



FIOCRUZ

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

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

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA E FUNCIONAL DE FOSFATASES  
ASSOCIADAS À VIRULÊNCIA EM TROFOZOÍTOS DE  
*Entamoeba histolytica***

**KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS FONSECA**

Salvador – Bahia – Brasil

2013

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

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

**AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA E FUNCIONAL DE FOSFATASES  
ASSOCIADAS À VIRULÊNCIA EM TROFOZOÍTOS DE  
*Entamoeba histolytica***

**KARLA GRAZIELA SANTANA DOS ANJOS FONSECA**

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Tese Apresentada ao Curso de Pós-Graduação de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, como Requisito para a Obtenção do Grau de Doutor(a).

Salvador – Bahia – Brasil

2013

*Dedico esta tese ao  
meu amado esposo Ricardo  
e aos meus queridos pais,  
Luiza Maria e Carlos Alberto.  
Que o amor seja sempre o  
cerne de nossas vidas!*

## **AGRADECIMENTOS**

---

### **À Deus**

Pela inegável presença em minha vida.

### **Ao meu esposo Ricardo**

Por caminhar comigo, todos estes anos. Com certeza a realização deste trabalho seria muito mais difícil sem o seu apoio irrestrito. Esta tese também é sua!

### **Aos meus pais, Luiza Maria e Carlos Alberto**

Pelo amor incondicional e pelo incentivo dado nas minhas escolhas, mesmo muitas vezes não entendendo sequer do que se tratava! Vocês, com simplicidade, sempre me ensinam muito!

### **Aos meus familiares e amigos**

Por me ajudarem a caminhar nesta “humana aventura”, que é a vida!

### **À minha sogra, Iara Sampaio**

Pelo carinhoso auxílio dado durante a fase final da consecução do trabalho. Ser-lhe-ei eternamente grata!

### **Ao Dr. Marcos André Vannier dos Santos**

Pela orientação, sugestões valiosas, incentivo e apoio dado durante todos estes anos.

### **À Dra. Maria Aparecida Gomes**

Por toda colaboração dada durante a realização deste trabalho.

### **Ao Dr. José Roberto Meyer-Fernandes**

Pela ajuda dispensada durante o período em que estive na UFRJ, e pelas valiosas sugestões.

### **Ao Dr. Marcus Fernandes Oliveira e sua equipe**

Pela sempre grande disponibilidade em receber os alunos do LBP em seu laboratório e em discutir ciência.

### **Ao Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira e sua equipe**

Pela disponibilidade em colaborar conosco e ajuda nas questões metodológicas.

### **Ao Dr. Cláudio Pereira Figueira**

Pela ajuda e atenção dispensada durante o período de execução do trabalho.

### **Ao técnico do Laboratório de Amebíase da UFMG, João Viana**

Pela grande ajuda dada durante o período em que estive na UFMG. Você sem dúvidas é um grande mestre!

**À Lise Dórea e Amanda Moscozo**

Às minhas “alunas de IC”, meus sinceros agradecimentos pela inestimável ajuda neste trabalho, que também é de vocês!

**Ao M.Sc. Gustavo Miranda e Tayane Fernandes**

Pela amizade, companheirismo e suporte dados durante todos os dias no convívio na bancada.

**À técnica do LBP Eliete Souza**

Pela amizade inestimável e suporte dado aos experimentos realizados neste trabalho.

**À toda equipe do LBP**

Pela amizade, excelente convivência e ajuda dada no dia a dia do laboratório.

**À Taise Coutinho Caíres**

Pelo apoio e eficiência na coordenação de ensino.

**À Ana Maria Fiscina e pessoal da biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ**

Pelo suporte dado nas pesquisas.

**À todos os funcionários do biotério do CPqGM/FIOCRUZ**

Pelo fornecimento e cuidados com os animais do biotério.

**À todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

Pelos ensinamentos e amizade.

**À todos os funcionários do CPqGM/FIOCRUZ**

**Fontes financiadoras:** CAPES, CNPq, FAPESB, PDTIS e FIOCRUZ

*"Desistir... eu já pensei seriamente nisso,  
mas nunca me levei realmente a sério;  
é que tem mais chão nos meus olhos  
do que o cansaço nas minhas pernas,  
mais esperança nos meus passos,  
do que tristeza nos meus ombros,  
mais estrada no meu coração  
do que medo na minha cabeça."*

*Cora Coralina*

## RESUMO

---

*Entamoeba histolytica*, o agente etiológico da amebíase, constitui a segunda maior causa de morte por protozooses, sendo considerado um grave problema de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento. A morte celular induzida por este parasito entérico é dependente de contato e mediada por proteínas específicas, as quais modulam diversos eventos fisiológicos no hospedeiro. Dentre os mecanismos reguladores de tais respostas está a desfosforilação de grupos fosfotirosil de proteínas, através da atuação de proteína tirosina fosfatases (PTPases), tanto expressas na superfície celular como secretados pelo trofozoíto. Alguns estudos demonstram uma rápida diminuição nos níveis de fosforilação de resíduos tirosina em proteínas de células-alvo após o contato com *E. histolytica*. Estas PTPases têm sido descritas como tendo importante papel na patogênese da amebíase. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de atividade fosfatásica em diferentes cepas de *E. histolytica*, assim como caracterizar a sua sensibilidade a conhecidos inibidores de proteína tirosina fosfatases, e os efeitos destes moduladores em mecanismos envolvidos na patogênese, a exemplo de fagocitose e efeito citopático. Inicialmente, a sensibilidade aos moduladores da via de sinalização celular em trofozoítos de *E. histolytica* (cepas ICB – 452, ICB – CSP e HM1:IMSS) foi caracterizada através de avaliação da proliferação celular, onde inóculos de parasitos foram incubados em presença ou ausência de inibidores de PTPases. Dentre os moduladores testados, o derivado de vanádio bisperoxo (1, 10 - fenantrolina) oxovanadato de potássio (bpVphen) e o óxido de fenilarsina (PAO) demonstraram efetiva capacidade antiproliferativa. Estas células apresentaram uma maior sensibilidade ao PAO em comparação ao bpV(phen), com valores de IC<sub>50</sub> para a cepa HM1:IMSS de 0,9 µM e 38,4 µM, respectivamente. A análise bioquímica revelou que há uma maior atividade secretória e ectofosfatásica na linhagem HM1:IMSS (24,48 nM *p*-NP/40 min./3 x 10<sup>6</sup> células e 297 nM *p*-NP/40 min./2 x 10<sup>5</sup> células, respectivamente), e uma redução desta atividade foi detectada na presença dos derivados de vanádio na superfície do parasito (31,3 nM *p*-NP/40 min./2 x 10<sup>5</sup> células). O mesmo não foi observado após a adição de PAO. A análise da eritrofagocitose e da destruição da monocamada de células epiteliais da linhagem MDCK, importantes marcadores de virulência neste patógeno, demonstrou significativa redução destes processos em trofozoítos tratados com os inibidores ortovanadato de sódio (OVS) e o bpV(phen), indicando a participação de PTPases nos mesmos. Estas mesmas alterações foram observadas após o tratamento do parasito com PAO, porém dados ultraestruturais de citoquímica enzimática não indicam a redução da atividade fosfatásica por este composto. Estes dados foram confirmados após a avaliação da atividade das frações purificadas de homogenatos solubilizados de trofozoítos de *E. histolytica*, onde detectou-se a redução dos níveis de atividade enzimática após a adição de vanadato e seus derivados à reação, o que não pôde ser observado após o acréscimo de PAO. Os resultados obtidos indicam que PTPases estão diretamente envolvidas em importantes funções celulares exercidas por trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Ademais, novos estudos que visem à elucidação dos possíveis modos de ação do composto PAO neste patógeno poderiam contribuir, consideravelmente, com o entendimento da biologia do parasito e, conseqüentemente, dos mecanismos patogênicos da amebíase.

Palavras chave: Amebíase; *Entamoeba histolytica*; Proteína Tirosina Fosfatases.

## ABSTRACT

---

*Entamoeba histolytica*, the etiologic agent of amoebiasis, is responsible for the second largest cause of death from diseases caused by protozoan parasites and is considered a serious public health problem, particularly in developing countries. Cell death induced by this enteric parasite is contact-dependent and mediated by specific proteins, which regulate various events on the host physiology. Among the mechanisms regulating such responses is dephosphorylation of phosphotyrosil groups from proteins, by protein tyrosine phosphatases (PTPases) both expressed on the cell surface or secreted by the trophozoite. Some studies show a rapid decrease in the tyrosine residue phosphorylation levels in target cells proteins after contact with *Entamoeba histolytica*. These PTPases were reported to play an important role in amoebiasis pathophysiology. The objective of this study was to analyze the profile of phosphatase activity in different strains of *Entamoeba histolytica*, as well as characterize their sensitivity to known PTPase inhibitors, and the effects of these modulators on mechanisms involved in the pathogenesis, such as phagocytosis and cytopathicity. Initially, the sensitivity to the modulators of the cell signaling pathway in trophozoites of *E. histolytica* (strains ICB - 452, ICB - CSP and HM1: IMSS) was characterized by assessment of cell proliferation, where parasite inocula were incubated in the presence or absence of PTPases inhibitors. Among the modulators tested, the vanadium derivative potassium bisperoxo (1,10-phenanthroline) oxovanadate (V) (bpVphen) and phenylarsine oxide (PAO), presented effective antiproliferative capacity. These cells exhibited higher sensitivity to PAO as compared to bpV(phen), with  $IC_{50}$  values of 0.9  $\mu$ M and 38.4  $\mu$ M, respectively. The biochemical analysis revealed that incubation in serum-free medium triggered increased the secretory and ectophosphatase enzymatic activities of trophozoites particularly in the HM1:IMSS strain, and this activity was reverted by vanadium derivatives. The same was not true for the addition of PAO. A significant reduction of erythrophagocytosis and the destruction of MDCK cell monolayer, which comprise important virulence markers for this pathogen, was demonstrated in trophozoites treated with the inhibitor sodium orthovanadate (OVS), and bpV(phen), indicating probable involvement of PTPases in these processes. These same changes were observed after treatment of the parasite with PAO, but data ultrastructural from enzyme cytochemistry did not indicate the reduction of phosphatase activity by this compound. These data were confirmed by evaluating the activity of purified fractions of solubilized homogenates of trophozoites of *E. histolytica*, where it was found to reduce the levels of enzyme activity after addition of vanadate and its derivatives to the reaction, but was not observed after the addition of PAO. The results indicate that PTPases are directly implicated in important cellular functions performed by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. Moreover, new studies aiming to elucidate the possible mechanisms of action of compounds such as PAO in this pathogen could contribute considerably to the understanding of the parasite biology and therefore the pathogenic machinery of amoebiasis.

Keywords: Amoebiasis; *Entamoeba histolytica*; Protein Tyrosine Phosphatases

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	21
Figura 2	Avaliação da suscetibilidade parasitária de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> ao derivado de vanádio bpV(phen) através de análise da proliferação celular.....	49
Figura 3	Análise da suscetibilidade ao inibidor PAO de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> através de ensaios de proliferação celular.....	50
Figura 4	Avaliação da viabilidade de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> através da técnica do MTT.....	51
Figura 5	Determinação da atividade ectofosfatásica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> incubados com diferentes moduladores da sinalização celular.....	53
Figura 6	Avaliação dos efeitos de inibidores de proteína tirosina fosfatases na atividade ectofosfatásica de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	54
Figura 7	Análise da atividade secretória e ectofosfatásica de diferentes linhagens de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	56
Figura 8	Detecção da atividade fosfatase ácida por citoquímica enzimática de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> da cepa HM1:IMSS processados para microscopia eletrônica de transmissão.....	58
Figura 9	Análise ultraestrutural da atividade fosfatase ácida de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> da linhagem ICB – CSP.....	60
Figura 10	Detecção da atividade fosfatásica em pH ácido de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> da cepa ICB – 452 processados para microscopia eletrônica de transmissão.....	62
Figura 11	Avaliação da capacidade fagocítica de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> na presença de moduladores da sinalização celular.....	65
Figura 12	Quantificação da capacidade fagocítica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> na presença de inibidores de PTPases.....	66
Figura 13	Avaliação da destruição da monocamada de células MDCK por trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	68

Figura 14	Análise qualitativa da destruição da monocamada de células da linhagem MDCK pelo protozoário <i>Entamoeba histolytica</i> .....	69
Figura 15	Análise quantitativa da interação de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> com a monocamada de células da linhagem MDCK.....	70
Figura 16	Avaliação ultraestrutural e da atividade fosfatase ácida de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> da linhagem HM1:IMSS em presença dos inibidores de PTPases.....	72
Figura 17	Detecção da atividade fosfatásica em pH ácido e avaliação ultraestrutural de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	74
Figura 18	Eletroforese em gel de poliacrilamida das amostras provenientes das diferentes etapas de purificação.....	77
Figura 19	Avaliação da atividade fosfatásica das frações purificadas em presença de inibidores de PTPases.....	78

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela 1	Avaliação colorimétrica da proliferação celular de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , cepa HM1:IMSS, na presença de diferentes moduladores da sinalização celular.....	45
Tabela 2	Avaliação colorimétrica da atividade proliferativa de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , linhagem ICB – CSP, em presença de moduladores da sinalização celular.....	46
Tabela 3	Análise colorimétrica da proliferação celular de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> , cepa ICB – 452, em presença de moduladores da sinalização celular.....	47
Tabela 4	Valores de IC <sub>50</sub> do derivado de vanádio bpV(phen) e PAO determinados por ensaios de inibição da capacidade proliferativa em diferentes cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	51
Tabela 5	Sumário da purificação parcial da fração solubilizada de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	77
Tabela 6	Lista dos compostos utilizados neste estudo, com as respectivas fórmulas estruturais.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AcP	Fosfatase acidófila
ADP	Difosfato de adenosina
ALDH	Aldeído desidrogenase
$\alpha$ -MM	Metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo
ATP	Trifosfato de adenosina
Bcl-2	Linfoma de células B - 2
BHK	Células renais de hamster
Caco-2	Células de adenocarcinoma de cólon humano
Cdc 25	Ciclo de divisão celular - 25
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CHO	Células de ovário de hamster chinês
Con A	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenase
CP	Cisteína-proteinase
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	'Dulbecco's Modified Eagle's Medium'
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
EGTA	Ácido etilenoglicoltetraacético
EP4	E-prostanoide-4
ERK1	Cinase regulada por sinal extracelular 1
FAS	Superfamília de receptor de TNF 6
FN	Fibronectina
Gal/GalNAc	Galactose/ <i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GFP	Proteína fluorescente verde
HE	Hematoxilina/Eosina

HeLa	Células imortalizadas de câncer cervical Henrietta Lacks
HSP	Proteína de choque térmico
KDa	QuiloDálton
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória para 50% do crescimento das células
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IRK	Receptor cinase de insulina
LPPG	Lipofosfopeptidioglicano
MAP	Fosfatase ácida ligada à membrana
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MDCK	Epitélio renal canino Madin-Darby
MTT	3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium
Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	Sódio/potássio adenosina trifosfatase
NF-κB	Fator nuclear kappa-B
NK	Célula 'natural killer'
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -nitrofenilfosfato
PS	Fosfatidilserina
PTPases	Proteína tirosina fosfatases
PTP	Proteína tirosina fosfatase
RNA	Ácido ribonucléico
ROM1	Protease romboide
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
SAP	Fosfatase ácida secretada
SBA	Soro bovino adulto
SFB	Soro fetal bovino
SHP	Domínio de homologia à Src

STIRP	Proteínas ricas em serina-treonina-isoleucina
SOD	Superóxido dismutase
SREHP	Proteína de <i>Entamoeba histolytica</i> rica em serina
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMK	Cinase transmembrana
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TLR	'Toll-like receptor'
UNESCO Cultura	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
ZO	<i>Zonula Ocludens</i>

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>18</b>
2.1. A Amebíase.....	18
2.2. Aspectos Epidemiológicos.....	22
2.3. Biologia do Trofozoíto.....	24
2.4. Mecanismos Immunopatogênicos da Amebíase.....	26
2.4.1. Adesão.....	26
2.4.2. Morte Celular.....	28
2.4.3. Fagocitose.....	30
2.5. Fatores de Virulência de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	31
2.6. Funções Biológicas Associadas às Proteínas Tirosina Fosfatases de Patógenos.....	33
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos.....	36
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
4.1. Substâncias utilizadas.....	37
4.2. Cepas utilizadas de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	37
4.3. Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> e análise da proliferação celular.....	37
4.4. Avaliação da viabilidade celular através da técnica do MTT.....	38
4.5. Avaliação da atividade ectofosfatásica.....	39
4.6. Avaliação da atividade fosfatásica do sobrenadante de culturas de <i>E. histolytica</i> ..	39

4.7. Citoquímica para detecção de fosfatase ácida por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
4.8. Isolamento e lavagem de eritrócitos.....	40
4.9. Ensaio de eritrofagocitose.....	40
4.10. Ensaio qualitativo para determinação do efeito citopático de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	41
4.11. Quantificação do efeito citopático promovido por trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	41
4.12. Purificação de proteínas fosfatases da fração solubilizada de <i>E. histolytica</i> .....	41
4.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	42
4.14. Análise estatística.....	42
4.15. Sujeitos da pesquisa.....	42
4.16. Considerações éticas.....	43
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
5.1. Efeito de inibidores de proteína tirosina fosfatases na proliferação de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	44
5.2. Avaliação da suscetibilidade parasitária para determinação do IC <sub>50</sub> .....	48
5.3. Efeito de moduladores da sinalização celular na atividade ectofosfatásica de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	52
5.4. Avaliação da atividade ectofosfatásica e do sobrenadante de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....	55
5.5. Detecção de fosfatases acidófilas por microscopia eletrônica de transmissão.....	57
5.6. Ensaio de Eritrofagocitose.....	64

5.7. Avaliação qualitativa e quantitativa da destruição da monocamada de células MDCK.....	67
5.8. Avaliação ultraestrutural e da atividade fosfatase ácida de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> tratados com moduladores da sinalização celular.....	71
5.9. Purificação parcial e efeito de moduladores químicos de PTPases em trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	76
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>93</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>117</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>126</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

*Entamoeba histolytica* é um parasito extracelular que coloniza o lúmen intestinal humano, sem apresentação de manifestações clínicas em cerca de 90% dos casos (HUSTON, 2004). Fatores ainda pouco conhecidos desencadeiam a invasão do epitélio do intestino grosso por este protozoário, e a interação entre *E. histolytica* e as células do hospedeiro gera uma interface complexa, que envolve elementos resultantes da ativação da resposta inflamatória e a modulação destes eventos pelo parasito, garantindo a sua sobrevivência e a progressão da doença (MORTIMER e CHADEE, 2010).

