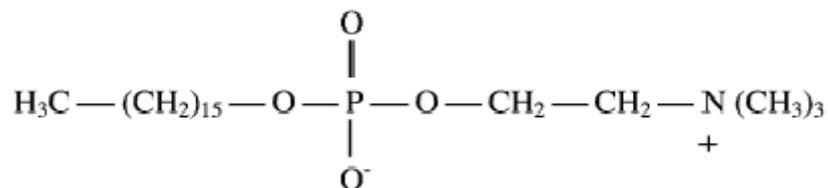


Figura 8: Estrutura química da miltefosina.

Esta droga foi testada em espécies de *Leishmania* e foi provado seu efetivo tratamento por via oral contra leishmaniose visceral em humanos (SUNDAR et al., 1998; JHA et al., 1999; PEARSON, 2003).

As atividades da miltefosina contra leishmaniose foram associadas com inibição da síntese de fosfolipídios e a biossíntese de fosfolipídios alquil-ancorados e glicoproteínas (LUX et al., 2000; LIRA et al., 2001; CROFT et al., 2003). O mecanismo de ação ainda não foi determinado, mas alguns trabalhos mostraram que a miltefosina induz a fragmentação de DNA oligonucleossomal, levando à apoptose (VERMA e DEY, 2004).

Há também uma classe de drogas herbicidas consideradas promissoras para o tratamento com protozoários. A orizalina (3,5-dinitro-N⁴-N⁴-dipropilsulfanilamida), uma dinitroanilina, é um potente herbicida amplamente usado, sendo bastante tóxico tanto em monocotiledôneas quanto dicotiledôneas. (PARKA e

SOPER, 1977; CORBETT et al., 1984). Inibe a divisão celular nas células das raízes e estes efeitos são relacionados à despolimerização dos microtúbulos (BASKIN, et al., 2004). Embora os mecanismos de indução de despolimerização de microtúbulos não sejam elucidados, orizalina quando vinculada à tubulina impede a polimerização de microtúbulos *in vitro* (MOREJOHN, et al., 1987).

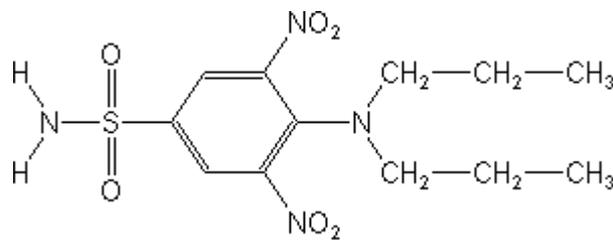


Figura 9: Estrutura química da orizalina.

Evidências mostraram que esta droga é efetiva contra certos protozoários, incluindo espécies de *Leishmania sp*, *Trypanossoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum* (CHAN et al., 1991; NATH e SCHNEIDER, 1992; CHAN, 1993; ARROWOOD et al., 1996; STOKKERMANS et al., 1996). Possui baixa toxicidade em animais e fungos porque não se liga às subunidades de α -tubulina dos microtúbulos nestes organismos, porém evidências mostraram que esta droga se liga às tubulinas de protozoários, podendo ser útil no tratamento das infecções causadas por eles (MORISSETTE, et al., 2004). A tubulina é uma proteína essencial para todos os organismos eucarióticos e assim alvo para quimioterapia de muitas doenças. Fármacos que interagem com a tubulina já são disponíveis para o tratamento do câncer e infecções por helmintos (MITRA e SEPT, 2006).

Um grupo de pesquisadores da Grécia chefiado pela Dr^a. Theodora Callogeropoulou (National Hellenic Research Foundation) sintetizou recentemente um composto que combina dois grupos farmacofóricos: a miltefosina (alquilfosfocolina) com a trifluralina, (dinitroanilina) denominado TC95. Este composto ainda não possui patente, por isso sua estrutura química ainda não foi mostrada.

O composto TC95 foi primeiramente testado em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, exibindo profunda alteração na membrana flagelar. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que a mitocôndria é a principal organela afetada durante o tratamento, pois sofre perda do conteúdo da matriz mitocondrial. Além disso, alterações na membrana flagelar, no complexo de Golgi, aumento do número de corpos lipídicos e aparência de estruturas normalmente encontradas em processos de autofagia também foram observados (GODINHO et al., 2009).

Devido ao aumento dos casos de resistência nos protozoários, bem como efeitos colaterais dos medicamentos e escassez de novos testes com outras drogas, há uma necessidade de novos fármacos para substituir os primeiros desenvolvidos que são utilizados há muitos anos.

3.6 Objetivos

3.6.1 OBJETIVO GERAL

Testar *in vitro* os três compostos: miltefosina, orizalina e TC95 em *Entamoeba histolytica* observando e comparando seus efeitos com o metronidazol.

3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar os efeitos acarretados pelo tratamento com miltefosina, uma inibidora de fosfolípidios, no crescimento das culturas de *Entamoeba histolytica*;
2. Verificar os efeitos causados na proliferação das culturas do protozoário tratadas com orizalina, que afeta os microtúbulos e a divisão celular;
3. Testar o composto TC95, que combina um alquilfosfolípido (miltefosina) com uma dinitroanilina (trifluralina) e verificar seu efeito na proliferação dos trofozoítos.
4. Avaliar se o efeito causado depende do tempo e/ou da concentração utilizada;
5. Comparar os resultados das diferentes drogas.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos com as drogas foram realizados no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, com a colaboração do Prof. Dr. Edward Félix da Silva. As drogas foram gentilmente cedidas pela Prof. Dra. Juliany Cola Fernandes Rodrigues, do Instituto de Biofísica, da UFRJ.

4.1 Cultura de células

A cepa HM1:IMSS foi utilizada para os ensaios. Trofozoítos de *E. histolytica* foram cultivados axenicamente em meio YI-S-32, suplementado com 20% de soro bovino adulto inativado e 3% de vitamina 107 Tween 80 e antibióticos (estreptomicina e penicilina). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C por 24 horas do momento do inóculo até o próximo repique. Repiques duas vezes por semana garantiam a manutenção da cultura.

4.2 Curvas de crescimento

As células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio de cultura para a contagem do inóculo inicial das curvas, o qual foi de 5×10^4 de trofozoítos por ml. A estimativa do número de células foi feita utilizando-se câmara

de Neubauer para contagem em microscópio óptico para observação (objetiva de 40 vezes).

Para determinação da fase logarítmica e platô do crescimento, uma curva de crescimento foi estabelecida de 4 a 192 horas após inóculo inicial, com intervalos de 2 (4-12 h), 12 (12-24 h) e 24 h (48-192 h) entre as contagens. Os pontos da curva foram definidos em duplicata. Uma curva em “U” invertido foi ajustada aos dados para determinação do início e final do platô, onde:

$$Amplitude_1 = Plato_1 - Depressao$$

$$Amplitude_2 = Plato_2 - Depressao$$

$$S_1 = \frac{Amplitude_1}{(1 + 10^{t_{501}-X}) \times nH_1}$$

$$S_2 = \frac{Amplitude_2}{(1 + 10^{t_{502}-X}) \times nH_2}$$

$$y = Depressao + S_1 + S_2$$

Nessas equações, Platô₁ e Platô₂ representam os platôs das porções esquerda e direita da curva, Depressão representa o nível do platô no mcentro da curva, t_{501} e t_{502} representam o tempo em que ocorre metade da proliferação e da queda, e nH_1 e nH_2 representam fatores de inclinação da curva (inclinação de Hill).