Os mecanismos de invasão desencadeados por *E. histolytica* envolvem a capacidade do parasito em matar e fagocitar células do hospedeiro (MARTINEZ-PALOMO *et al.*, 1985; OROZCO *et al.*, 1983; RODRIGUEZ e OROZCO, 1986). A adesão é considerada a primeira etapa para que *E. histolytica* exerça seus efeitos citotóxicos na célula-alvo, sendo estes eventos mediados por proteínas específicas do protozoário (SATERIALE e HUSTON, 2011).

Recentemente, alguns estudos têm demonstrado uma rápida diminuição nos níveis de fosforilação em resíduos de tirosina em proteínas de células de mamíferos após o contato com *E. histolytica*. Esta desfosforilação tem sido associada à indução de morte celular programada de linfócitos T (TEIXEIRA e MANN, 2002), rompimento de estruturas do citoesqueleto de células epiteliais humana (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2003) e possível inibição da ativação leucocitária de polimorfonucleares (VEGA-ROBLEDO *et al.*, 2005).

A ação de Proteínas fosfatases tem sido relacionada à modulação do perfil de fosforilação das células do hospedeiro e, por conseguinte, à patogênese em uma série de patologias, a exemplo de doenças virais (DUNN e CONNOR, 2012), bacterianas (GUAN e DIXON, 1993; HENEBERG, 2012; WHITMORE e LAMONT, 2012), fúngicas (COLLOPY-JUNIOR *et al.*, 2006; KIFFER-MOREIRA *et al.*, 2007; PORTELA *et al.*, 2010) e causadas por protozoários parasitas, como *Leishmania* spp. (SHIO *et al.*, 2012) *Trypanosoma brucei* (BAKALARA *et al.*, 2000; FERNANDES *et al.*, 1997), *Trypanosoma cruzi* (MEYER-FERNANDES *et al.*, 1999), *Giardia lamblia* (AMAZONAS *et al.*, 2009) e *Trichomonas vaginalis* (DE JESUS *et al.*, 2002). Nesse sentido, é vital a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de invasão por *E. histolytica*, não somente para o entendimento da doença, mas para a busca de estratégias terapêuticas que contemplem suas diversas manifestações clínicas, de modo seguro e eficaz.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 2.1. A Amebíase

A amebíase foi definida em 1997 pela Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO), como uma infestação que tem como agente etiológico o protozoário anaeróbico *Entamoeba histolytica*, independente da apresentação de sintomas. Esta espécie, pertencente à família Entamoebidae e ordem Amoebida, é caracterizada pela locomoção e incorporação de alimentos através de pseudópodes, particularidade inerente à classe Lobosea, uma das representantes do subfilo Sarcodina, filo Sarcomastigophora (NEVES, 2011, p. 137).

Este parasito intestinal infesta cerca de 50 milhões de pessoas, sendo responsável pela morte de 100.000 indivíduos anualmente em todo o mundo. Esta enfermidade está associada à significativa morbidade e mortalidade, sendo a segunda maior causa de morte por doenças provocadas por protozoários parasitas (HUSTON, 2004; TENGGU e NORHAYATI, 2011). Estima-se que 10% dos indivíduos infectados por este protozoário apresentam a forma extraintestinal, com migração dos trofozoítos pelo sistema porta até o fígado e levando à formação de abscessos hepáticos amebianos, se caracterizando como a maior causa de morte por este parasito (ESPINOSA-CANTELLANO e MARTINEZ-PALOMO, 2000).

A amebíase é adquirida pela ingestão de cistos presentes na água e alimentos contaminados, ou pela via fecal-oral. Um cisto maduro apresenta quatro núcleos e cerca de 20 µm de diâmetro, podendo sobreviver por semanas no ambiente externo. Uma vez no íleo distal, este sofre divisão nuclear e o desencistamento dá origem a oito trofozoítos, que colonizam a mucosa intestinal (figura 1). A sintomatologia inclui dor abdominal, diarreia sanguinolenta ou não, com presença de muco abundante, tenesmo frequente e em alguns casos, febre. Complicações severas estão relacionadas à perfuração do cólon, colite fulminante, megacólon tóxico ou ameboma, com apresentação de sintomas que envolvem dores abdominais intensas, vinte ou mais episódios por dia de diarreia com sangue, febre, taquicardia, hipotensão e obstrução intestinal (XIMÉNEZ *et al.*, 2009).

O abscesso hepático é a forma mais frequente de amebíase extraintestinal, observada principalmente em adultos com idade entre 20 e 50 anos. Homens são mais propensos a desenvolver a doença do que mulheres, com uma frequência 10 – 15 vezes maior (XIMÉNEZ *et*

*al.*, 2009). O lóbulo hepático direito é o mais frequentemente afetado, devido à circulação do sistema porta. O lóbulo esquerdo também pode ser infectado e grandes abscessos podem levar ao comprometimento das cavidades peritoneal, pleural ou pericárdica. Os brônquios também poderão ser afetados pela infecção (HUGHES e PETRI, 2000). Alguns testes são realizados com fins diagnósticos para amebíase extraintestinal, como por exemplo, a presença de leucocitose ( $> 15 \times 10^9$  células/dL), o aumento no número de neutrófilos, velocidade da sedimentação globular e altos níveis de fosfatase alcalina, aliados à presença de altos níveis de anticorpos circulantes antiamebianos (XIMÉNEZ *et al.*, 2009).

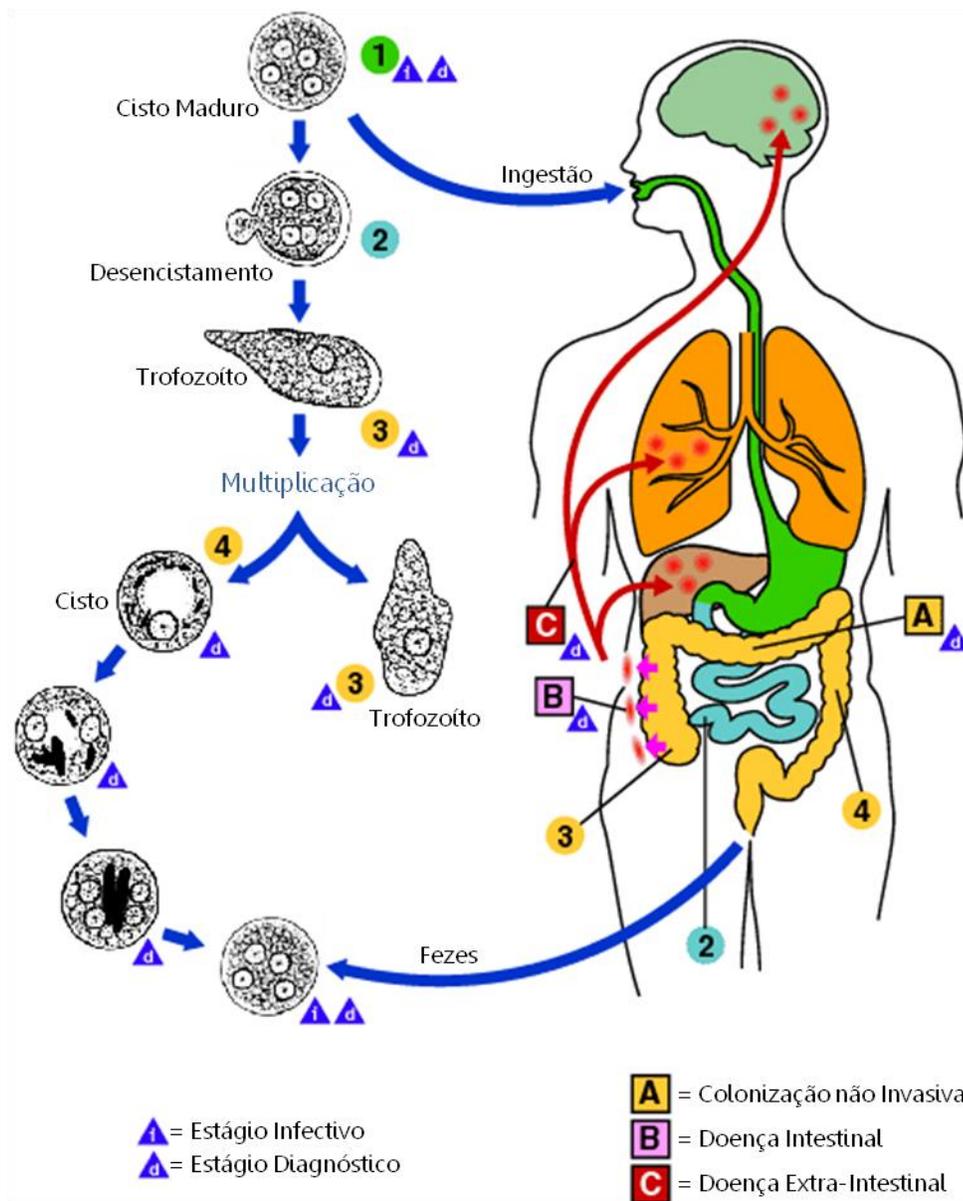
As infecções causadas por *E. histolytica* são controladas por drogas, sendo as mais comumente usadas atualmente as da família dos 5-nitroimidazóis, tinidazol (Fasigyn®) e metronidazol (Flagyl®) em particular (ALI e NOZAKI, 2007). Estes fármacos possuem uma boa absorção oral, bem como uma abrangente distribuição tecidual e metabolismo hepático (RAETHER e HÄNEL, 2003). Fármacos pertencentes a este grupo que possuem uma meia-vida mais longa, como ornidazol e tinidazol são, geralmente, escolhidos pela possibilidade de um menor tempo de tratamento e uma melhor tolerância com um esquema terapêutico de dose única, em comparação ao metronidazol. Os efeitos colaterais relacionados ao uso deste medicamento incluem náuseas, dor de cabeça, vertigem e gosto metálico na boca (KAVOUSI, 1979; LEVI *et al.*, 1977). Além disso, a inibição da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) hepática pelo uso do metronidazol pode causar o efeito antabuse (sensação de calor, rubor, vômito e taquicardia), após ingestão de álcool durante o período de tratamento (GARDNER e HILL, 2001). Seu efeito mutagênico em bactérias e cancerígeno em camundongos e ratos, em altas doses e por longos períodos, tem sido relatado na literatura (LINDMARK e MULLER, 1976; VOOGD, 1981), bem como seu potencial carcinogênico em humanos, em longo prazo (BENDESKY *et al.*, 2002).

Em alguns casos, quando o paciente não responde bem aos 5-nitroimidazóis, é necessária a utilização de drogas como a cloroquina e emetina, há tempo usadas para o tratamento desta enfermidade (BASSILY *et al.*, 1987). Para o combate aos cistos, inclusive em pacientes assintomáticos, drogas com ação no lúmen intestinal são as mais indicadas, a exemplo de furoato de diloxanida, iodoquinol e paromicina. Contudo, casos de falha terapêutica são observados na literatura (NOZAKI *et al.*, 2006; SIMJEE *et al.*, 1985), geralmente influenciados por uma alta taxa de polimorfismo genético do parasito em uma região limitada geograficamente (AYEH-

KUMI *et al.*, 2001; HAGHIGHI *et al.*, 2002, 2003; MACFARLANE *et al.*, 2005), bem como a diferenças na resposta imune e metabolismo de drogas do hospedeiro (DUGGAL *et al.*, 2004).

Alguns compostos que não fazem parte do grupo dos imidazóis têm sido relatados como efetivos amebicidas, a exemplo da paromicina, niridazol e nitazoxanida. Esta última é uma substância derivada da nitrotriazol-salicilamida, que apresenta amplo espectro de ação contra protozoários microaerófilos, como *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis* e os helmintos *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Fasciola hepatica*, *Hymenolepsis nana*, *Trichuris trichiura* e *Taenia saginata* (ROSSIGNOL *et al.*, 2001). Ele geralmente é bem tolerado, possuindo poucos efeitos adversos, geralmente transtornos gastrointestinais (BROEKHUYSEN *et al.*, 2000).

As infecções transmitidas pela água respondem por 80% de todas as doenças infecciosas que ocorrem em âmbito mundial (EPSTEIN *et al.*, 1994), em decorrência principalmente da falta de condições sanitárias ocasionada pelo crescimento demográfico e aumento da degradação ambiental (PIMENTEL *et al.*, 2007). Nessas condições, pesquisas que visem o desenvolvimento de novas drogas seguras, eficientes e de baixo custo para o tratamento de protozooses, aliadas ao aumento da seletividade destes compostos para alvos específicos do parasito, são consideradas de grande relevância na literatura (ALI e NOZAKI, 2001; WRIGHT *et al.*, 2003). Desta forma, estudos que abordem os mecanismos envolvidos em processos patológicos, como invasão e morte celular, são decisivos para o melhor entendimento da patogênese e busca de novos rumos terapêuticos.



**Figura 1. Ciclo biológico de *Entamoeba histolytica*.** (1) Ingestão de cistos maduros através da água e alimentos contaminados. (2) Desencistamento no intestino delgado. (3) Trofozoítos no lúmen intestinal. (4) Encistamento. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>.

## 2.2. Aspectos Epidemiológicos

Muitos estudos epidemiológicos da amebíase realizados a partir de exames coprológicos, comuns para diagnóstico de enteroparasitoses, aliados a técnicas moleculares, refletem a infecção por duas espécies morfológicamente idênticas, *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*, esta última considerada não patogênica. A identificação espécie-específica tem sido realizada através de imunodiagnóstico e técnicas de biologia molecular com grande sensibilidade e especificidade, apesar do alto custo (SANTOS e SOARES, 2008; TENGGU e NORHAYATI, 2011).

Recentemente, uma discussão tem sido levantada na literatura acerca da capacidade de *E. dispar* induzir lesão tecidual em humanos. Um trabalho de Ximénez e colaboradores (2010), em cooperação com pesquisadores brasileiros, atestaram através de genotipagem a presença de *E. dispar* em pacientes que apresentavam abscesso hepático amebiano, além de um isolado caracterizado como sendo desta espécie reconhecidamente comensal, obtido de um indivíduo que foi diagnosticado clinicamente com amebíase intestinal. No entanto, novos estudos são necessários para corroborar esta hipótese e romper o paradigma de que apenas a espécie *E. histolytica* é capaz de desencadear a doença.

Embora a amebíase apresente distribuição mundial, as mais altas taxas de prevalência ocorrem em países em desenvolvimento, caracterizando-se como um importante problema de saúde pública, principalmente pela falta de condições sanitárias adequadas e políticas de promoção à saúde (XIMÉNEZ *et al.*, 2009).

Estudos sorológicos realizados em 1994 por Caballero-Salcedo e colaboradores na Cidade do México, indicaram que nos 5 a 10 anos que antecederam o período da pesquisa, cerca de 8,4% da população foi infectada por *E. histolytica*. No México, a amebíase é uma das 20 maiores causas de doença, posicionando-se frequentemente em quinto ou sexto lugar (XIMÉNEZ *et al.*, 2009). A soroprevalência observada em Bangladesh, uma região endêmica de Bengala, atingiu níveis em torno de 76% (HAQUE *et al.*, 1999). Na Líbia, em estudo onde as amostras de fezes foram observadas microscopicamente, relatou-se a presença do parasito em 36,6% das análises (KASSSEM *et al.*, 2007). Em pacientes hospitalizados do Egito, 16,2% obtiveram diagnóstico por exame microscópico para amebíase, sendo que 9,0% destes foram detectados antígenicamente com *E. histolytica* (EL-KADI *et al.*, 2006).

Existem diferenças na morbidade de acordo com as manifestações clínicas presentes em determinada área endêmica. Na África do Sul, por exemplo, o abscesso hepático amebiano é a

forma predominante de amebíase, enquanto que na Etiópia, a amebíase intestinal invasiva se caracteriza como o quadro mais frequente da doença (RAVDIN *et al.*, 2003)

No Brasil a prevalência é, em grande parte, desconhecida. A pesquisa de antígenos de *E. histolytica* em amostras fecais de indivíduos residentes em Belém, capital do Pará, detectou positividade em 29,35% dos pacientes analisados (SILVA *et al.*, 2005). Em Manaus, 21,5% das amostras analisadas apresentaram cistos de *E. histolytica/E. dispar*. Testes de detecção de antígenos específicos foram positivos para *E. histolytica* em 6,8% dos casos diagnosticados (BENETTON *et al.*, 2005). Em outro estudo realizado com 735 residentes da cidade de Fortaleza (Ceará) encontrou-se uma prevalência de 25,4%, porém em apenas 14,9% destes foram detectados antígenos da espécie reconhecidamente patogênica (BRAGA *et al.*, 2001). Santos e colaboradores (2007) analisaram amostras por Multiplex – PCR de 127 indivíduos do Estado do Rio de Janeiro. Dentre estes, 115 eram habitantes da zona rural na cidade de Sumidouro e 12 se localizavam na região urbana de São Gonçalo. Apesar da positividade de 27 amostras fecais analisadas por microscopia de campo claro para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, 15 destas foram negativas pela técnica de Multiplex – PCR e apenas 0,8% das amostras analisadas foram positivas para *E. histolytica*.

Os fatores de risco associados à amebíase e identificados por Benetton e colaboradores (2005) no estudo realizado em Manaus foram: idade, qualidade da água consumida, ingestão de vegetais crus, local de residência, número de cômodos por casa e ter outras infecções por protozoários. A infecção por *E. histolytica* em países desenvolvidos está, frequentemente, associada a certos grupos de alto risco, a exemplo de viajantes e imigrantes recentes. Uma alta prevalência também é encontrada em instituições que cuidam de deficientes mentais (KROGSTAD *et al.*, 1978). Relatos recentes também têm sinalizado o aumento do risco de amebíase entre homens que fazem sexo com homens soropositivos para o HIV, devido ao contato sexual oral-anal (HUNG *et al.*, 2008; JAMES *et al.*, 2010).

Em um estudo prospectivo realizado em Dhaka, Bangladesh, de um polimorfismo genético relacionado à leptina, uma adipocitocina ligada à nutrição e imunidade, demonstrou-se que há um aumento da suscetibilidade a infecções intestinais por *Entamoeba histolytica* com a substituição de um aminoácido no domínio extracelular do receptor de leptina (DUGGAL *et al.*, 2011). Esta citocina produzida por adipócitos apresenta os seus níveis reduzidos em crianças mal nutridas (MOORE *et al.*, 2002) e age como uma molécula pró-inflamatória, promovendo a

sobrevivência e função de células imunes (CONUS *et al.*, 2005; LAM *et al.*, 2006; NAJIB e SÁNCHEZ-MARGALET, 2002; PAPATHANASSOGLU *et al.*, 2006). Crianças que possuem o alelo para o aminoácido arginina (223R) são quatro vezes mais propensas a desenvolver a doença do que aquelas que apresentam o alelo ancestral para glutamina (223Q). A importância deste trabalho está na correlação entre um polimorfismo genético de um receptor de extrema relevância na regulação do sistema imune do trato gastrointestinal e a suscetibilidade a infecções entéricas em crianças. Esta se configura como uma nova abordagem que poderá, no futuro, permitir o desenvolvimento de formas de prevenção e tratamento de enfermidades intestinais (DUGGAL *et al.*, 2011).

### **2.3. Biologia do Trofozoíto**

O trofozoíto de *Entamoeba histolytica* é altamente dinâmico e pleomórfico, e mudanças na temperatura, pH, osmolaridade e potencial redox são determinantes na morfologia e funções celulares. Parasitos em cultura axênica normalmente apresentam uma forma mais arredondada, com emissão de pequenos pseudópodes por algumas regiões da célula, e um uróide que não é visto com frequência (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1998 apud RAVDIN, 2000, p. 15). Filopódios também podem ser encontrados, mas usualmente são visualizados em culturas monoxênicas ou em contato com células epiteliais (MARTINEZ-PALOMO, 1983). O diâmetro desta forma evolutiva pode variar entre 10 e 60  $\mu\text{m}$ , sendo maiores geralmente os oriundos de lesões hepáticas, ou retirados diretamente do intestino (20 – 40  $\mu\text{m}$ ). Os trofozoítos encontrados nas fezes não disentéricas, ou em culturas, possuem diâmetro entre 10 e 30  $\mu\text{m}$  (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1998 apud RAVDIN, 2000, p. 15).

O núcleo deste parasito possui entre 4 – 7  $\mu\text{m}$  de diâmetro. A membrana nuclear é constituída de uma dupla membrana, com poros nucleares de aproximadamente 65 nm de diâmetro, atravessando-a. Possui um cariossoma central, que não apresenta equivalência com o nucléolo de eucariotos, e uma cromatina que se distribui uniformemente na periferia do núcleo, onde experimentos de hibridização identificaram genes de RNA ribossomal (ZURITA *et al.*, 2001). O processo de divisão nuclear ocorre sem dissolução da membrana do núcleo e envolve a participação do fuso mitótico, porém os microtúbulos só podem ser visualizados através de criotécnicas (GONZÁLEZ-ROBLES, 1997 apud RAVDIN, 2000, p. 17).

O citoplasma de trofozoítos de *E. histolytica* contém numerosos vacúolos, com o tamanho

variando entre 0,5 e 9,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Por microscopia eletrônica de transmissão não se observa neste parasito organelas típicas de eucariotos, a exemplo de retículo endoplasmático, complexo de Golgi, mitocôndria e estruturas do citoesqueleto. O conteúdo vacuolar tem sido analisado ultraestruturalmente e bioquimicamente, revelando que este sistema está envolvido em processos endocíticos como fagocitose, micropinocitose, macropinocitose e autofagia. Ao contrário de outros eucariotos, onde as enzimas do lisossomo se encontram livres no compartimento vacuolar, em *E. histolytica* elas estão ligadas à membrana lisossomal (MARTÍNEZ-PALOMO, 1986 apud RAVDIN, 2000, p. 18). Além disso, proteínas envolvidas na formação de vesículas, como clatrininas, têm sido identificadas neste protozoário, como participantes da internalização de proteínas contendo ferro, a exemplo de transferrina humana (REYES-LÓPEZ *et al.*, 2011). Este parasito apresenta uma alta taxa de endocitose e reciclagem de componentes da membrana plasmática (RAVDIN, 2000, p. 20).

Trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* criofixados e criosubstituídos apresentaram estruturas semelhantes à retículo endoplasmático liso e complexo de Golgi (CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2000). A identificação de proteínas de membrana com sequência sinal N-terminal e de peptídeos de retenção C-terminal funcional no retículo endoplasmático, além de dados do genoma deste parasito, indicam que a maquinaria de tráfico de vesículas observada em outros eucariotos também está presente em *E. histolytica* (GHOSH *et al.*, 1999; LOFTUS *et al.*, 2005; MANN *et al.*, 1991). Em um recente trabalho desenvolvido por Teixeira e Huston (2008), foi demonstrada a existência de um retículo endoplasmático contínuo neste protozoário, através de marcação por fusão da proteína GFP a uma sequência peptídeo sinal N-terminal da lectina ligante de galactose/*N*-acetil-D-galactosamina, expressa pelo parasito.

A inexistência de mitocôndria neste protozoário microaerófilo o impede de realizar fosforilação oxidativa, porém dados indicam que existe uma organela homóloga à encontrada em eucariotos aeróbicos, conhecida como crypton, ou mitossomo (TOVAR *et al.*, 1999). Genes mitocondriais, a exemplo de piridina nucleotídeo transhidrogenase, chaperoninas HSP60 e HSP70, foram identificados nestas organelas (BAKATSELOU *et al.*, 2003). Além disso, estudos sugerem a presença de um transportador ADP/ATP no mitossomo de *E. histolytica* (CHAN *et al.*, 2005). Análise ultraestrutural a caracterizou como uma organela que contém dupla membrana e internamente foi detectada, através de microscopia de fluorescência, marcação para DNA de dupla fita (GHOSH *et al.*, 2000).

## 2.4. Mecanismos Imunopatogênicos da Amebíase

### 2.4.1. Adesão

A adesão dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica* às células epiteliais da mucosa intestinal configura-se como o primeiro estágio do mecanismo de invasão por este parasito. A principal molécula envolvida neste processo é uma proteína heterodimérica composta por uma subunidade pesada, com peso molecular de 170 kDa, ligada de forma não covalente à cadeia leve de 31 ou 35 kDa, que reconhece galactose e *N*-acetil-D-galactosamina (lectina Gal/GalNAc) na superfície de células do hospedeiro (MCCOY *et al.*, 1994; RAVDIN *et al.*, 1980). A subunidade pesada possui o domínio de ligação ao carboidrato e uma curta cauda citoplasmática, que está, possivelmente, implicada na via de transdução de sinal pela lectina (VINES *et al.*, 1998). Em contrapartida, pouco se sabe sobre as funções celulares exercidas pela cadeia leve. A inibição da expressão desta subunidade proteica por um RNA antisense não afetou, de forma significativa, a adesão dos trofozoítos às células de mamífero ou bactérias, porém houve uma forte redução da sua atividade citopática, citotóxica e de indução da formação de lesões hepáticas em hamsters. Estes achados sugerem que a cadeia leve desta proteína apresenta um papel importante na patogenicidade do parasito (ANKRI *et al.*, 1999).

Proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina (FN), também desempenham importante papel nos mecanismos de sinalização mediados por receptores específicos associados a eventos de fosforilação/desfosforilação e ativação de proteínas em *E. histolytica*, a exemplo da cinase A (PKA) e cinase C (PKC) (MEZA, 2000). Organização e função do citoesqueleto são reguladas pela cascata de sinalização (MEZA *et al.*, 2006). Interações de FN com receptores em *E. histolytica* revelou alterações de citoesqueleto, consistindo na formação de estruturas ricas em actina similares às placas de adesão descritas em células de mamíferos nos sítios de contato com proteínas da matriz extracelular. Estas estruturas são conhecidas por funcionar como organelas transdutoras de sinal durante a adesão mediada por receptores e locomoção celular nos substratos de proteína na matriz extracelular (MEZA, 2000). Ademais, em um estudo realizado para avaliação da participação de balsas lipídicas na adesão do parasito a componentes da matriz extracelular do hospedeiro demonstrou-se que há uma correlação positiva entre os níveis de colesterol da membrana plasmática do trofozoíto e a sua capacidade de aderir a substratos ricos em colágeno, e de forma menos acentuada, à fibronectina (MITTAL *et al.*, 2008).

A formação de placas de adesão em *E. histolytica* não é importante apenas na ligação do

trofozoíto ao substrato e locomoção, mas é fundamental também na degradação de componentes da matriz extracelular (VÁZQUEZ *et al.*, 1995). Análises *in vitro* demonstram que células do epitélio intestinal humano apresentam uma rápida diminuição da resistência transepitelial após contato com o protozoário, o que provavelmente está associado ao aumento da permeabilidade provocado pela diminuição da sua integridade (LI *et al.*, 1994). Alterações na permeabilidade estão associadas a proteínas presentes nas junções compactas ou “tight junctions”, onde Leroy e colaboradores (2000) observaram a desfosforilação de *zonula ocludens 2* (ZO-2) e perda de ZO-1.

Trofozoítos de *E. histolytica* expressam e expõem em sua superfície lipofosfopeptidioglicano (EhLPPG), uma molécula altamente imunogênica exposta ao sistema imune do hospedeiro. Estudos demonstram que LPPG de *E. histolytica* é reconhecido e ativa a resposta imune inata através de receptores ‘toll-like’ (TLR), particularmente TLR2 e TLR4, promovendo a ativação de NF- $\kappa$ B e síntese de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, subunidade p40 da interleucina 12 e IL-10. No entanto, na presença de LPPG há uma inibição dose-dependente do acúmulo do RNAm da proteína TLR2 (MALDONADO-BERNAL *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que este lipoglicoconjugado ativa a resposta imune do hospedeiro, mas também pode atuar como modulador da imunidade inata, gerando um ‘feedback’ negativo que atenua a resposta inflamatória, contribuindo com a permanência do parasito no organismo. Ademais, *E. histolytica* produz prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), a partir de uma enzima semelhante a ciclooxigenase (COX) na presença de ácido araquidônico exógeno (DEY *et al.*, 2003). Este mediador inflamatório induz via receptor E-prostanoide-4 (EP4) de células epiteliais do cólon a produção de IL-8, um potente quimioatraente e ativador de neutrófilos, cuja ativação pode causar danos teciduais inespecíficos e amplificar a inflamação (DEY e CHADEE, 2008).

O silenciamento através de mecanismos epigenéticos de uma família de proteínas ricas em serina-treonina-isoleucina (STIRP), expressa exclusivamente em cepas virulentas de *E. histolytica*, diminuiu em cerca de 35% a adesão, e por consequência a citotoxicidade, após interação de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* com células de ovário de hamster chinês (CHO) e de adenocarcinoma de cólon humano (caco-2) (MACFARLANE e SINGH, 2007). Este trabalho confirma a hipótese de que há uma diferença no perfil de expressão entre cepas virulentas e avirulentas, tornando-se necessária a pesquisa de outros genes que se apresentem como determinantes de virulência.

### 2.4.2. Morte Celular

A morte celular induzida por *Entamoeba histolytica* é dependente de contato e mediada por receptores específicos do parasito, muitos deles envolvidos na adesão às células do hospedeiro, a exemplo da lectina Gal/GalNAc (SATERIALE e HUSTON, 2011). Após o contato, há formação de canais de íons na membrana da célula-alvo produzidos pela oligomerização de perforinas do protozoário, através de interações peptídeo-peptídeo. Estas proteínas conhecidas como ameboporos, expressas nas isoformas A, B e C, foram isoladas de grânulos citoplasmáticos presentes em linhagens patogênicas de *E. histolytica* e são secretadas pelo parasito (LEIPPE *et al.*, 1994). Há um rápido e irreversível aumento na concentração de cálcio no citoplasma da célula do hospedeiro após inserção deste complexo protéico, que culmina na morte celular (RAVDIN *et al.*, 1985). Além disso, o tratamento de células-alvo com verapamil, um lento bloqueador de canais de cálcio, protege as células da lise pela ameba (RAVDIN *et al.*, 1982). Desta forma, o cálcio intracelular pode agir como um segundo mensageiro, afetando vias de transdução de sinais na célula do hospedeiro e inviabilizando a sua sobrevivência (TEIXEIRA e MANN, 2002).

A expressão e secreção de enzimas proteolíticas é provavelmente um dos principais determinantes para a infecção pelos trofozoítos, já que eles são ávidos fagócitos, ingerindo debris celulares, matriz extracelular e eritrócitos. No genoma de *E. histolytica* existem 86 genes para peptidases identificados, dentre os quais 50 são cisteína, 10 serina, quatro aspártico e 20 metaloproteases (CLARK *et al.*, 2007). Cisteína-proteases deste parasito são ativas contra uma variedade de substratos e o aumento da sua atividade tem sido observado em linhagens de alta virulência, sugerindo que estas enzimas são importantes fatores patogênicos (NAVARRO-GARCÍA *et al.*, 1995). Além de degradar componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina, colágenos tipo I, IV e V (SCHULTE e SCHOLZE, 1989), estas proteinases clivam moléculas do sistema imune do hospedeiro, a exemplo de imunoglobulinas e componentes do sistema complemento. Das duas subclasses de IgA, IgA2 é o isotipo predominante no cólon intestinal, devido a uma deleção de 13 aminoácidos na região de dobradiça desta imunoglobulina, que contém o sítio de reconhecimento de proteases bacterianas em IgA1. Cisteína-proteases de *E. histolytica* clivam ambos os isotipos (GARCIA-NIETO, 2008; KELSALL e RAVDIN, 1993). Além disso, é provável que a resposta humoral do hospedeiro seja comprometida pela clivagem de IgG por estas enzimas proteolíticas, uma vez que proteinases purificadas deste parasito clivam

anticorpos IgG monoclonais e policlonais de um modo dose-dependente (QUE e REED, 2000; TRAN *et al.*, 1998). Outro mecanismo interessante pelo qual ocorre evasão da resposta imune do hospedeiro por *E. histolytica* é através da atenuação dos efeitos das anafilatoxinas C5a e C3a, pela clivagem e inativação por proteases do parasito (REED *et al.*, 1995). Estas duas moléculas pró-inflamatórias induzem a liberação de histamina de mastócitos, enzimas lisossomais de neutrófilos e citocinas, a exemplo de IL-6 e TNF- $\alpha$  (GASQUE, 2004; WALPORT, 2001).

Recentemente, outro grupo de proteases, cuja função em parasitas intracelulares do filo Apicomplexa é mediar a invasão à célula do hospedeiro (URBAN, 2006) tem obtido particular interesse em *E. histolytica*. Estas proteínas, conhecidas como proteases romboides, são serina-proteases transmembrana que possuem a capacidade de clivar proteínas em seu domínio transmembrana (URBAN e FREEMAN, 2003). Uma única protease romboide funcional foi identificada em *E. histolytica* (ROM1), a qual tem sido atribuído o papel de clivar proteínas transmembrana envolvidas na adesão e fagocitose. EhROM1 Está presente na superfície do trofozoíto, mas também é encontrada em vesículas internas durante o processo fagocítico. O silenciamento desta proteína, mediado por mecanismos epigenéticos, reduziu a adesão de células CHO saudáveis, mas não de células apoptóticas. Em contrapartida, houve uma diminuição da capacidade fagocítica, independente do fenótipo utilizado (BAXT *et al.*, 2010).