As drogas e os controles com metronidazol e DMSO (0,01%), diluente da miltefosina, orizalina e metronidazol, e DMSO-Etanol, diluente da TC95, foram adicionados no início da fase logarítmica do crescimento, para que seus efeitos

fossem acompanhados em uma cultura já estabilizada após a fase de adaptação ao meio.

As amostras para contagem foram coletadas incubando-se os tubos de ensaio no gelo por 15 minutos para que as células aderidas à parede do tubo se desprendessem. Os tubos foram então delicadamente vertidos 10 vezes para o completo desprendimento e, em seguida, contados na Câmara de Neubauer. Para contagem, foi feita uma diluição em eosina 0,025%, para indicar a viabilidade da célula, dado que as células coradas não são viáveis (KUENEN e SWELLENGREBEL, 1913).

A câmara de Neubauer (Figura 10) é uma lâmina retangular de vidro espesso, contendo dois retículos na porção central, separados longitudinalmente por um sulco profundo na lâmina. É dividida em quadrantes A, B e C de dimensões conhecidas. O quadrante A, que possui 4 quadrados com 16 quadrados menores em cada um, foi utilizado na contagem das células de *E. histolytica* pois é usado para contagens de células maiores. Este quadrante possui $0,1 \text{ mm}^3$ de volume, portanto os quatro quadrados, $0,4 \text{ mm}^3$. O número médio de células está contido em um volume igual a $0,004 \text{ cm}^3$, dividindo por 4, têm-se $0,001 \text{ cm}^3$ (1 ml). Então, o número de células contadas foi expresso em cada 1ml de suspensão. Este número foi multiplicado pelo número de diluições (1:10, multiplica por 10) e também, multiplicado por 2500 que é o fator de correção (LUCARINI et al., 2003).

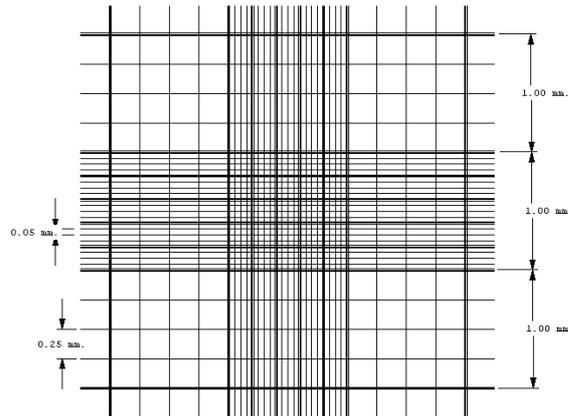


Figura 10: Câmara de Neubauer; os quadrados maiores representam o quadrante A, utilizado para contagem de *E. histolytica* (LUCARINI et al., 2003).

4.3 Análise estatística

Os experimentos foram feitos em duplicata e repetidos ao menos três vezes, com n de 300.000 células por tubo de cultura. O efeito das repetições foi analisado por análises de variância (ANOVA) de uma via, que demonstrou não haver diferença entre os experimentos (Apêndice); dessa forma, os resultados das diferentes repetições foram agrupados para as análises posteriores. Os dados foram expressos em média \pm erro-padrão e analisados utilizando análises de variância de duas vias (droga ou dose \times tempo), seguida de pós-testes de Tukey quando apropriado, mostrando onde há diferença. P-valores abaixo de 0,05 foram considerados significativos. As análises foram feitas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc.).

Para cálculo da magnitude do efeito, o \hat{f}^2 de Cohen (NAKAGAWA; CUTHILL, 2007) foi calculado a partir da fórmula

$$\hat{f}^2 = \sqrt{\left(\frac{gl_{efeito}}{N} \right) \times (F_{efeito} - 1)},$$

onde gl_{efeito} refere-se aos graus de liberdade relativos ao tratamento, N refere-se ao número total de pontos, e F_{efeito} refere-se à estatística de teste da ANOVA.

5 - RESULTADOS

Primeiramente foi traçada uma curva de crescimento da cultura do protozoário. A equação de curva em “U” invertido apresentou bom ajuste aos dados da curva de crescimento ($r^2 = 0,9818$, $\text{platô}_1 = 89795$, $\text{platô}_2 = -363000$, $\text{depressão} = -1719000$, $nH_1 = 0,01168$, $nH_2 = 0,04491$; Figura 11).

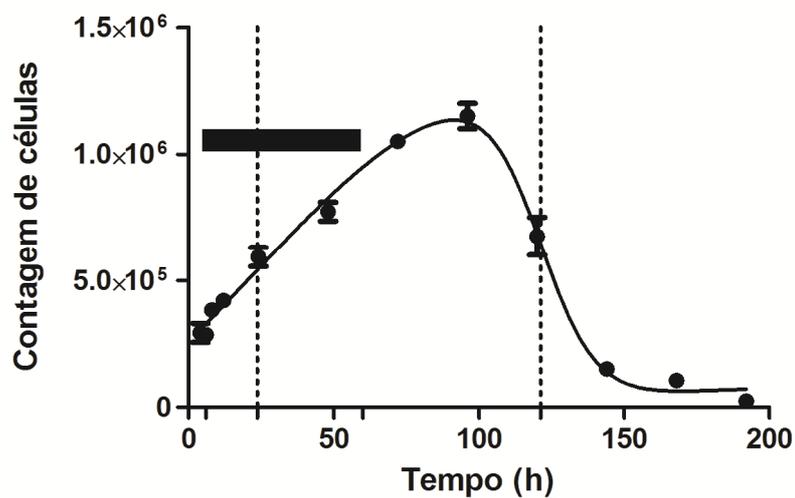


Figura 11: Curva de crescimento de *Entamoeba histolytica*.

A partir dessa curva, foi estabelecido que o período logarítmico de crescimento estava entre 23,7 a 121,3 horas. O período de 6 a 60 horas foi escolhido para a administração das drogas e avaliação dos seus efeitos, correspondendo ao final da fase lag e início da fase log de crescimento.

O metronidazol resultou em inibição concentração- ($F_{[3, 136]} = 15,86$, $p < 0,0001$, $d = 1,3284$) e tempo-dependente ($F_{[4, 136]} = 98,62$, $p < 0,0001$) da proliferação dos protozoários em cultura (Figura 12). A concentração de $5\mu\text{M}$ inibiu o crescimento em 36 e 48 horas ($p < 0,05$, vs. DMSO e meio de cultura), e a concentração de $10\mu\text{M}$ produziu efeito de maior magnitude a partir de 24 horas ($p < 0,05$, vs. DMSO e meio de cultura). Nos dois últimos tempos (48 e 60 horas), foi observada diferença no número de células após cada tratamento ($p < 0,05$), com grande redução na proliferação celular após o tratamento com $10\mu\text{M}$ em relação ao tratamento com $5\mu\text{M}$.