A indução de morte celular programada também é visto como um importante mecanismo patogênico utilizado por *E. histolytica*. Em abscessos hepáticos améebicos induzidos experimentalmente em camundongos, a morte de hepatócitos por necrose e apoptose são observadas e aparentemente esta última é independente da via FAS – ligante de FAS (SEYDEL e STANLEY, 1998). Em outro estudo foi demonstrado que apoptose induzida por este parasito não é prevenida pela expressão de Bcl-2 (RAGLAND *et al.*, 1994). É possível também que concentrações abaixo das que causam o efeito citolítico em células do hospedeiro de proteínas formadoras do poro também possam induzir apoptose (BERNINGHAUSE e LEIPPE, 1997)

Quando trofozoítos de *E. histolytica* penetram na mucosa intestinal e invadem outros tecidos, a resposta imune do hospedeiro é acionada (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). Nos estágios iniciais da amebíase, anticorpos e células imunes como macrófagos, células NK, eosinófilos, linfócitos T e B não apresentam um papel chave na resistência; contudo, neutrófilos infiltram no sítio inflamatório durante os estágios iniciais da amebíase e a ativação destas células do hospedeiro tem importante papel amebicida (GHOSH *et al.*, 2000; JARILLO-LUNA *et al.*,

2002), mas sem a ação conjunta de diferentes mecanismos efetores, os trofozoítos rapidamente lisam os neutrófilos (SALATA *et al.*, 1985) que podem liberar mediadores, contribuindo para o aumento da diarreia e danos aos tecidos (GILMAN e PRATHAP, 1971).

### 2.4.3 Fagocitose

O papel da fagocitose na patogenicidade de *Entamoeba histolytica* tornou-se evidente após constatação de que clones que eram deficientes neste processo tem uma redução significativa da sua virulência (OROZCO *et al.*, 1983). Além disso, eritrofagocitose detectada por microscopia óptica tem sido utilizada como um indicador diagnóstico de amebíase invasiva (GONZALEZ-RUIZ, 1994). Durante o curso da infecção por *E. histolytica*, os danos teciduais observados incluem células necróticas e apoptóticas (MORTIMER e CHADEE, 2010; RALSTON e PETRI, 2011). Trabalhos recentes têm demonstrado que células que expõem fosfatidilserina (PS) em sua superfície após contato com *E. histolytica*, ou do pré-tratamento com o cálcio, são mais fagocitadas por este parasito do que células saudáveis (BOETTNER *et al.*, 2005; HUSTON *et al.*, 2003). Ademais, a adesão e fagocitose foram menos inibidas em eritrócitos pré-tratados com cálcio do que em hemácias saudáveis incubadas com galactose, sugerindo haver um co-receptor específico para PS (BOETTNER *et al.*, 2005). Quando linfócitos da linhagem Jurkat expuseram de modo artificial PS em sua superfície, a fagocitose por *E. histolytica* também ocorreu a altas taxas (HUSTON *et al.*, 2003).

Uma grande família de cinases transmembrana (TMKs) foi identificada em *E. histolytica* (BECK *et al.*, 2005; CLARK *et al.*, 2007; MEHRA *et al.*, 2006). Existem mais de 90 TMKs neste parasito, categorizados em subfamílias (A, B1-3, C, D1-2, E, F), baseadas nos seus domínios cinase (BECK *et al.*, 2005). Dados recentes indicam que a pré-incubação de trofozoítos de *E. histolytica* com anticorpo anti-TMK 96, uma proteína identificada na superfície do trofozoíto e que co-localiza-se com eritrócitos fagocitados pelo parasito, reduz drasticamente a ingestão dos mesmos (BOETTNER *et al.*, 2008). Um só trofozoíto de *E. histolytica* é capaz de expressar vários membros desta família e utilizá-los em funções não redundantes. Enquanto TMK54 foi capaz de influenciar o crescimento e alterar a expressão de superfície da subunidade pesada da lectina Gal/GalNAc de *E. histolytica*, TMK39 interferiu na fagocitose de células apoptóticas. Expressão de uma versão da proteína TMK39 que possuía apenas domínios extracelular e transmembrana diminuiu a incorporação de linfócitos Jurkat apoptóticos em aproximadamente

50% (BUSS *et al.*, 2010).

Teixeira e Huston (2008), com o objetivo de identificar receptores para engolfamento de células apoptóticas, realizaram uma triagem com 43 anticorpos monoclonais contra antígenos de superfície de *E. histolytica* para avaliação da inibição da fagocitose. Dentre os anticorpos testados, apenas 1 (um) apresentou uma inibição maior que 90%, a uma concentração de 20 µg/mL. O antígeno foi purificado por cromatografia de afinidade e identificado por cromatografia líquida-espectrometria de massa como uma proteína rica em serina (SREHP), um conhecido membro de uma família de proteínas de superfície imunogênica de *E. histolytica* (KÖHLER e TANNICH, 1993; MAI e SAMUELSON, 1998).

Apesar da importância da fagocitose na biologia do parasito, poucos trabalhos têm elucidado o papel deste fenômeno no desenvolvimento da amebíase. Uma das hipóteses associa este processo à ingestão de células apoptóticas do hospedeiro na prevenção da resposta inflamatória pela morte celular e consequente disfunção na deflagração da resposta imune (BAXT e SINGH, 2008).

## **2.5. Fatores de Virulência de *Entamoeba histolytica***

À medida que as pesquisas avançam sobre o entendimento da biologia do trofozoíto de *E. histolytica* e sua regulação gênica, mais se conhece sobre os fatores moleculares associados ao desenvolvimento da amebíase. Muitos estudos indicam que apenas uma parte dos indivíduos infectados por este parasito desenvolverão sintomas clínicos. Isto não se deve somente a fatores exclusivos do hospedeiro, pois alguns estudos demonstram haver diferença entre cepas de *E. histolytica* isoladas de paciente sintomático e assintomático (ALI *et al.*, 2008).

A virulência de *E. histolytica* está diretamente associada à sua capacidade de causar dano tecidual através da expressão e/ou secreção de várias moléculas. Durante muitos anos, sugeriu-se que amebas patogênicas apresentavam apenas três fatores de virulência envolvidos na adesão, evasão da resposta imune do hospedeiro, colonização e invasão. Estas moléculas, conhecidas como lectina Gal/GalNAc, ameboporos e cisteína-proteases, participam dos processos relacionados à patogênese, porém hoje é sabido que existem outros fatores que participam, direta ou indiretamente, destes eventos (ANAYA-VELÁZQUEZ e PADILLA-VACA, 2011).

Virulência geralmente apresenta múltiplos fatores, envolvendo uma complexa interface parasito – hospedeiro humano. Nesse sentido, muitos trabalhos tem apontado o lúmen intestinal

como um ambiente propício ao aumento da virulência de trofozoítos de *E. histolytica*. Um estudo realizado por Haque e colaboradores (1997), demonstrou uma maior taxa de infecção em crianças co-infectadas com *Shigella dysenteriae* e *Shigella flexneri*. *E. histolytica*, em associação com bactérias das linhagens *Escherichia coli* (sorotipo 055), *Salmonella greenside* (sorotipo 050) e *Shigella dysenteriae* tipo 1, foi mais citotóxica do que quando interagiu sozinha com a monocamada de células renais de hamster BHK (BRACHA e MIRELMAN, 1984).

Embora *E. histolytica* seja um protozoário microaerófilo e encontre baixas tensões de oxigênio no intestino, o processo de invasão da mucosa intestinal requer regulação específica de certas proteínas para manutenção de suas funções metabólicas e condições de sobrevivência em um ambiente com maiores tensões de oxigênio (GILCHRIST e PETRI, 1999). A esse respeito, um estudo recente demonstrou um aumento da expressão, em nível de RNAm, de uma peroxidase dependente de tiol (Eh29), superóxido dismutase (SOD), cisteína-proteinase 5 (EhCP5), proteína G, proteína de choque térmico 70 (HSP70), peptidilprolil isomerase e do efeito citopático após exposição de trofozoítos de *E. histolytica* a um ambiente com altas tensões de oxigênio (AKBAR *et al.*, 2004).

Atualmente, existem muitas moléculas expressas por *E. histolytica* candidatas a fatores de virulência, a exemplo de lipofosfopeptidioglicano (LPPG), peroxiredoxina, fosfolipases, esfingomielinases, arginase e proteínas ricas em ácido glutâmico e lisina. No entanto, estudos são necessários para definir seu papel como fatores ou determinantes de virulência (ANAYA-VELÁZQUEZ e PADILLA-VACA, 2011).

Nos últimos quinze anos, o estudo de proteína tirosina fosfatases (PTPases) em *E. histolytica* vem mostrando frequência crescente, principalmente no que concerne à modulação da sinalização celular do hospedeiro por estas proteínas cuja função está associada à remoção de grupos fosfato em resíduos tirosina de substratos específicos. A importância da fosforilação destes sítios em células eucarióticas é bem estabelecida na literatura. Eventos de fosforilação/desfosforilação em tirosina se configuram como mecanismos chaves de transdução de sinais celulares que regulam crescimento, diferenciação, mobilidade, metabolismo e sobrevivência (ZHANG, 2002). A este respeito, estudos com linfócitos da linhagem Jurkat e células CHO têm demonstrado uma diminuição da fosforilação em resíduos tirosina após interação com trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (RALSTON e PETRI, 2011; TEIXEIRA e MANN, 2002). O contato de células íntegras provavelmente é um pré-requisito para a ocorrência

da desfosforilação de células-alvo, pois o bloqueio da adesão pela adição de galactose inibiu os efeitos resultantes da atividade enzimática de PTPases. O pré-tratamento de células Jurkat com óxido de fenilarsina (PAO), um inibidor de PTPases, impediu a desfosforilação induzida por ameba, indicando que fosfatases do parasito são os responsáveis pelos efeitos observados nestas células (TEIXEIRA e MANN, 2002).

## **2.6. Funções Biológicas Associadas à Proteína Tirosina Fosfatases de Patógenos**

Os níveis de fosforilação/desfosforilação de resíduos tirosina, serina e treonina modulam vias de sinalização críticas que podem gerar múltiplas respostas celulares funcionais (GOMES *et al.*, 2011). Estes eventos são altamente controlados por proteína cinases e fosfatases (HUNTER, 1995). Mudanças no estado de fosforilação alteram muitos processos celulares, a exemplo de transcrição, tradução, transporte e fluxo de energia, ciclo celular, fagocitose, e a resposta imune inata a patógenos (LINDMO e STENMARK, 2006; MANNING *et al.*, 2002 a, b; RYAN e SHAPIRO, 2003). Mudanças neste perfil de fosforilação que alterem funções determinantes na célula do hospedeiro, como a eliminação de patógenos, podem levar ao desenvolvimento do estado de doença (MANNING *et al.*, 2002 b).

Interferência na maquinaria de sinalização celular é uma estratégia usada por muitos microorganismos como uma maneira de evadir ou inibir os mecanismos celulares de defesa do hospedeiro (GUAN e DIXON, 1990; NANDAN *et al.*, 2000). Estes patógenos apresentam a capacidade de modular eventos de fosforilação de tirosina na célula alvo pela secreção ou ativação de proteína tirosina fosfatases (PTPases). Estudos têm demonstrado que ativação de PTPases e desfosforilação são associadas com desativação e morte celular (BLANCHETTE *et al.*, 1999; NANDAN *et al.*, 2000; PEREZ *et al.*, 1999).

Fosfatases capazes de desfosforilar resíduos fosfotirosil pertencem a três classes evolutivamente diferentes: proteína tirosina fosfatases (PTPs), Cdc 25 e fosfatases de baixo peso molecular (ANDREEVA e KUTUZOV, 2008). Eles possuem o motivo CX<sub>5</sub>R em comum em seu centro catalítico e utilizam o resíduo cisteína para gerar um intermediário tiol-fosfato durante a catálise (DENU e DIXON, 1998). PTPs são subdivididas em clássicas do tipo receptor (apresenta um domínio transmembrana) e do tipo não-receptor (não apresenta esse domínio), caracterizando-se como enzimas aptas a desfosforilar apenas proteínas que contenham grupos fosfato em seu aminoácido tirosina, e em 'dual-specific', que podem hidrolisar fosfatos de

diferentes combinações de resíduos tirosina, serina ou treonina, bem como substratos não protéicos (ALONSO, 2004).

Proteínas que hidrolisam resíduos fosfotirosil apresentam um importante papel na sobrevivência de bactérias no hospedeiro humano. Dados da literatura indicam uma inibição da liberação de intermediários reativos de oxigênio de leucócitos polimorfonucleares pela fosfatase ácida de *Coxiella burnetii* (HILL e SAMUEL, 2011; LI *et al.*, 1996). Outras bactérias patogênicas, a exemplo de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhi*, utilizam estas proteínas para desorganizar estruturas do citoesqueleto da célula do hospedeiro, como filamentos de actina (ARRICAU *et al.*, 1997; KASTNER *et al.*, 2011), a qual provavelmente interfere diretamente na fagocitose de bactérias, como *Yersinia pseudotuberculosis* (BLISKA, 2000). Além disso, *Yersinia* apresenta uma PTPase YopH, a qual através da desfosforilação de proteínas, desempenha papel crucial na resistência desta bactéria à morte dentro de células fagocíticas (PERSON, 1997).

Diversos estudos têm demonstrado a presença de fosfatases na superfície de protozoários parasitas, conhecidas como ectofosfatases. A natureza molecular destas enzimas em muitos casos ainda não foi elucidada, porém há muitos indícios de que seu papel esteja vinculado à desfosforilação de substratos em células-alvo do hospedeiro (ANDREEVA e KUTUZOV, 2008). Segundo Gomes e colaboradores (2011), alguns critérios devem ser utilizados para a inclusão de uma proteína como uma ectoenzima, tais como a atuação da mesma em substrato presente no meio extracelular, com o produto da reação sendo liberado neste ambiente; a integridade celular é mantida durante a atividade enzimática, porém a enzima não é liberada extracelularmente; A atividade enzimática pode ser alterada por moduladores que não permeiam a membrana plasmática.

Em *Leishmania amazonensis*, uma ectofosfatase presente na superfície de amastigotas é capaz de reverter a fosforilação de ERK1, uma MAP cinase, de macrófagos infectados (MARTINY *et al.*, 1999). Atividade ectofosfatase também tem sido demonstrada em espécies de *Trypanosoma*. Em *T. brucei*, uma única ectofosfatase tem sido clonada e caracterizada como uma proteína tirosina fosfatase que catalisa, de modo mais eficiente, a hidrólise de fosfato em pH ácido (BAKALARA *et al.*, 2000). Houve detecção desta atividade também em estágios infectivos do protozoário parasita *T. cruzi* (FURUYA *et al.*, 1998). A atividade ectofosfatásica foi detectada através da utilização de diferentes aminoácidos fosforilados como substrato em *Giardia lamblia*.

Observou-se neste parasito que a atividade enzimática é específica para fosfotirosinas, e que a utilização de um inibidor específico reduziu, de forma significativa, a capacidade de encistamento do trofozoíto (AMAZONAS *et al.*, 2009).

No que concerne a *Entamoeba histolytica*, um estudo de Teixeira e Mann (2002) demonstra uma rápida diminuição nos níveis de fosforilação em resíduos de tirosina em proteínas de linfócitos T após o contato com o parasito. A desfosforilação de tirosina foi inibida pela adição de galactose, indicando que este evento é provavelmente mediado por receptor. Análises de proteínas fosfatases purificadas de *E. histolytica*, demonstraram que na interação com células HeLa, há despolarização e desorganização dos filamentos de actina, com perda de adesão celular, indicando um possível papel destas enzimas na patogenicidade (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2003; ANAYA-RUIZ *et al.*, 2003). Alguns trabalhos têm caracterizado fosfatases acidófilas<sup>1</sup> presentes em *E. histolytica*; sendo uma atividade fosfatase ligada à membrana (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2000; ANAYA-RUIZ *et al.*, 1997) e uma secretada no meio de cultura, bem como na interface celular do abscesso amebiano hepático (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 1997; VENTURA-JUÁREZ *et al.*, 2000). Além disso, existem algumas evidências de que *E. dispar* contém, mas não secreta fosfatase ácida como *E. histolytica* (TALAMÁS-ROHANA *et al.*, 1999). Em um trabalho realizado por De Sá-Pinheiro e colaboradores (2007), observou-se que existe uma correlação positiva entre a atividade ectofosfatásica do parasito e a sua virulência.

Dois genes que codificam para proteína tirosina fosfatases de *E. histolytica* foram clonados e parcialmente caracterizados por Herrera-Rodríguez e colaboradores (2006). *EhPTPA* e *EhPTPB* apresentaram identidade de 37% na sequência de aminoácidos com PTPases transmembrana de vertebrados, contendo o motivo catalítico conservado (I/V)HCSAGXGR(S/T)G das fosfatases. Além disso, aparentemente são proteínas solúveis, visto que não foi encontrada sequencias que fossem associadas à membrana. Houve um aumento discreto na expressão gênica de *EhPTPB* em trofozoítos após isolamento de abscessos hepáticos améebicos induzidos experimentalmente em hamsters. Contudo, os níveis de RNAm para o gene *EhPTPA* aumentaram em cerca de sete vezes em trofozoítos após infecção.

Pelo exposto, o estudo destas enzimas em *E. histolytica* pode revelar importantes estratégias do patógeno e mecanismos fisiopatológicos da infecção amebiana.

---

<sup>1</sup> Na presente tese os termos acidófila/acidofílica ou alcalófila foram utilizados ao invés da ácida ou alcalina. Tal opção encontra apoio no fato de que as enzimas *per se* não são ácidas ou alcalinas, mas tem seu pH ótimo de funcionamento, respectivamente, em valores de pH ácidos e alcalinos.

### 3. OBJETIVOS

---

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel de proteína tirosina fosfatases em diferentes isolados de *Entamoeba histolytica*, buscando a compreensão dos mecanismos envolvidos durante a amebíase invasiva.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Avaliar a suscetibilidade parasitária de três diferentes isolados de *Entamoeba histolytica* aos moduladores da sinalização celular através de ensaios de proliferação;
- 3.2.2. Determinar a concentração inibitória de 50% da atividade proliferativa (IC<sub>50</sub>) dos inibidores específicos através de curvas concentração-resposta;
- 3.2.3. Avaliar a atividade ectofosfatásica de cepas de *E. histolytica* que apresentam perfis de patogenicidade distintos, bem como a sua sensibilidade a antagonistas específicos;
- 3.2.4. Analisar o perfil de secreção de fosfatases de cepas de *E. histolytica*, pela quantificação desta atividade no sobrenadante de culturas;
- 3.2.5. Avaliar ultraestruturalmente a distribuição de fosfatases acidófilas em diferentes isolados de *E. histolytica* pela técnica de citoquímica enzimática e analisar os efeitos dos moduladores da sinalização celular na biologia do parasito;
- 3.2.6. Analisar os efeitos destes moduladores em mecanismos envolvidos na patogenicidade deste protozoário, a exemplo de fagocitose e efeito citopático;
- 3.2.7. Purificar proteínas tirosina fosfatases de trofozoítos de *E. histolytica*, objetivando a compreensão dos mecanismos inibitórios exercidos pelos antagonistas específicos.

## 4. METODOLOGIA

---

### 4.1. Substâncias utilizadas

**Moduladores da sinalização celular:** o potássio bisperoxo(bipiridina)oxovanadato (V) [bpV(bipy)], dipotássio bisperoxo(5-hidroxipiridina-2-carboxil)oxovanadato (V) [bpV(Hopic)], potássio bisperoxo (1,10-fenantrolina)oxovanadato (V) [bpV(phen)], dipotássio bisperoxo (picolinato) oxovanadato (V) [BpV(pic)], monoperoxo (picolinato) oxovanadato (V) [mpV(pic)], bis(N,N-dimetilhidroxamido) hidroxooxovanadato (DMHV), ortovanadato de sódio (NaVO<sub>4</sub>), 4-metilumbeliferil fosfato (4-MUP), estibogluconato de sódio (NaSbV), defostatina e óxido de fenilarsina foram obtidos da Calbiochem (San Diego, Califórnia, EUA). As respectivas fórmulas estruturais estão dispostas no apêndice da presente tese.

### 4.2. Cepas utilizadas de *E. histolytica*

As linhagens utilizadas neste estudo foram fornecidas pela Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Aparecida Gomes, do Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais.

A cepa HM1:IMSS, isolada em 1967 no México de um paciente que apresentava colite disentérica, foi utilizada como referência. A cepa ICB – CSP foi isolada em 21 de maio de 1972 de uma paciente sintomática procedente do estado da Bahia, que apresentava disenteria mucosanguinolenta com 12 a 15 evacuações diárias. O isolamento da cepa ICB – 452 foi realizado dia 07 de janeiro de 1983, de uma criança assintomática, residente em Minas Gerais (SILVA, 1997).

### 4.3. Cultivo de *E. histolytica* e análise da proliferação celular

Trofozoítos das cepas HM1:IMSS, ICB – CSP e ICB – 452 de *E. histolytica* foram axenicamente cultivados em meio YI-S-33, pH 6,9, suplementado com 3% de vitamina Diamond, 20% (volume/volume) de soro bovino adulto (SBA), 60 µg/mL de penicilina e 500 µg/mL de estreptomicina à temperatura de 37 °C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, por 48 a 72 horas. Para análise da proliferação celular, inóculos de 2,5 a 5 x 10<sup>4</sup> trofozoítos de *E. histolytica* foram incubados a 37 °C em placas de 24 poços em presença ou ausência de diferentes concentrações de inibidores de PTPases. Cerca de 700µL de óleo mineral foi utilizado em cada um dos poços para promoção da diminuição das tensões de O<sub>2</sub> no meio de cultura, permitindo a proliferação deste parasito (PIRES-SANTOS *et al.*, 2012, apêndice). A atividade proliferativa foi avaliada pela observação em microscópio invertido e quantificada durante a fase logarítmica (48 ou 72

horas), pelo método colorimétrico desenvolvido por Busatti e Gomes (2007).

Em resumo, o sobrenadante contendo o meio de cultura e o óleo mineral é retirado e cada poço é lavado, cuidadosamente, duas vezes com 1 mL de salina tamponada com  $\text{PO}_4$  (PBS) à 37 °C, pH 7,2. Imediatamente após, os trofozoítos aderidos à placa foram fixados com 1 mL de metanol por 10 minutos. Em seguida nova lavagem foi realizada, com 1 mL de PBS, para retirar o excesso de metanol. As células foram coradas com 500  $\mu\text{L}$  de azul de metileno a 0,1% em tampão borato 0,1 M, pH 8,7 por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por meio de sucessivas lavagens com 1 mL do mesmo tampão e o corante associado aos trofozoítos foi extraído pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de HCl a 0,1 M, por 10 minutos. A leitura foi realizada a 650 nm no leitor de ELISA VERSA max, Molecular Devices.

O percentual de proliferação foi calculado através da seguinte equação:

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

O cálculo do percentual de inibição se deu através da equação abaixo. Em seguida, os dados são plotados no GraphPad Prism 5.0, determinando-se a  $\text{IC}_{50}$ :

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

#### **4.4. Avaliação da viabilidade celular através da técnica do MTT**

Inóculos de  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* foram cultivados por 1 hora em 4 mL de meio YI-S-33, suplementado com 20% de SBA. Em seguida, o mesmo foi substituído pelo mesmo volume de meio RPMI, adicionando-se 400  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa contendo 5 mg/mL de 3,(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), sob diferentes condições. Após 1 hora de incubação, as células passaram por um banho de gelo por 15 minutos e foram centrifugadas a 200 g, por 5 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 1 mL de DMSO. Nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições anteriormente citadas e procedeu-se a leitura do sobrenadante a 570 nm, em leitor de ELISA VERSAmax, Molecular Devices.

#### 4.5. Avaliação da atividade ectofosfatásica

Inóculos de  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* foram incubados por 40 minutos em 1 mL de uma solução tampão contendo 116 mM de NaCl, 5,4 mM de KCl, 5,5 mM de glicose e 5,0 mM de Hepes, em pH 7,2. Foi adicionado à solução 5 mM de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP). Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu$ L de NaOH a 2 N. A leitura foi determinada pela detecção espectrofotométrica de *p*-nitrofenol a 405 nm, em leitor de ELISA VERSAmax Molecular Devices. A viabilidade celular foi avaliada por exclusão de corante, através da utilização de 0,04% de azul trypan.

#### 4.6. Avaliação da atividade fosfatásica do sobrenadante de culturas de *E. histolytica*

Trofozoítos de *E. histolytica* foram lavados e mantidos em cultura por 8 – 10 horas em meio YI-S-33 sem SBA. Após, 100  $\mu$ L do sobrenadante foi incubado a 37 °C, por 40 minutos em uma solução contendo 10 mM de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) e 200 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,5. Após o período de incubação, a reação foi interrompida com a adição de 2 N de NaOH. A hidrólise foi determinada pela detecção espectrofotométrica de *p*-nitrofenol a 405 nm, utilizando um coeficiente de extinção de  $14,3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A viabilidade celular foi avaliada por exclusão de corante, através da utilização de 0,04% de azul trypan.

#### 4.7. Citoquímica para detecção de fosfatase ácida por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As amostras foram fixadas com uma solução de 1% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 10 minutos. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com o mesmo tampão utilizado no fixador e, em seguida em tampão acetato de sódio a 10 mM, pH 5,0. Posteriormente as amostras foram incubadas com 0,22 mg/mL de  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM de cloreto de cério ( $\text{CeCl}_2$ ) e 5% de sacarose em tampão acetato de sódio a 10 mM, pH 5,0 por 40 minutos à 37 °C. Imediatamente após, as células foram lavadas uma vez em tampão acetato de sódio a 10 mM, pH 5,0, em seguida em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4 e novamente fixadas em 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído, 5% de sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 1 hora à temperatura ambiente. Após o período de fixação as células foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de

ferrocianeto de potássio e 5 mM de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) no mesmo tampão utilizado para o fixador e a desidratação ocorreu em concentrações crescentes de acetona. A inclusão foi realizada em resina epoxi Polybed (Polysciences). Após polimerização por cerca de 60 horas, cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre de malha 300. As grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 a 80kV e Jeol 1230 a 80 kV.

#### **4.8. Isolamento e lavagem de eritrócitos**

Aproximadamente 25 mL de sangue humano da circulação periférica foram coletados e transferidos para tubos cônicos de 50 mL. Após adição de meio RPMI 1610 ao tubo, deu-se procedimento à centrifugação por 10 minutos a 560 g, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi retirado juntamente com a camada de leucócitos ('buffy coat'). Esse processo foi realizado por 3 vezes até que o sobrenadante ficasse límpido. Houve a homogeneização dos eritrócitos, na proporção de 1:1, com meio RPMI 1610. Os eritrócitos ficaram armazenados em geladeira a 4 °C, por no máximo 20 dias.

#### **4.9. Ensaio de eritrofagocitose**

Inóculos de  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* foram pré-tratados por 1 hora com diferentes inibidores de PTPases. Imediatamente após, as amebas foram lavadas em meio YI – S – 33 a 37 °C e incubadas na presença de  $2 \times 10^6$  eritrócitos, por 15 minutos. Após o período de interação, foi promovida uma lavagem em PBS, seguida de uma lise hipotônica das hemácias que não foram fagocitadas. As células foram então fixadas com 3,7% de paraformaldeído por 40 minutos. Em seguida, duas lavagens em uma solução contendo 50 mM de Tris, pH 9,3 foram realizadas, com posterior ressuspensão em 0,5 mL de 8,4 mM de diaminobenzidina (DAB), 0,05% de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em tampão Tris, pH 9,3. A reação foi parada pela adição de 1 mL do mesmo tampão, havendo substituição desta solução por 70% de Glicerol/PBS. A eritrofagocitose foi visualizada em microscópio óptico Olympus IX71. Em cada poço foram analisados 3 campos, totalizando uma média de contagem de 400 células por poço. Os índices de fagocitose foram calculados através do percentual de amebas que realizaram fagocitose, dividido pelo total de amebas e multiplicado pela proporção de hemácias fagocitadas por célula (FADOK *et al.*, 1992).

#### **4.10. Ensaio qualitativo para determinação do efeito citopático de trofozoítos de *E. histolytica***

Inóculos de  $1 \times 10^5$  células MDCK foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 48 – 72 horas, em lamínulas presentes nas placas de 24 poços. Após atingir o período em que as células se encontravam em monocamada,  $1 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* que foram pré-tratados com diferentes inibidores de PTPases foram incubados por 1 hora com a monocamada de células MDCK. Em seguida, as lamínulas foram fixadas em 10% de formol em PBS, seguida por uma coloração por HE. As lâminas foram observadas no microscópio Olympus IX71.

#### **4.11. Quantificação do efeito citopático promovido por trofozoítos de *E. histolytica***

Após a interação realizada entre a monocamada de células MDCK e trofozoítos de *E. histolytica* por 1 hora, as placas de 24 poços foram colocadas por cerca de 20 minutos em banho de gelo para promover o destacamento dos parasitos aderidos às células de mamífero. Em seguida os poços foram lavados por duas vezes em PBS gelado e fixados em metanol por 10 minutos. Imediatamente após o período de fixação, as células foram novamente lavadas em salina tamponada e coradas com 0,1% de azul de metileno em tampão borato 0,1 M, pH 8,7, por 10 minutos. Sucessivas lavagens em tampão borato foram realizadas para remover o excesso de corante presente nos poços. O corante foi extraído das células que permaneceram nos poços através da adição de 500  $\mu$ L de HCl 0,1 M e quantificado espectrofotometricamente a 650 nm em leitor de ELISA VERSAmax, Molecular Devices.

#### **4.12. Purificação de proteínas fosfatases da fração solubilizada de *E. histolytica***

A enzima foi purificada de acordo com o protocolo descrito por Aguirre-García e colaboradores (2000). Brevemente, inóculos de  $1 \times 10^7$  trofozoítos de *Entamoeba histolytica* foram lisados em tampão contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1% 2- $\beta$  mercaptoetanol, 2 mg/mL de leupeptina, 10  $\mu$ g/mL de aprotinina e 5  $\mu$ g/mL de pepstatina em sonicador, a uma potência de 30% por 3 vezes consecutivas, em um período de tempo de 2 minutos, com intervalos entre os ciclos de 5 minutos. As amostras foram posteriormente centrifugadas a 16.000 g por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante contendo componentes solúveis foi descartado e o precipitado foi solubilizado no mesmo tampão descrito

acima, acrescido de 2% de Triton X – 100 e 2 mM de EDTA. A fração solubilizada foi aplicada a uma coluna de Concanavalina A (Con A)-sefaroze previamente equilibrada com uma solução contendo 20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 50 mM de NaCl. A eluição da enzima ocorreu com a adição ao mesmo tampão de 0,1 M de metil- $\alpha$ -D-manopiranosídeo ( $\alpha$ -MM). Após a cromatografia por afinidade, foi utilizada uma coluna de troca aniônica (DEAE-celulose), equilibrada com 10 mM de Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10  $\mu$ M de  $\alpha$ -MM, pH 7,0. Um gradiente de NaCl (50 – 400 mM) em 10 mM de Tris-HCl contendo 10  $\mu$ M de  $\alpha$ -MM, pH 7,0, foi utilizado para a eluição da enzima. Para avaliação da atividade fosfatásica das frações purificadas, foi realizado o procedimento descrito no item 4.6.

#### **4.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As proteínas presentes nas diferentes etapas de purificação e que apresentaram atividade fosfatásica após passagem pela coluna de DEAE-celulose foram separadas em gel de SDS-poliacrilamida a 10% e marcados com o corante azul de coomassie, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O padrão pré-marcado utilizado continha bandas com peso molecular entre 216 e 7,6 KDa (Kaleidoscope Prestained Standards, BIO-RAD). A concentração de proteína presente nas frações coletadas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

#### **4.14. Análise estatística**

Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.00 – GraphPad Software Incorporate. Os grupos foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA e pós-teste de Tukey, com nível de significância de  $p < 0,05$ . Todos os experimentos, exceto os realizados para microscopia eletrônica de transmissão, foram realizados no mínimo em triplicata, com pelo menos três repetições independentes.

#### **4.15. Sujeitos da pesquisa**

Indivíduos saudáveis, de ambos os sexos, residentes em Salvador – Bahia, maiores de 18 anos e acima de 50 kg foram convidados a participar do estudo através da doação de 25 mL de

sangue periférico. Os critérios de exclusão foram indivíduos não saudáveis, que apresentavam histórico prévio para amebíase invasiva, menores de 18 anos, peso inferior a 50 kg ou estivessem ligados diretamente ao projeto. Não foram testados produtos farmacêuticos novos, sendo todos os testes realizados *in vitro*. Os doadores voluntários recrutados são alunos da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e as coletas foram realizadas na sala do Núcleo de Saúde do Trabalhador (NUST) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ).

#### **4.16. Considerações Éticas**

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA, sendo aprovado sob o número de protocolo número 271 e estando de acordo com os princípios de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça. Os doadores de sangue foram convidados a participar e quando estavam de acordo, assinavam o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE, anexo 2). O procedimento utilizado para coleta de amostras de sangue (25 mL) foi o puncionamento de uma veia periférica do doador, com material estéril. Todos os esclarecimentos necessários sobre as possíveis dores e desconfortos gerados pela coleta foram fornecidos. Foi garantida a confidencialidade e privacidade dos dados. Aos sujeitos da pesquisa foi garantido que o material coletado foi de uso exclusivo para a finalidade prevista no protocolo de pesquisa. Os resultados obtidos foram e serão publicados em anais de congressos e em revistas especializadas de cunho científico.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Efeito de inibidores de proteína tirosina fosfatases na proliferação de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

Com o objetivo de avaliarmos a sensibilidade de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* aos diferentes moduladores da sinalização celular, a análise da capacidade proliferativa deste protozoário na presença destes compostos foi realizada.

Trofozoítos de *E. histolytica* da linhagem HM1:IMSS incubados por 48 horas com 50  $\mu$ M de cada substância (à exceção da defostatina, com concentração de 5  $\mu$ M), apresentaram atividade proliferativa semelhante ao controle, exceto em um dos derivados de vanádio, o bpV(phen), com manutenção do percentual da atividade original de 63,05%. Este mesmo efeito foi observado em células tratadas com óxido de fenilarsina (PAO), que demonstrou um efeito antiproliferativo ainda maior, restando apenas 3,27% da atividade em comparação ao controle (tabela 1). Este mesmo perfil foi encontrado para a cepa ICB – CSP (tabela 2), nas mesmas concentrações utilizadas e igual período de incubação da linhagem HM1:IMSS. Os percentuais de crescimento para o bpV(phen) foram em média de 4,16%, muito abaixo dos valores encontrados para a cepa HM1:IMSS, porém para o PAO foram observados níveis equivalentes de crescimento, com percentual médio de 3,46%. Os demais compostos testados nesta linhagem isolada de paciente sintomático obtiveram taxas de crescimento de, no mínimo, 74,55%. A cepa isolada de paciente assintomático ICB – 452, apesar de apresentar um crescimento mais lento, não diferiu com relação ao efeito de outros compostos, com taxas de crescimento para o bpV(phen) e PAO de, respectivamente, 18,79% e 2,07%. As outras substâncias testadas nesta linhagem mantiveram os seus níveis de crescimento acima de 85% (tabela 3).