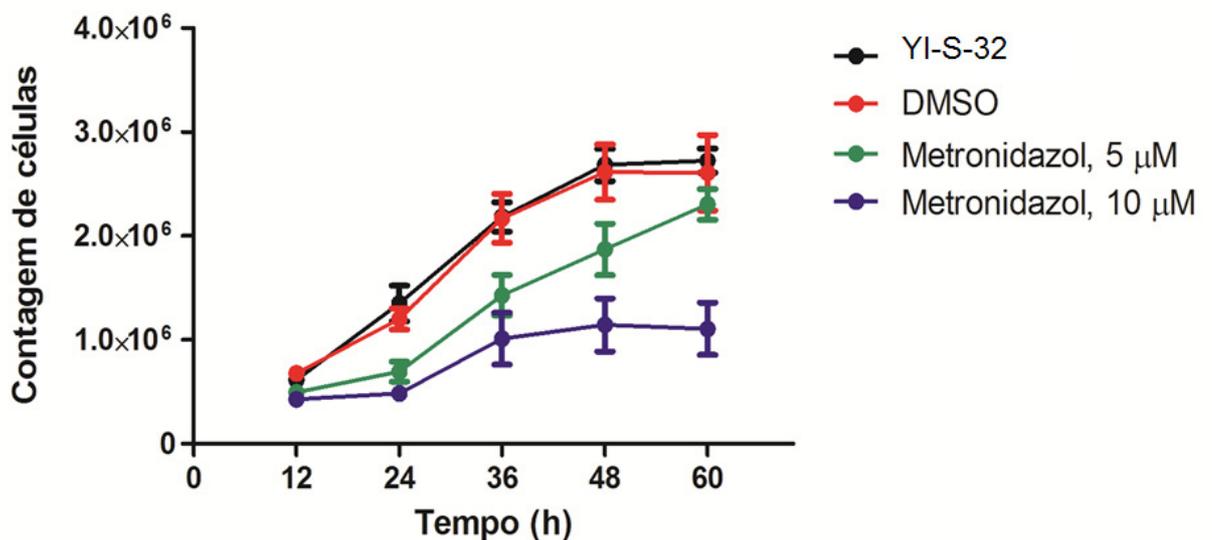


Figura 12: Tratamento com metronidazol comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$)

A miltefosina apresentou um perfil concentração-resposta ($F_{[3, 104]} = 11,28$, $p < 0,0001$, $d = 1,1266$) e tempo-resposta ($F_{[4, 104]} = 119,2$, $p < 0,0001$) bastante similar ao do metronidazol (Figura 13). Em ambas as concentrações, a miltefosina inibiu o crescimento em 48 e 60 horas ($p < 0,05$) e a maior concentração inibiu o crescimento também em 36 horas.

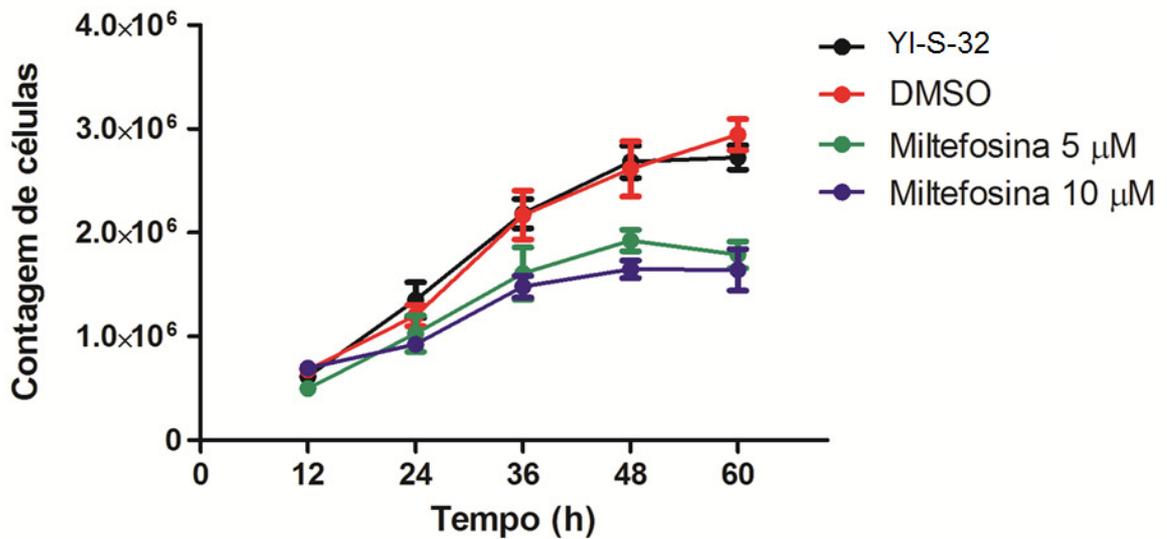


Figura 13: Tratamento com miltefosina comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5µM e 10µM)

A orizalina não apresentou efeito sobre o crescimento da cultura em ambas as concentrações ($F_{[3, 104]} = 0,7105$, $p = 0,5545$, $d = 0$; Figura 14).

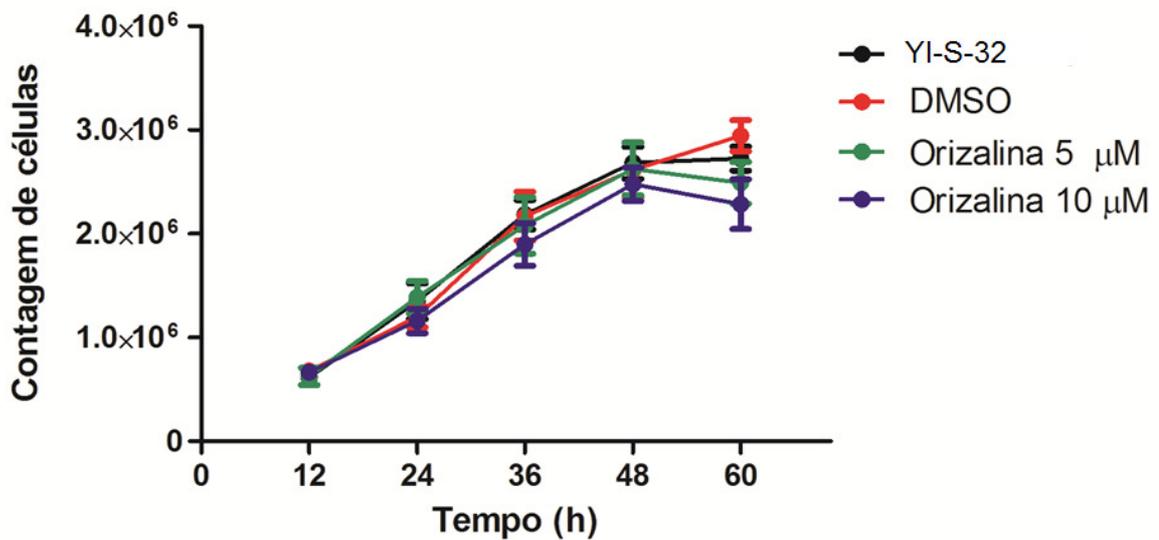


Figura 14: Tratamento com orizalina comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5µM e 10µM).