**Tabela 1.** Avaliação colorimétrica da proliferação de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, cepa HM1:IMSS, na presença de diferentes moduladores da sinalização celular.

Modulador <sup>1</sup>	Absorbância (Média ± Erro Padrão)	Proliferação (%)
Controle	3,01 ± 0,02	100
0,5% DMSO	3,06 ± 0,02	101,49
Vanadato	3,09 ± 0,03	102,52
bpV(phen)	1,90 ± 0,09	63,05
bpV(pic)	3,08 ± 0,06	102,02
bpV(bipy)	3,11 ± 0,02	103,05
bpV(hopic)	3,16 ± 0,01	104,87
mpV(pic)	3,07 ± 0,02	101,79
NaSbV	3,09 ± 0,03	102,49
DMHV <sup>2</sup>	3,11 ± 0,03	103,22
4-MUP	3,06 ± 0,04	101,66
Defostatina <sup>2</sup>	2,99 ± 0,01	100,86
PAO <sup>2</sup>	0,10 ± 0,01	3,27

Os ensaios foram realizados com inóculos de  $2,5 \times 10^4$ /mL trofozoítos, em meio YI-S-33 suplementado com 20% de SBA, por um período de 48 horas;

<sup>(1)</sup> Os moduladores foram testados a uma concentração de 50  $\mu$ M, à exceção da defostatina, que foi avaliada a 5  $\mu$ M;

<sup>(2)</sup> A diluição destes compostos foi realizada em DMSO.

**Tabela 2.** Avaliação colorimétrica da atividade proliferativa de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, linhagem ICB – CSP, em presença de moduladores da sinalização celular.

Modulador <sup>1</sup>	Absorbância (Média ± Erro Padrão)	Proliferação (%)
Controle	2,33 ± 0,06	100
0,5% DMSO	2,66 ± 0,08	113,84
Vanadato	2,69 ± 0,12	115,47
bpV(phen)	0,10 ± 0,05	4,16
bpV(pic)	2,45 ± 0,05	104,88
bpV(bipy)	2,25 ± 0,14	96,44
bpV(hopic)	2,39 ± 0,06	102,36
mpV(pic)	1,84 ± 0,02	79,01
NaSbV	2,12 ± 0,22	90,79
DMHV <sup>2</sup>	2,01 ± 0,18	85,95
4-MUP	1,74 ± 0,10	74,55
Defostatina <sup>2</sup>	1,90 ± 0,02	81,58
PAO <sup>2</sup>	0,08 ± 0,01	3,46

Inóculos de  $2,5 \times 10^4$ /mL foram cultivados por 48 horas em meio YI-S-33, suplementado com 20% de SBA, para análise da capacidade proliferativa;

<sup>(1)</sup> À exceção da defostatina, que foi testada na concentração de 5  $\mu$ M, todos os moduladores foram avaliados a 50  $\mu$ M;

<sup>(2)</sup> Os compostos foram diluídos em DMSO.

**Tabela 3.** Análise colorimétrica da proliferação de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, cepa ICB – 452, em presença de moduladores da sinalização celular.

Modulador <sup>1</sup>	Absorbância (Média ± Erro Padrão)	Proliferação (%)
Controle	3,24 ± 0,01	100
0,5% DMSO	3,21 ± 0,02	99,17
Vanadato	3,23 ± 0,04	99,69
bpV(phen)	0,61 ± 0,07	18,79
bpV(pic)	3,21 ± 0,07	99,17
bpV(bipy)	3,09 ± 0,06	95,28
bpV(hopic)	3,15 ± 0,02	97,38
mpV(pic)	3,26 ± 0,03	100,78
NaSbV	3,30 ± 0,01	101,73
DMHV <sup>2</sup>	3,18 ± 0,03	98,15
4-MUP	2,89 ± 0,08	89,13
Defostatina <sup>2</sup>	3,07 ± 0,04	94,69
PAO <sup>2</sup>	0,07 ± 0,01	2,07

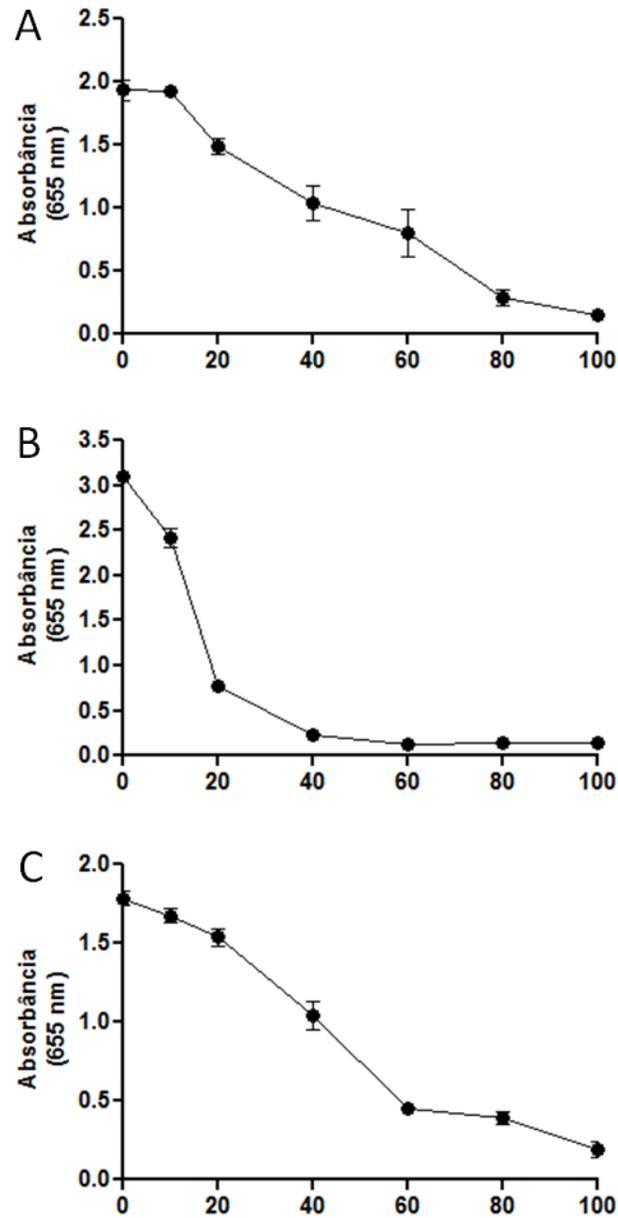
A avaliação da capacidade proliferativa foi realizada em meio YI-S-33 suplementado com 20% de SBA e inóculos de  $2,5 \times 10^4$  células/mL, por um período de 72 horas;

<sup>(1)</sup> A concentração dos moduladores utilizada para os ensaios foi de 50  $\mu$ M, à exceção da defostatina, que foi testada a 5  $\mu$ M;

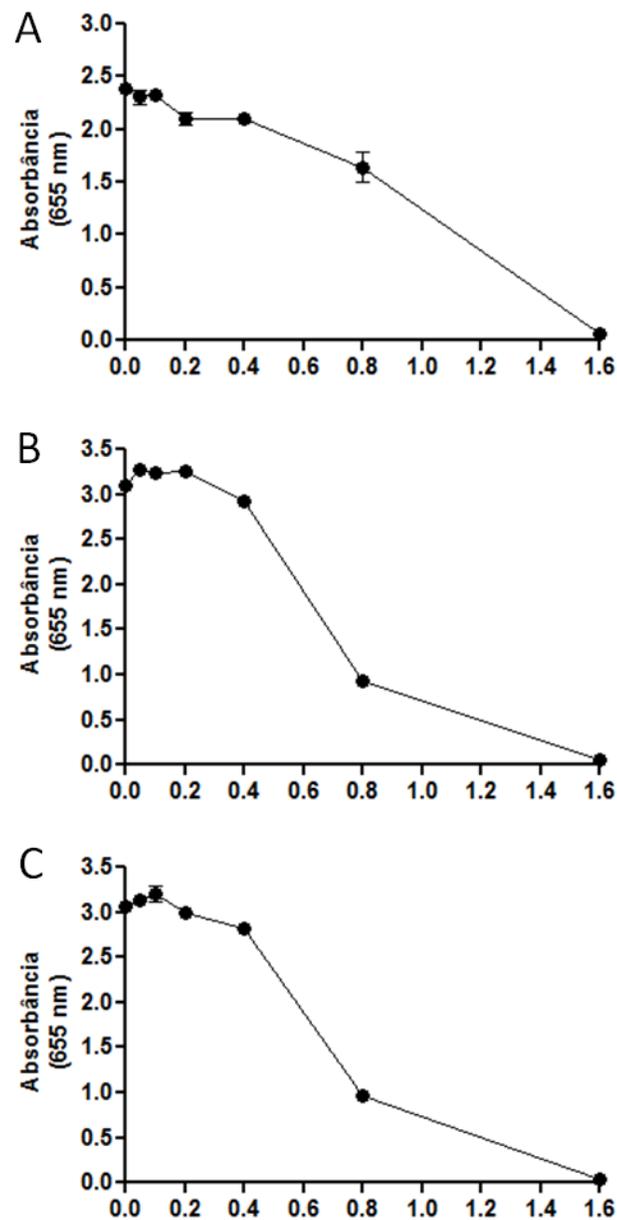
<sup>(2)</sup> O DMSO foi utilizado como solvente destes compostos.

## 5.2. Avaliação da suscetibilidade parasitária para determinação da IC<sub>50</sub>

Após a avaliação do efeito dos moduladores da sinalização celular na atividade proliferativa em trofozoítos de *E. histolytica*, foram realizadas curvas concentração-resposta dos compostos mais efetivos na inibição do crescimento do parasito, objetivando a determinação da IC<sub>50</sub> para cada cepa analisada neste estudo. Os experimentos foram realizados em concentrações de 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM para o bpV(phen) e 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 µM para o PAO, por um período de incubação de 48 horas. Nas concentrações utilizadas, o bpV(phen) apresentou um efeito concentração-dependente (figura 2), com valores de IC<sub>50</sub> de, respectivamente, 38,4 µM, 17,89 µM e 42,08 µM para as linhagens HM1:IMSS, ICB – CSP e ICB – 452 (tabela 4). A cepa ICB – CSP apresentou uma suscetibilidade a este derivado de vanádio cerca de duas vezes maior, em comparação às outras duas cepas testadas. Além disso, a partir de 60 µM, este inibidor não reduz a proliferação celular para a linhagem em questão (figura 2 B), o que possivelmente indica que este composto atingiu a sua concentração inibitória mínima (MIC). Os trofozoítos de *E. histolytica* tratados com PAO apresentam valores de IC<sub>50</sub> em concentrações nanomolares, o que evidencia uma maior sensibilidade a este composto, em comparação ao bpV(phen). Para as cepas ICB – 452 e ICB – CSP, o valor foi 0,64 µM (tabela 4), enquanto que para a cepa HM1:IMSS a IC<sub>50</sub> foi de 0,90 µM (tabela 4). Nas concentrações usadas observou-se uma relação de concentração-dependência para as três cepas utilizadas neste experimento (figura 3 A, B e C). Valores destes compostos próximos à IC<sub>50</sub> não alteraram a viabilidade dos trofozoítos da cepa HM1:IMSS, quando incubados por 60 minutos (figura 4).



**Figura 2.** Avaliação da suscetibilidade parasitária de trofozoítos de *E. histolytica* ao derivado de vanádio bpV(phen) através de análise da proliferação celular. Trofozoítos das cepas HM1:IMSS (A), ICB - CSP (B) e ICB - 452 (C) incubados por 48 horas em diferentes concentrações micromolares de bpV(phen) (abscissas). Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

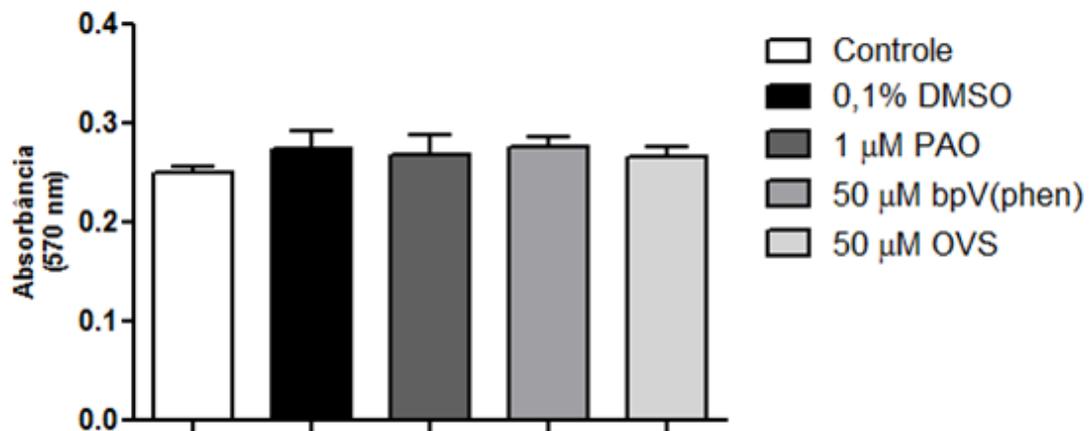


**Figura 3. Análise da suscetibilidade ao inibidor PAO de trofozoítos de *E. histolytica* através de ensaios de proliferação celular.** As cepas HM1:IMSS (A), ICB - CSP (B) e ICB - 452 (C) foram incubadas com diferentes concentrações de PAO (abscissas), por um período de 48 horas. Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

**Tabela 4.** Valores de  $IC_{50}^1$  do derivado de vanádio bpV(phen) e PAO determinados por ensaios de inibição da capacidade proliferativa em diferentes cepas de *Entamoeba histolytica*.

Linhagem	Modulador	
	bpV(phen)	PAO
HM1:IMSS	38,40 $\mu$ M	0,90 $\mu$ M
ICB – CSP	17,89 $\mu$ M	0,64 $\mu$ M
ICB – 452	42,08 $\mu$ M	0,64 $\mu$ M

<sup>(1)</sup> A determinação da  $IC_{50}$  foi realizada a partir da análise da proliferação celular das diferentes linhagens de *E. histolytica*, por um período de 48 horas de incubação.



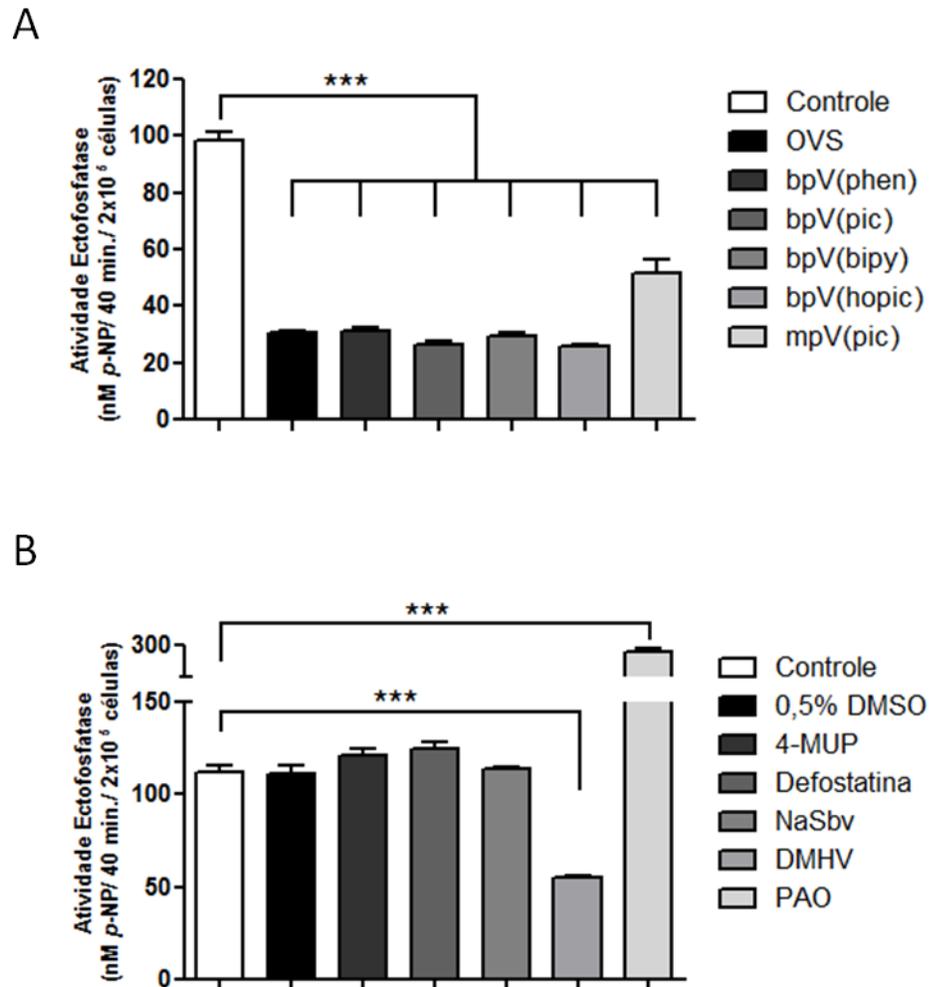
**Figura 4.** Avaliação da viabilidade de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* através da técnica do MTT. Células da linhagem HM1:IMSS foram incubadas por 60 minutos em meio RPMI, sob diferentes condições de tratamento. A redução do composto foi avaliada espectrofotometricamente a 570 nm. As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA,  $p > 0,05$ ).