O TC95 apresentou efeito concentração- ($F_{[3, 48]} = 50,24, p < 0,0001, d = 3,5355$) e tempo-dependente ($F_{[4, 28]} = 208,9, p < 0,0001$; Figura 15). Na concentração de 5µM, a droga inibiu a proliferação em 36 e 48 h ($p < 0,01$, vs. DMSO:Etanol) e 24, 36 e 48 h ($p < 0,001$, vs. meio de cultura). Na concentração de 10 µM, a droga apresentou efeitos nos mesmos intervalos. Ressaltamos que o decaimento no efeito após 60 h provavelmente se deve ao efeito citotóxico do solvente, que diminuiu o número de células na cultura em 48 e 60 h ($p < 0,05$, vs. meio de cultura).

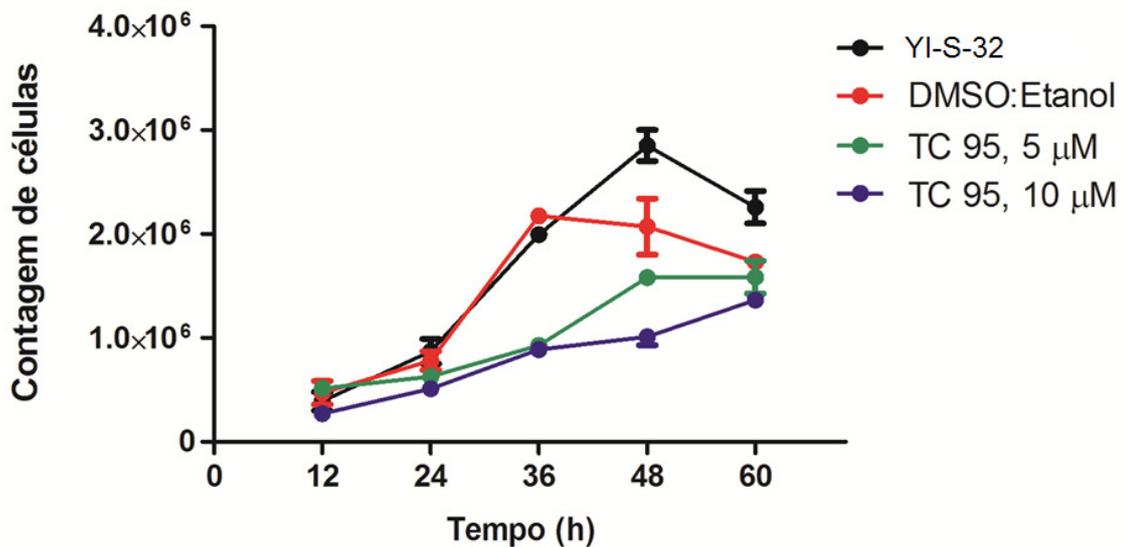


Figura 15: Tratamento com TC95 comparado aos controles de *E. histolytica* e DMSO (concentrações de 5µM e 10µM).

Foi feita uma comparação de todos os tratamentos utilizados, conforme figuras 16 e 17. Na figura 16, utilizando concentração de 5µM, nota-se que em 24 horas há diferença significativa no tratamento com metronidazol e TC95, comparado com o controle de *E. histolytica* e também uma diferença entre orizalina e TC95. Em 36 horas, nota-se profunda diferença entre TC95 e os controles do protozoário e DMSO. Também há essa diferença no tratamento com metronidazol. Orizalina apresenta diferença significativa em relação ao TC95. Em 48 horas, as drogas citadas anteriormente apresentam comportamento semelhante aos outros tempos, além disso, a miltefosina aparece com diferença significativa em relação aos dois controles. No tempo de 60 horas esta droga também apresenta diferença em relação aos controles.

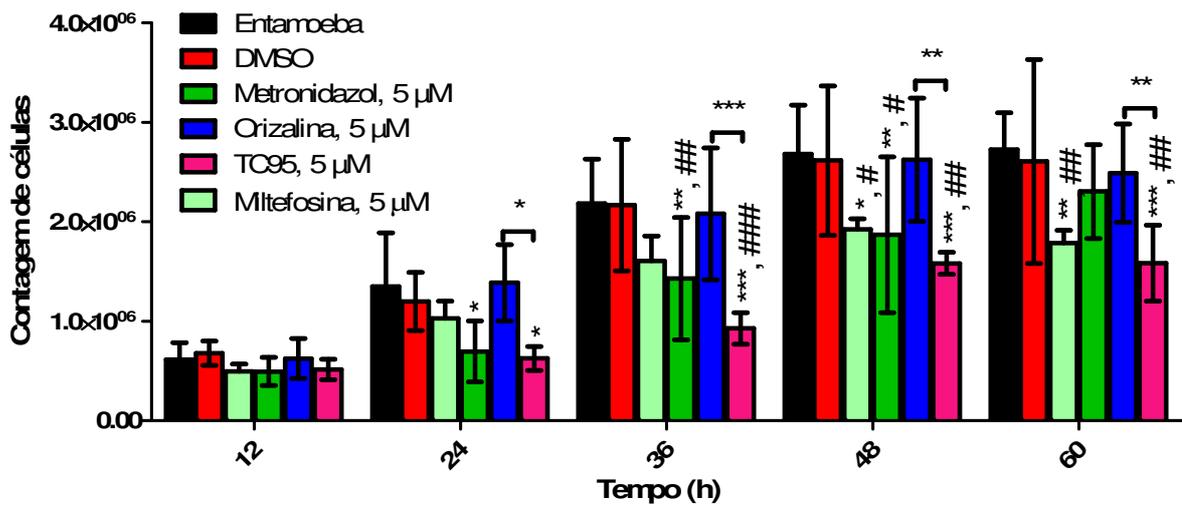


Figura 16: Comparação dos tratamentos utilizando concentração de 5µM.

Na figura 17, utilizando concentração de 10µM, nota-se que em 36 horas, nota-se profunda diferença entre TC95 e os controles do protozoário e DMSO. Também há essa diferença no tratamento com metronidazol. Orizalina apresenta diferença significativa em relação ao TC95. Em 48 horas, as drogas citadas anteriormente apresentam comportamento semelhante aos outros tempos, além disso, a miltefosina aparece com diferença significativa em relação à orizalina. No tempo de 60 horas apenas a droga TC95 apresenta diferença significativa em relação aos controles.

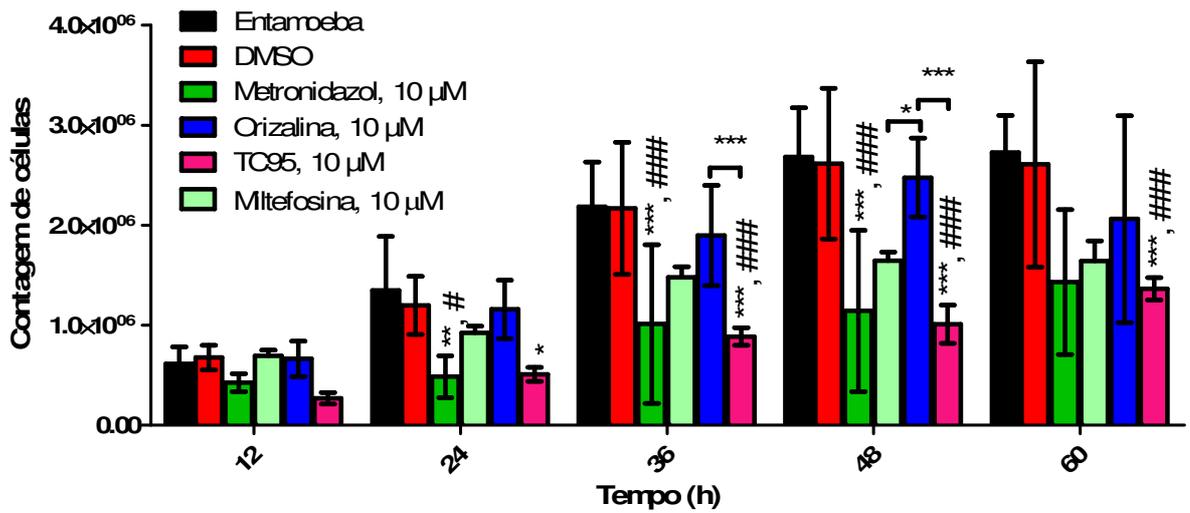


Figura 17: Comparação dos tratamentos utilizando concentração de 10μM.

Na tabela 1 foi calculado o f de Cohen, uma transformação estatística do teste ANOVA que indica o tamanho do efeito causado pela droga em todos os tempos utilizados nos testes. Em linhas gerais, o TC95 foi mais efetivo do que o metronidazol e a miltefosina, a miltefosina foi a droga menos efetiva e a orizalina não apresentou efeito.

Tabela 1: Efeito de metronidazol, miltefosina, orizalina e TC95 em *E. histolytica*

Droga	Tamanho do efeito (f de Cohen)
Metronidazol	1,3284
Miltefosina	1,1266
Orizalina	0
TC95	3,5355

6 – DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que a droga TC95 produziu maior inibição na proliferação da cultura de *E. histolytica*, seguida do controle com metronidazol. A miltefosina apresentou pouca inibição do crescimento e a orizalina não demonstrou efeito.

O metronidazol apresentou efeito inibitório nas culturas do protozoário, reafirmando seu potencial amebicida já evidenciado; estes resultados servem como controle de qualidade em nosso trabalho.

Conforme dados apresentados, a orizalina não promoveu efeito na cultura de *E. histolytica*. Esta droga inibe o crescimento, diferenciação e a polimerização de microtúbulos em protozoários, sendo ineficaz contra tubulinas de mamíferos e fungos. Morrissette et. al (2004), testaram orizalina em *Toxoplasma gondii* e mostraram que mutações induzidas no gene que codifica α -tubulina conferem resistência a orizalina nos parasitos que foram selecionados em concentrações que afetam microtúbulos do fuso mitótico, mas não naqueles selecionados em concentrações que afetam somente os microtúbulos citoplasmáticos. *E. histolytica* apresenta apenas microtúbulos no fuso mitótico, o que sugere que a resistência desta espécie se deve a estrutura e função da α -tubulina nesses microtúbulos.

Makioka et. al (2002), realizaram estudos para observar trofozoítos durante o processo de divisão celular e demonstraram que 63% dos trofozoítos tratados com orizalina não completavam sua divisão celular, este processo era interrompido na fase de prófase da mitose. Stokkermans, et. al.(1996),

demonstraram que *Toxoplasma gondii* também é afetado pela orizalina na mitose. Makioka et. al (2000), testaram orizalina, trifluralina e colchicina em *E. histolytica* e mostraram que concentrações de até 10 μ M de orizalina não apresentaram efeitos. Para haver inibição, foi necessário concentrações entre 30 e 100 μ M. Em relação à trifluralina (presente no TC95), são necessários 300 μ M para haver inibição e a colchicina, 500 μ M. Colchicina é um agente classicamente utilizado na inibição de microtúbulos em células animais; a alta concentração necessária para inibir a proliferação em *E. histolytica* sugere que agentes que desestabilizam microtúbulos em animais são pouco efetivos em protozoários.

O fato da orizalina não inibir o crescimento também pode estar relacionado com as concentrações utilizadas. No presente trabalho, as concentrações foram muito mais baixas do que as utilizadas no trabalho de Makioka et. al., (2000). Entretanto, em nossos resultados, as mesmas concentrações de miltefosina produziram um efeito na proliferação do protozário. A concentração de miltefosina para inibir 50% da cultura, em 24 e 48 horas, é de 124 μ M e 83 μ M, respectivamente (SEIFERT et.al., 2001). Os resultados do presente trabalho mostram que mesmo utilizando baixas concentrações, esta droga possui certa atividade na cultura de *E. histolytica* (36, 48 e 60 horas).

Seifert et.al (2001) e Walochnik et. al (2002), testando miltefosina em *Entamoeba histolytica* e *Acanthamoeba* mostraram que houve claramente uma ruptura na membrana destes protozoários quando tratados com altas concentrações, sugerindo que a membrana seja o alvo nestes organismos, tal como em tripanossomatídeos e células cancerígenas, mas o conhecimento dos mecanismos de ação das alquilfosfocolinas em amebas é limitado. Os mecanismos envolvidos na

biossíntese de esteróis e fosfolípidios em *E. histolytica* são pouco elucidados, indicando apenas que existem alguns genes que codificam a formação destas estruturas mas ainda não foi possível identificar se estas vias são completas (CLARK et. al., 2007).

O TC95 foi o composto que obteve maior efeito na proliferação dos trofozoítos de *E. histolytica*, sendo a inibição tempo-dependente em ambas concentrações (5 e 10 μ M), nos tempos de 24, 36 e 48 horas. Esta droga possui uma molécula de trifluralina ligada quimicamente a uma cadeia alquilfosfocolina, provavelmente indicando que o maior efeito pode estar relacionado aos dois pontos farmacofóricos distintos combinados numa única molécula.