### **5.3. Efeito de moduladores da sinalização celular na atividade ectofosfatásica de trofozoítos de *E. histolytica***

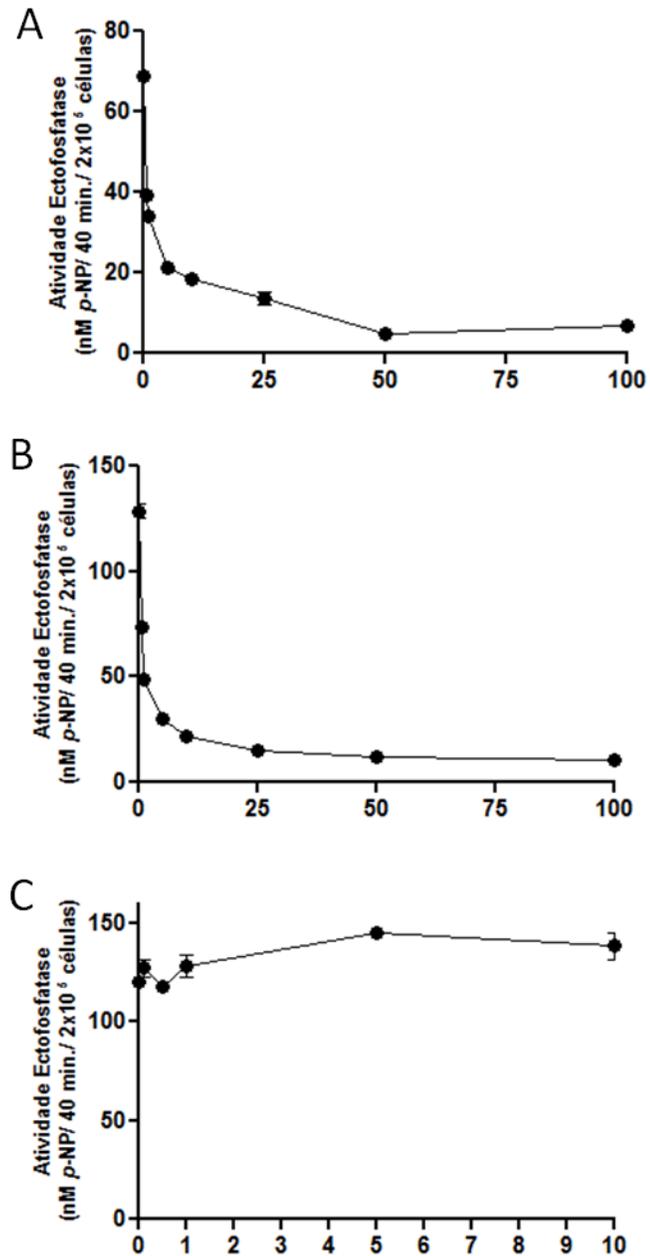
Visando o entendimento dos mecanismos pelos quais as substâncias testadas na atividade proliferativa exercem seus efeitos na biologia do parasito, nós avaliamos o perfil da atividade ectofosfatásica de trofozoítos de *E. histolytica* na presença destes moduladores. A análise enzimática de PTPases na superfície de trofozoítos da cepa HM1:IMSS foi realizada pela adição de 5 mM do substrato *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), por um período de 40 minutos.

Os derivados de vanádio, a uma concentração de 50  $\mu$ M, apresentaram uma alta inibição da atividade fosfatásica, havendo redução superior a 68% da atividade enzimática, à exceção do mpV(pic), que apresentou um percentual de inibição da atividade de PTPases de 52,54% (figura 5 A). Contudo, em relação aos outros compostos testados, apenas o DMHV apresentou inibição estatisticamente significativa da atividade, com inibição em média de 51% (figura 5 B). Houve um aumento de aproximadamente 43% da atividade ectofosfatásica em trofozoítos tratados com 50  $\mu$ M de PAO. Os demais apresentaram níveis de atividade comparáveis ao controle.

Ensaio com diferentes concentrações de vanadato, bpV(phen) e PAO foram realizados com o objetivo de avaliar se a inibição enzimática de PTPases presentes na superfície do parasito é dependente de concentração. Utilizando o mesmo procedimento anterior, observou-se que nas concentrações entre 0,5 a 100  $\mu$ M, a inibição de PTPases pelo vanadato e bpv(phen) é concentração-dependente (figuras 6 A e 6 B, respectivamente), enquanto que mesmo em concentrações nanomolares, numa faixa que variou entre 0,1 e 10  $\mu$ M, esta inibição não foi observada em células tratadas com PAO (figura 6 C).



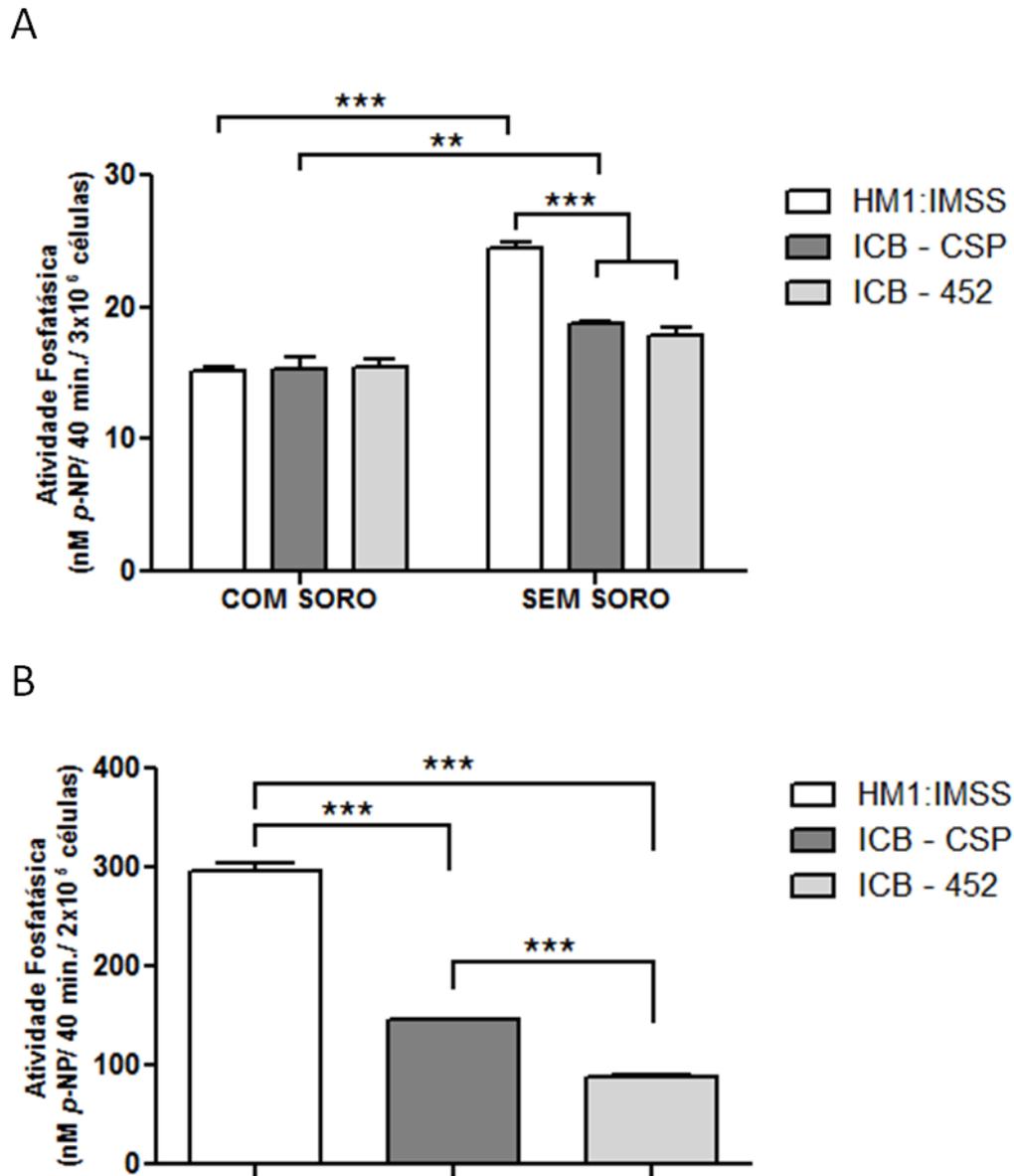
**Figura 5. Determinação da atividade ectofosfatásica de trofozoítos de *E. histolytica* incubados com diferentes moduladores da sinalização celular.** Células viáveis da linhagem HM1:IMSS foram incubadas por um período de 40 minutos, na presença do substrato *p*-nitrofenilfosfato. (A) Atividade ectofosfatásica de  $2 \times 10^5$  trofozoítos tratados com  $50 \mu\text{M}$  de vanadato ou derivados de vanádio. (B) Quantificação da atividade ectofosfatásica de  $2 \times 10^5$  células expostas a  $50 \mu\text{M}$  de diferentes moduladores da sinalização celular. As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA, \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 6.** Avaliação dos efeitos de inibidores de proteína tirosina fosfatases na atividade ectofosfatásica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. Inóculos de  $2 \times 10^5$  células da linhagem HM1:IMSS foram incubadas por 40 minutos com o substrato *p*-nitrofenilfosfato e diferentes concentrações micromolares de ortovanadato de sódio (A), bpV(phen) (B) e PAO (C). Os dados obtidos estão representados como a média  $\pm$  erro padrão da média.

#### **5.4. Avaliação da atividade ectofosfatásica e do sobrenadante de trofozoítos de *E. histolytica***

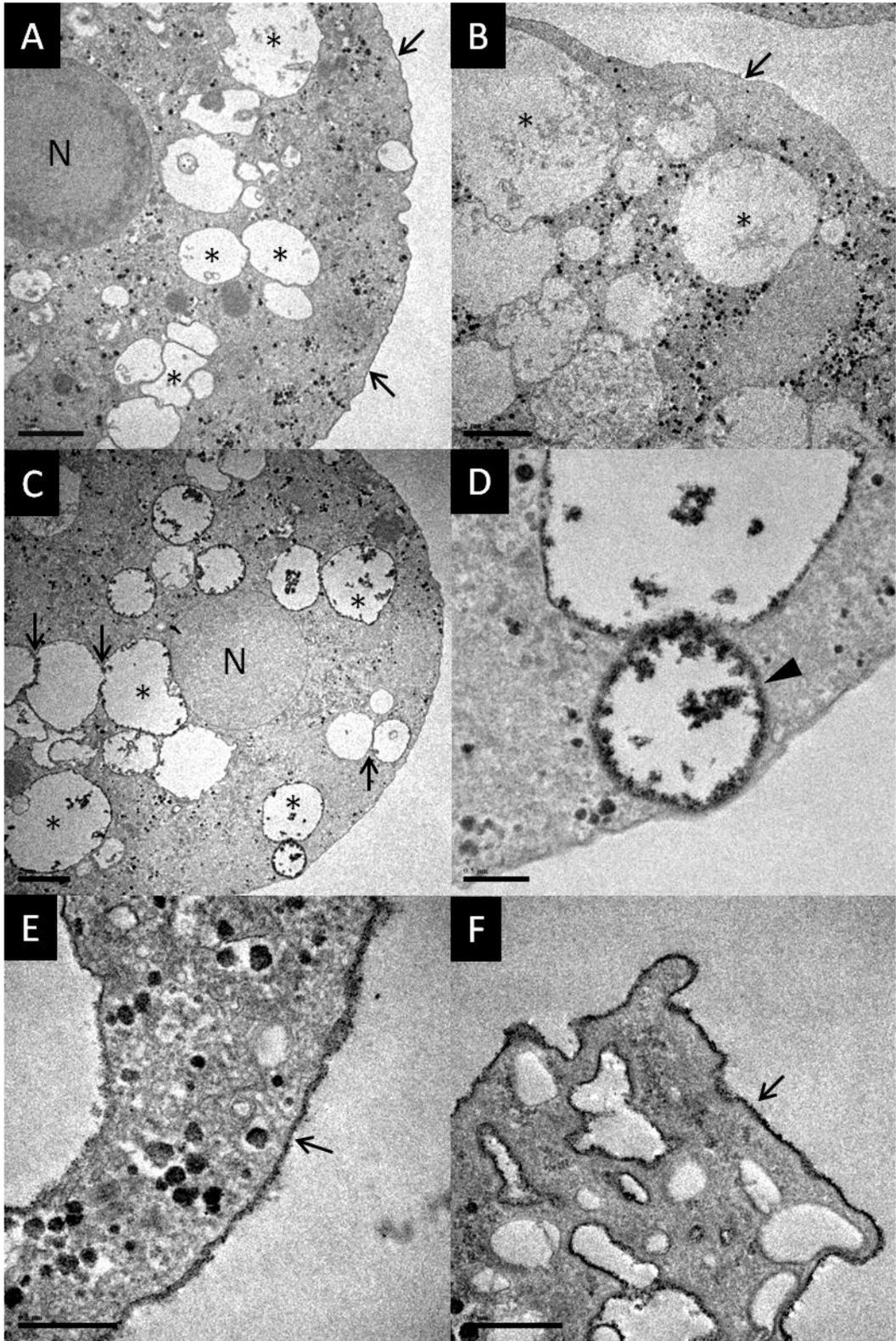
Com o objetivo de traçar um perfil da atividade de PTPases nas linhagens utilizadas neste estudo, experimentos de quantificação da atividade ectofosfatásica, utilizando células intactas, e os seus níveis de secreção através da coleta do sobrenadante de culturas de diferentes linhagens de *E. histolytica*, foram realizados. Após 8 horas de incubação em meio livre de soro, observamos um aumento da atividade fosfatásica do sobrenadante em todas as cepas avaliadas (figura 7 A). Em termos comparativos, a cepa HM1:IMSS apresentou um maior perfil de atividade desta enzima em comparação às cepas analisadas após a indução da atividade secretória, evidenciada pelo aumento da taxa de hidrólise do análogo sintético da fosfotirosina, *p*-NPP. A taxa de secreção também foi maior proporcionalmente para esta cepa, que apresentou uma média de 37,95%, seguida da linhagem ICB – CSP, com 18,25% e ICB – 452, com percentual em torno de 13,28%. Os resultados para atividade fosfatásica da superfície externa de trofozoítos vivos, mantidos em pH fisiológico durante 40 minutos em presença de 5 mM do substrato, foram semelhantes aos encontrados para atividade enzimática do sobrenadante (figura 7 B). A cepa HM1:IMSS demonstrou um maior nível de atividade ectofosfatase, divergindo, significativamente, das outras duas linhagens. A cepa isolada de paciente assintomático, ICB – 452, apresentou um nível de atividade ectofosfatásica inferior ao das cepas ICB- CSP e HM1:IMSS, isoladas de paciente sintomático. Estes dados indicam que a atividade enzimática não foi originada de células lisadas, pois a viabilidade dos trofozoítos, avaliada por exclusão de corante utilizando azul tripan, foi maior que 95%.