O primeiro teste deste composto foi realizado por Godinho, (2010), em amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Esta autora comparou seus resultados com os testes que também realizou com miltefosina, orizalina e trifluralina. TC95 foi o composto que obteve os melhores resultados na inibição do crescimento deste protozoário em ambas as formas. Houve uma redução das células de forma concentração-dependente (1-5 μ M em 24, 48 e 72 horas). Em amastigotas, utilizou as concentrações de 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M (24 e 48 horas), concluindo que as concentrações de 5 e 10 μ M foram marcadamente inibitórias. Godinho, (2010), também avaliou a integridade da membrana observando que, em 48 horas, nas concentrações de 3 μ M e 4 μ M, observaram alterações significativas na integridade da membrana plasmática. Com apenas 3 μ M as promastigotas já se apresentaram alteradas, com corpo celular mais arredondado, possuindo dois ou mais núcleos e cinetoplastos, além de apresentarem o citoesqueleto de aspecto descontínuo e frouxo. Houve também acúmulo de lipídios nestas promastigotas (1,

2, 3 e 4 μ M em 24 e 48 horas) e utilizando microscopia eletrônica de transmissão, houve alterações intensas na mitocôndria, também utilizando 3 e 4 μ M do TC95, além de modificações no retículo endoplasmático e complexo de Golgi. A autora concluiu que em promastigotas o TC95 inibe a proliferação celular e altera a morfologia e dinâmica da divisão celular.

Em comparação ao trabalho de Godinho (2010), podemos perceber que o TC95 é marcadamente inibitório também em *Entamoeba histolytica*. Porém, os mecanismos envolvidos nesta inibição não estão muito claros, já que as estruturas modificadas em *Leishmania amazonensis* não estão presentes na célula amebiana.

Esta autora observou também um acúmulo de lipídios no citoplasma semelhantes a figuras de mielina, sugerindo um efeito sobre o mecanismo do metabolismo de fosfolipídios de membrana; esse efeito é esperado devido ao TC95 possuir uma porção análoga à miltefosina. No presente trabalho e no trabalho de Seifert et.al. (2001), a miltefosina apresentou efeito em amebas, o que pode explicar a inibição causada pelo TC95 em *E.histolytica*.

Além disso, também foi observado por Godinho (2010), que o TC95 produz alterações na divisão celular. Em *E. histolytica*, a orizalina, (mesma classe farmacológica da trifluralina, composto presente no TC95) não produziu um efeito, mas pode ser que tenha havido pequeno efeito na divisão celular mas não foi detectado na proliferação da cultura. A inibição causada pelo TC95 pode estar relacionada ao efeito conjunto dos dois grupos farmacofóricos presentes em sua molécula.

7 – CONCLUSÃO

A orizalina não apresentou inibição na proliferação dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, mas isto não indica que ela não tenha interferido na divisão celular do protozoário.

A miltefosina apresentou um efeito, embora pequeno, no número de células de *Entamoeba histolytica*.

O TC95 apresentou o melhor efeito na inibição da proliferação das culturas, provavelmente por apresentar dois grupos farmacofóricos numa mesma molécula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARGÜELLO, C., VALENZUELA, B., RANGEL, E. Structural organization of chromatin during the cell cycle of *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Arch Med Res**, v.23, p. 77–80, 1992.

ARROWOOD, M.J., MEAD, J.R., XIE, L.T., YOU, X. In vitro anti-cryptosporidal activity of dinitroaniline herbicides. **FEMS Microbial Lett**, p. 245-249, 1996.

BAKKER-GRUNWALD, T., MARTIN, J.B., KLEIN, G. Characterization of glycogen and amino acid pool of *Entamoeba histolytica* by C13-NMR spectroscopy. **J. Eukaryot. Microbiol**, v. 42, p. 346–349, 1995.

BANSAL, D., BHATTI, H.S., SEHGAL, R. Role of cholesterol in parasitic infections. **Lipids in Health and Disease**, v. 4, p.10, 2005.

BASKIN, T.I., BEEMSTER, G.T.S., JUDY-MARCH, M.F. Disorganization of cortical microtubules stimulates tangential expansion and reduces the uniformity of cellulose microfibril alignment among cells in the root of Arabidopsis. **Plant Physiol**, v. 135, p. 2279–2290, 2004.

BASSILY, S.L., et al. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. **J. Trop. Med. Hyg**, v. 90, p. 9-12, 1987.

BAILEY, G.B. GILMOUR, J.R., McCOOMER, N.E. Roles of target cell membrane carbohydrate and lipid in *Entamoeba histolytica* interaction with mammalian cells. **Infect. Immun.** v. 58, p. 2389–2391, 1990.

BENDESKY, A., MENÉNDEZ, D. Metronidazol: una visión integral. **Rev. Fac. Méd. UNAM**, México, vol. 44, n. 6, 2001.

BENDESKY, A., MENENDEZ D., OSTROSKY-WEGMAN P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat. Res**, v. 511, p.133–144, 2002.

BOECK, W.C., DRBOHLAV, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Broc. Natl. Acad**, USA, v. 11, n. 5, p. 235-238, 1925.

BRACHA, R., et al. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. **Mol Microbiol**, v. 34, p. 463-472, 1999.

BRUMPT, E. Etude sommaire de l'Entamoeba dispar n.sp. amibe akkystes quadrinuclees, parasite de l'homme. **Bull.Acad. Méd**, Paris, v. 94, p. 942-952, 1925.

BURCHARD, G.D., BILKE, R. Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. **Parasitol. Res.** v.78, 146–153, 1992.

CALALB, M.B., et al. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src kinases. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 954-63, 1995.

CANTELLI-FORTI, G., et al. Mutagenicity of a series of 25 nitroimidazoles and two nitrothiazoles in *Salmonella typhimurium*. **Teratog. Carcinog. Mutagen**, v. 3, p. 51–63, 1983.

CDC: Center for Disease Control
http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Amebiasis_il.htm

CHADEE, K., et al. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **J Clin Invest**, v. 80, n. 5, p. 1245-54, 1987.

CHAN, M.M-Y., et al. Herbicides to curb human parasitic infections: in vitro and in vivo effects of trifluralin on the trypanossomatid protozoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.90 p. 5657-5661, 1993.

CHAN, M.M-Y., TREMER, R.E., FONG, D. Effect of the antimicrotubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania maexicana*. **Differentiation**, v. 46, p. 15-21, 1991.

CLARK, C.G., et al. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. **Advances in Parasitology**, v. 65, 2007.

CONNOR, T.H., et al. The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice. **Cancer Res**, v. 37, p. 629–633, 1977.

CORBETT, J.R., WHRIGHT, K., BAILLIE, A.C. The biochemical mode of action of pesticides. **Academic Press**, 2nd edition, Londres, 1984.

COUNCILMAN, W.T., LAFLEUR, H.A. **Bull. Johns Hopkins Hosp. Rept 2**, p. 395-548, 1891.

COX, F.E.G. History of human parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 595-612, 2002.

CRAIG, C.F. The classification of the paratitic amebae of man. **Southern Medical Journal**, v. 10, p. 396, 1917.

COSBY, A.W. Ecological imperialism: The biological expansion of Europe, 900-1900. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

CROFT, S.L., SEIFERT, K., DUCHENE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Mol. Biochem. Parasitol**, v.126, p. 165–172, 2003.

CUDMORE, S.L., et al. Treatment of infections caused by metronidazole resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 17, p. 783–793, 2004.

CUNNINGHAM C.C., et al. Requirement for actin-binding proteins for cortical stability and efficient locomotion. **Science**, v. 255, p. 325–327, 1992.

DAS, S., et al. Lipid metabolism in mucous-dwelling amitochondriate protozoa. **Int. J. Parasitol**, v. 32, p. 655–675, 2002.

DIAMOND, L.S., CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walder, 1911) Separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **J Euk Microbiol**, v. 40, p. 340-344, 1993.

DOBELL, C. The amoeba living in man, **John Bale**, London, 1919.

EDWARDS, D.I. Nitroimidazole drugs – action and resistance mechanisms. Mechanisms of action. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 31, p. 9-20, 1993.

FACMED (Departamento de Microbiologia e Parasitologia)
http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/protozoos/generalidade_s.php

FREITAS, M.A.R. **Caracterização de cepas de Entamoeba histolytica isoladas de diferentes casos clínicos no brasil: análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a patogenicidade**. Belo Horizonte, 2007. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Parasitologia) – Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007. 104p.

GODINHO, J.L.P. **Avaliação dos efeitos dos análogos de fosfolipídios e dinitroanilinas em Leishmania amazonensis: estudos in vitro e in vivo**. Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Biofísica) - Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010. 139p.

GODINHO, J.L.P., et al. Contribution of electron microscopy to elucidate the mechanisms of action of drugs in the experimental chemotherapy of Leishmaniasis. **Acta Microscopica**, v. 18 (3), 2009.

GRUNLER, J., ERICSSON, J., DALLNER, G. Branch-point reactions in the biosynthesis of cholesterol, dolichol, ubiquinone and prenylated proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1212, p. 259–277, 1994.

GUERRANT, R. L., et al. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. **J. Infect. Dis**, v.143, 83–93, 1981.

HAQUE, R., et al. Amebiasis. **N. Engl. J. Med.** V. 348, p.1565-1573, 2003.

HILGARD, P., et al. Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents. **Cancer Chemother. Pharmacol**, v. 32, p. 90–95, 1993.

HOARE, C.A. Considerations sur l'étiologie de l'amibiase d'après le rapport hôte-Parasite. **Bull Soc. Pathol. Exot**, v. 54, p. 429-441, 1961.

HUNTER, W.N., et al. Structure and reactivity in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. **Biochem. Soc. Trans**, v. 31, p. 537–542, 2003.

JHA, T.K., et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med**, v. 341, p.1795–1800, 1999.

KNIGHT, R. The chemotherapy of amoebiasis. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 6, p. 577–593, 1980.

KUENEN, W.A., SWELLENGREBEL, N.H., Die entamoben des menschen und ihre praktische bedeutung. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 71, p. 378-410, 1913.

LABAT, R. A propos de la chirurgie Babylonienne. *J. Asiatique*, v. 242, p. 107-208, 1954.

LAFLAMME, S.E., AUER, K.L. Integrin signaling. **Seminars in Cancer Biology**, v. 7, n. 3, p. 111-8, 1996.

LAMBL, V. Microscopische untersuchungen der darmexcrete. Beitrag zur pathologisches des darmes und zur diagnostik am krankenbette. **Viert. Prakt. Heilkd** (Prague), v. 61, p.1-57, 1859.

LAU, A.H.N., et al. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole antiinfectives. **Clin. Pharmacokinet**, v. 23, p. 328-364, 1992.

LAUGHLIN, R.C., TEMESVARI, L.A. Cellular and molecular mechanisms that underlie *Entamoeba histolytica* pathogenesis: prospects for intervention. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 7 p. 13-18, 2005.

LEIPPE, M., et al. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. **Mol Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 895-904, 1994.

LEIPPE, M., et al. Primary and secondary structure of the pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **EMBO J**, v. 11, n. 10, p. 3501-6, 1992.

LEONARD, R., et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J. Clin. Oncol*, v. 19, p. 4150-4159, 2001.

LEVINE, N.D. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. **J. Parasitol**, v.66, p. 830-834, 1980.

LIRA, R., et al. Mechanism of action of antiproliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **J. Antimicrob. Chemother.** v.47, p. 537–546, 2001.

LÖSCH, F. Massenhafte entwicklung von amoeben im dickdarm. **Virchows Archiv klinische Medizin**, v. 65, p.196-211, 1875.

LUCARINI, A.C., DA SILVA, A.L., BIANCHI, R.A.C. Um sistema para contagem semi-automática de microrganismos. **Pesquisa e Tecnologia Fei**, n. 26, 2003.

LUX, H., et al. Etherlipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of etherlipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 111, p.1–14, 2000.

MAKIOKA, A., et al. Inhibition of excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens* by the dinitroaniline herbicide oryzalin. **J. Parasitol.**, v.88(5), p. 994–999, 2002.

MAKIOKA, A., et al. Effect of dinitroaniline herbicides on the growth of *Entamoeba histolytica*. **J. Parasitol**, v. 86, p. 607-610, 2000.

MARTINEZ-PALOMO, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. **Research Studies Press**, Chiester, p. 161, 1982.

MARTINEZ-PALOMO, A. Biology of Amebiasis: Progress and Perspectives in the Biology of Parasitism. **Alan R. Liss**, New York, 1988.

MEZA, I., TALAMÁS-ROHANA, P., VARGAS, M.A. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function and regulation by signaling pathways. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 234-243, 2006.

MEZA, I. Extracellular matrix induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. **Parasitol Today**, v. 16, p. 23-28, 2000.

MITRA, A., SEPT, D. Binding and Interaction of Dinitroanilines with Apicomplexan and Kinetoplastid α -Tubulin. **Jounal of Medicinal Chemistry**, v.49, p. 5226-5231, 2006.

MOREJOHN, L.C., BUREAU, T.E., MOLÉ-BAJER, A., BAJER, A.S., FOSKET, D.E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. **Planta**, v. 172, p. 252–26, 1987.

MORRISSETTE, N.S., MITRA, A., SEPT, D., SIBLEY, L.D. Dinitroanilines bind α -tubulin to disrupt microtubules. **Mol Biol Cell**, v. 15, p. 1960–1968, 2004.

MÜLLER, M. Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. **Biochem. Pharmacol**, v. 35, p. 37-41, 1986.

MUÑOZ M.L., ROJKIND M., CALDERÓN J. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. **T. Exp. Med**, v. 155, p. 42-51, 1989.

NAKAGAWA, S., CUTHILL, I.C. Effect size, confidence interval and statistical significance: A practical guide for biologists. **Biol. Rev.** v. 82, p. 591-605, 2007.

NATH, J., SCHNEIDER, I. Anti-malarial effects of the anti-tubulin herbicide trifluralin studies in *Plasmodium falciparum*. **Clin Res**, v. 40, p. 331A, 1992.

NEVES, D.P. Amebíase: *Entamoeba histolytica/Entamoeba díspar*. In: _____ **Parasitologia Humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000, cap. 15, p. 127 - 138.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. “The world health report 1998. Life in the 21st century: A vision for all.” **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28- 29 January 1997. **Epidemiol Bull**, v. 18, p. 13-4, 1997.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Amoebiasis and its control. **Bull Who**, v. 63, p. 417-26, 1985.

PARKA, S.J., SOPER, O.F. The physiology and mode of action of the dinitroaniline herbicides. **Weed Sci**, v. 25, p. 79-87, 1977.

PETRI JUNIOR, W.A. Therapy of intestinal protozoa. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 523–526, 2003.

PEARSON, R.D. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Curr. Infect. Dis. Rep**, v. 5, p. 41–42, 2003.

PINHEIRO, A.A.S., et al. *Entamoeba histolytica*: An ecto-phosphatase activity regulated by oxidation–reduction reactions. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 352-358, 2007.

PLAXTON, W.C. Metabolic flexibility helps plants to survive stress. *Plant Physiology*, 4^a edition. Queen's University, Kingston, Ontario, may/2006.

PROWAZEK, S.W. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Entamöben. **Arch. Protistenk**, v. 26, p. 241-249, 1912.

QUE, X., REED, S.L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, p. 196-206, 2000.

QUINCKE, H.I. On amoebic enteritis En: Kean B H, Mott KE, Russell AJ, eds. **Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations**, London, Cornell University Press; v. 1, p. 103-109, 1978.

QUINCKE, H., ROSS, E.I. Über amöben-enteritis. **Berliner Klinische Wochenschrift**, v. 30, p. 1089-1094, 1983.

RAKOTOMANGA M., BLANC S., GAUDIN K., CHAMINADE P., LOISEAU P.M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 1425 – 1430, 2007.

RAVDIN J.I. *Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica*. **Churchill Livingstone**, New York, p. 126-149, 1988.

RAVDIN, J.I., et al.. Adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to rat and human colonic mucosa. **Infect Immun**, v. 48, n. 2, p. 292-7, 1985.

RAYMOND-DENISE, A., SANSONETTI, P., GUILLEN, N. Identification and characterization of a myosin heavy chain gene (mhcA) from the human pathogen *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59, p. 123–132, 1993.

REEVES, R.E. Metabolismo of *Entamoeba histolytica* Shaudinn 1903. **Adv. Parasitol**, v. 23, p. 105-142, 1984.

REYES L., LEÓN, R. Diferenciación de *Entamoeba histolytica/Entamoeba* dispar y los nuevos hallazgos en la patogénesis de la amibiasis intestinal. **Rev Costarric Cienc Med**, v. 23, p.161-73, 2002.

RODRIGUES J.C., et al. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a delta(24(25))-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 487-499, 2002.

ROGERS, L. Further experience of the specific curative action in amoebic disease of hypodermic injections of soluble salts of emetine. **Br. Med. J** 2, p. 405-408, 1912a.

ROGERS, L. The rapid cure of amoebic dysentery and hepatitis by hypodermic injections of soluble salts of emetine. **Br. Med. J** 1, p.1424-1425, 1912b.

ROHMER, M., et al. Isoprenoid biosynthesis in bacteria: A novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. **Biochem. J.** v. 295, p. 517–524, 1993.

ROLLINS, S.A., et al. Inhibition of homologous complement by CD59 is mediated by a species-specific recognition conferred through binding to C8 within C5b-8 or C9 within C5b-9. **J Immunol**, v. 146, n. 7, p. 2345-51, 1991.

ROSENBAUM, R.M., WITTNER, M. Ultrastructure of bacterized and axenic trophozoites of *Entamoeba histolytica* with particular reference to helical bodies. **J. Cell Biol.** v. 45, p. 367–382, 1970.

SAAVEDRA, E., OLIVOS, A., ENCALADA, R., MORENO-SANCHEZ, R. *Entamoeba histolytica*: Kinetic and molecular evidence of a previously unidentified pyruvate kinase. **Exp. Parasitol**, v.106, p.11–21, 2004.

SAAVEDRA-LIRA, E., PÉREZ-MONTFORT, R. Energy production in *Entamoeba histolytica*: new perspective in rational drug design. **Arch. Med. Res.** v 27, p. 257-264, 1996.

SANTOS, F.L., SOARES, N.M. Mecanismos fitopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada por *Entamoeba histolytica*. **Bras. Patol. Méd. Lab**, v. 44, n. 4, p. 249-261, 2008.

SARGEUNT P.G., WILLIAMS J.E., GRENE J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v. 72, p. 519-521, 1978.

SAWYER, M.K., et al. Lipids from *Entamoeba histolytica*. **Exp. Parasitol**, v. 20, p. 295- 302. 1967.

SEIFERT, K., et al. Effects of Miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, nº5, v. 45, p. 1505-1510, 2001.

SCHAUDINN, F. On the development of some Rhizopoda (Preliminary Report) **Tropical Medicine and Parasitology Classic Investigations**, 1 London, Cornell University Press; v. 1, p. 110-118, 1978.

SCHAUDINN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. **Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte**, v.19, p. 547–76, 1903.

SCHROEPFER JUNIOR, G.J. Sterol biosynthesis. **Annu. Rev. Biochem**, v. 50, p. 585–621, 1981.

SILVA, M.C., et al. Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belém, Pará, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection. **Cad Saúde Pública**, v. 21, p. 969-973, 2005.

STANLEY, S.L. Amoebiasis. **Lancet**, v. 361, p. 1025-1034, 2003.

STOKKERMANS, T.J.W., et al. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. **Experimental Parasitology**, v. 84, p. 355-370, 1996.

SUNDAR, S., et al. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. **Lancet**, v. 352, p. 1821–1823, 1998.

TAKEUCHI, T., WEINBACH, E.C., DIAMOND, L.S. *Entamoeba histolytica*: Localization and characterization of phosphorylase and particulate glycogen. **Exp. Parasitol**, v. 43, p. 107–114, 1977.

TOWNSON, S. M., et al. Resistance to nitroheterocyclic drugs. **Acta Trop.**, v. 56, p. 173-94, 1994.

TRACY, J.W., WEBSTER, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In J. G. Hardman and L. E. Limbird(ed.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 9th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, N.Y., p. 987-1008, 1996.

VÁSQUEZ, J., et al. Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 45, p. 32:37, 1995.

VERMA, N.K., DEY, R.S. Possible mechanism of miltefonisa-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.

WALKER, E.L., SELLARDS, A.W. Experimental entamoebic dysentery. **The Phillippine journal of Science, B. Tropical Medicine**, v. 8, p. 253-331, 1913.

WALOCHNIK J., et al. Cytotoxic activity of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrob Agents Chemother** v.46, p. 695–701, 2002.

WALSH, J.A. Amebiasis in the world. **Arch Invest Med (Mex)**, 17 Suppl 1, p.385-389, 1986.

WEBER, G., et. al. *Entamoeba histolytica* infections in flight personnel of an international airline. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 84, p.803–805, 1990.

APÊNDICE: Diferença entre experimentos.