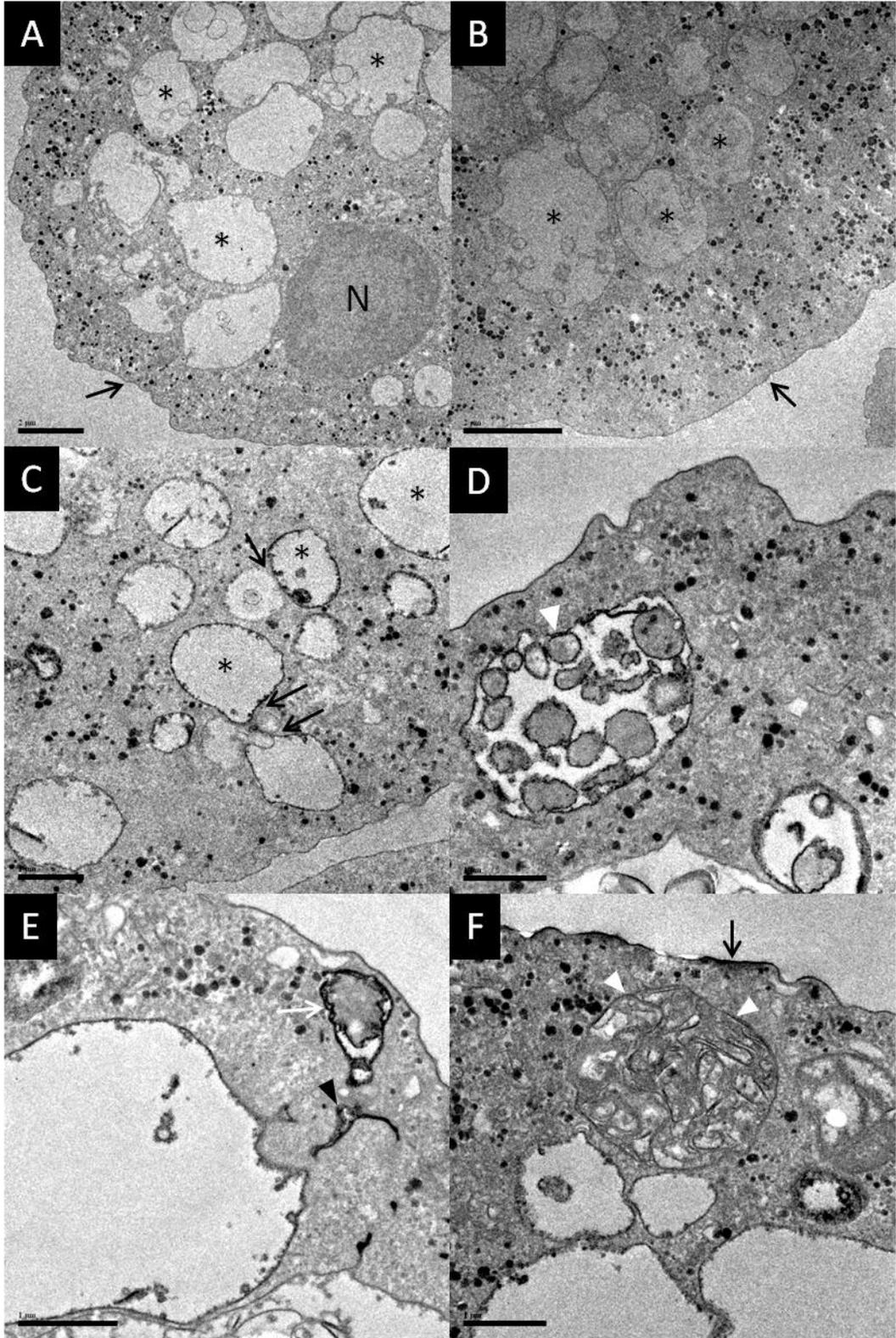
**Figura 7. Análise da atividade secretória e ectofosfatásica de diferentes linhagens de *Entamoeba histolytica*.** (A) Avaliação do sobrenadante de culturas de trofozoítos das cepas HM1:IMSS, ICB – CSP e ICB – 452 após o período de 8 horas de indução da atividade secretória. (B) Inóculos de  $2 \times 10^5$  células das linhagens supracitadas foram quantificados para atividade ectofosfatásica. As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.5. Detecção de fosfatases acidófilas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

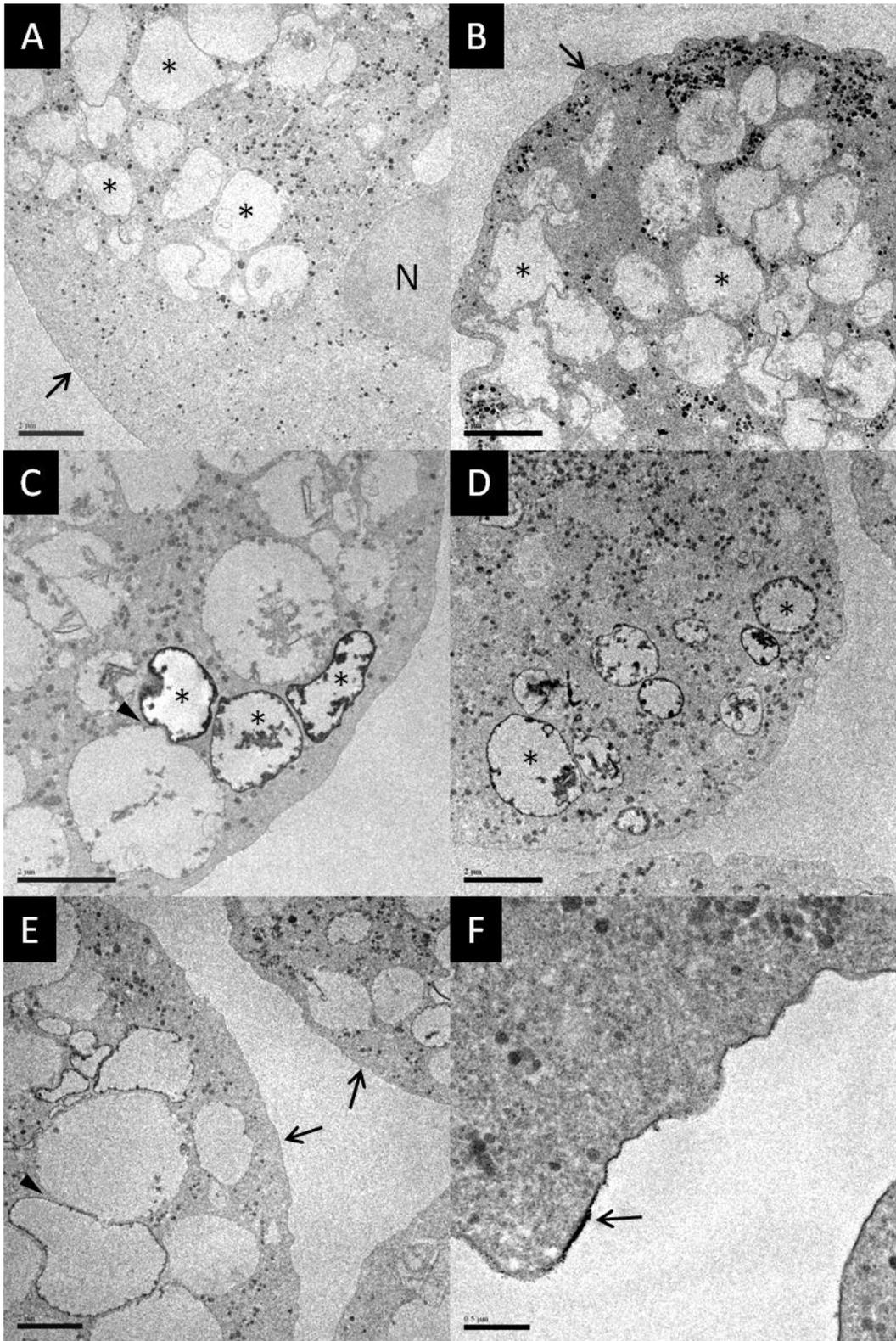
Buscando uma melhor compreensão da distribuição das fosfatases em trofozoítos de *E. histolytica*, foram realizados experimentos com a técnica de citoquímica enzimática para detecção da atividade destas proteínas em pH ácido e posterior visualização em microscópio eletrônico de transmissão. Os parasitos das linhagens HM1:IMSS, ICB – CSP e ICB – 452 incubados por 40 minutos em 1 mM de  $\text{CeCl}_2$ , sem adição do substrato  $\beta$ -glicerofosfato (figura 8 A, 9 A e 10 A), apresentaram ultraestrutura habitual, com vesículas distribuídas por todo o citoplasma, grânulos de glicogênio e núcleo, porém sem detecção de precipitados eletrondensos. Em trofozoítos da cepa HM1:IMSS incubados pelo mesmo período, com acréscimo do substrato  $\beta$ -glicerofosfato (figura 8 C), observamos um aumento da eletrondensidade em membranas de vesículas distribuídas pelo citoplasma e em regiões próximas à membrana plasmática (figura 8 D), onde também visualizamos depósito de material eletrondenso em algumas células (figuras 8 E e F). Nestas mesmas condições, os trofozoítos da linhagem ICB – CSP apresentaram marcação de vesículas e estruturas semelhantes a vacúolos autofágicos para atividade fosfatase acidófila, inclusive próximas à superfície do trofozoíto (figuras 9 C, D e E). Em algumas células também foi possível a visualização de depósitos de material eletrondenso na membrana plasmática do protozoário, muitas vezes sem continuidade aparente (figura 9 F). Este mesmo perfil foi observado em células da linhagem ICB – 452, com detecção de precipitados eletrondensos em algumas vesículas (figuras 10 C e D) e, com menor frequência em comparação à cepa HM1:IMSS, na superfície do trofozoíto (figura 10 F)



**Figura 8. Detecção da atividade fosfatase ácidófila por citoquímica enzimática de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da cepa HM1:IMSS processados para microscopia eletrônica de transmissão.** Células incubadas na ausência do substrato  $\beta$ -glicerofosfato (A e B). Observa-se a ausência de precipitados indicativos de atividade enzimática na membrana plasmática do trofozoíto (setas) ou vesículas citoplasmáticas (\*). Trofozoítos incubados por 40 minutos na presença do substrato (C, D, E e F). Numerosos compartimentos com reação positiva para AcP (\*), com imagens sugestivas de fusão (setas), foram observados (C). No detalhe (D), observa-se vesícula AcP – positiva (ponta de seta) em associação com membrana plasmática. Visualiza-se a presença de precipitados eletrondensos na superfície de trofozoítos (E e F, setas). Barras: A = 2  $\mu$ m; B = 2  $\mu$ m; C = 2  $\mu$ m; D = 0,5  $\mu$ m E = 0,5  $\mu$ m; F = 0,5  $\mu$ m. N = núcleo.



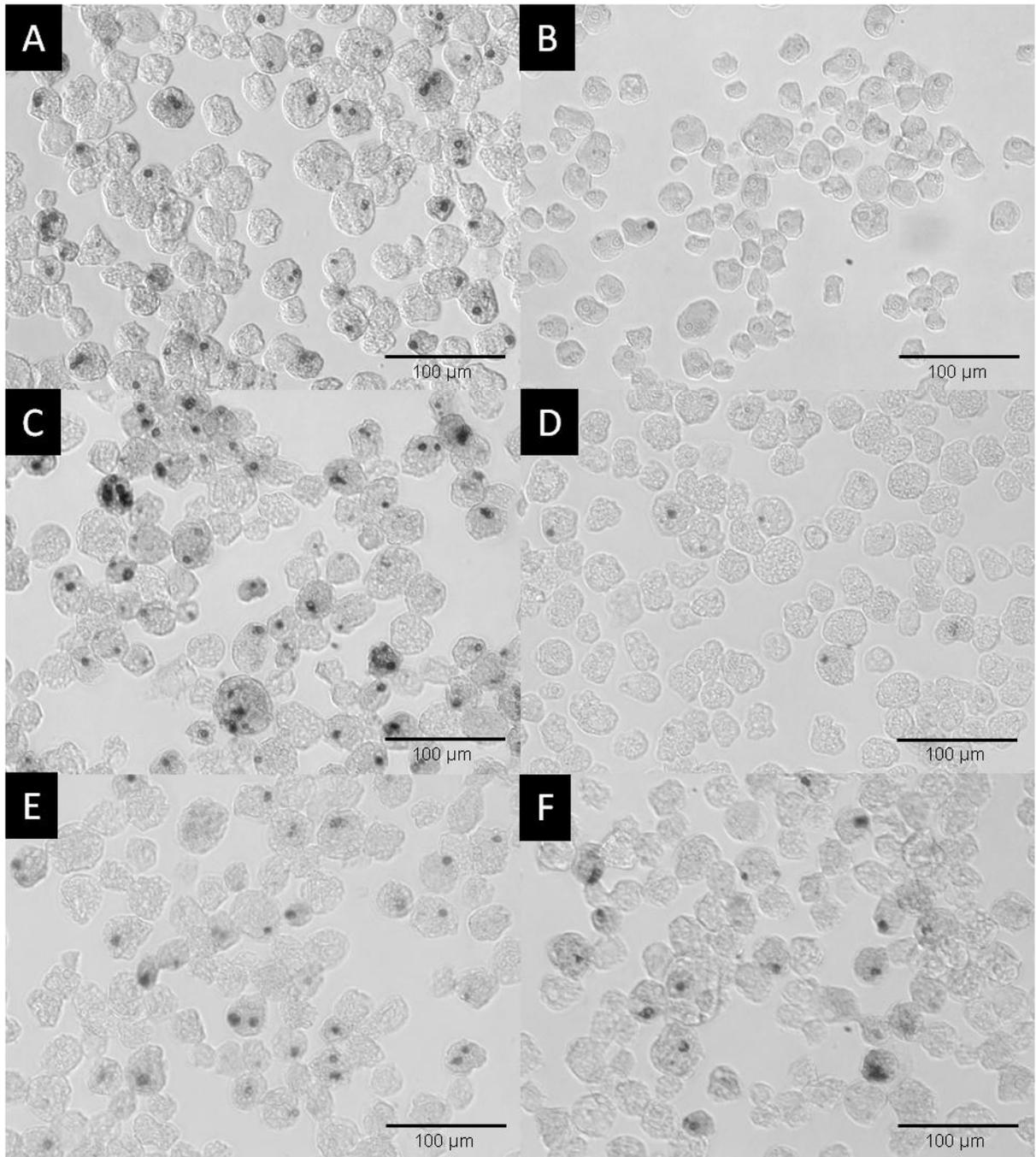
**Figura 9. Análise ultraestrutural da atividade fosfatase acidófila de trofozoítos de *E. histolytica* da linhagem ICB – CSP.** Células incubadas por 40 minutos na ausência do substrato  $\beta$ -glicerofosfato (A e B). Observa-se a ausência de precipitados eletrondensos, indicativos de atividade fosfatase em pH ácido na membrana plasmática (setas), ou vesículas citoplasmáticas (\*). Trofozoítos incubados no mesmo período de tempo supracitado com o substrato enzimático (C, D, E e F). Em C, numerosas vesículas são visualizadas com marcação positiva para atividade fosfatásica (\*), algumas delas aparentemente fundindo com compartimentos que apresentam reação negativa para AcP (setas). Observa-se em D inúmeros compartimentos com aparência de corpos multivesiculares marcados positivamente para AcP, envolvidos por uma membrana que também apresenta reação positiva para a atividade enzimática (ponta de seta branca). Presença de precipitados indicativos de atividade enzimática em compartimento que apresenta dupla membrana (E, seta branca), e em cisterna citoplasmática (E, ponta de seta). Membrana plasmática do trofozoíto apresentando reação positiva para AcP em regiões descontínuas (F, seta), além de vacúolo em provável processo autofágico (F, pontas de seta brancas). Barras: A = 2  $\mu\text{m}$ ; B = 2  $\mu\text{m}$ ; C = 1  $\mu\text{m}$ ; D = 1  $\mu\text{m}$ ; E = 1  $\mu\text{m}$ ; F = 1  $\mu\text{m}$ . N = núcleo.



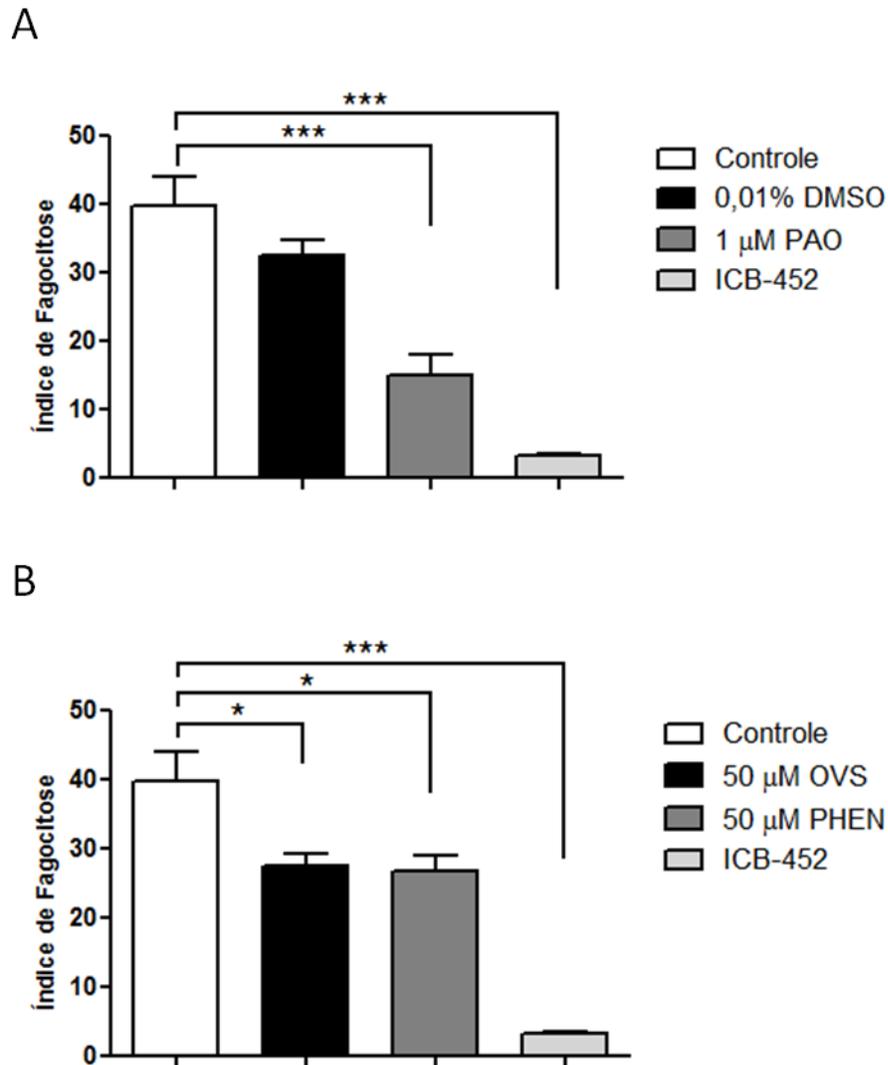
**Figura 10. Detecção da atividade fosfatásica em pH ácido de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da cepa ICB – 452 processados para microscopia eletrônica de transmissão.** Trofozoítos utilizados como controle, que não foram expostos ao substrato  $\beta$ -glicerofosfato durante o período de incubação (A e B). Observa-se ausência de marcação positiva para atividade fosfatase ácida, tanto na superfície do trofozoíto (setas), quanto em vesículas citoplasmáticas (\*). Parasitos expostos por 40 minutos ao substrato durante a reação enzimática (C, D, E e F). Visualizam-se vesículas com precipitados eletrondensos (\*), indicativos de atividade enzimática, em provável processo de fusão com compartimento que não apresenta reação positiva para AcP (C e E, pontas de seta). Observa-se em E ausência de precipitados eletrondensos na superfície de trofozoítos (setas), e em alguns (F), há uma reação positiva para AcP em regiões descontínuas da membrana plasmática (seta). Barras: A = 2  $\mu$ m; B = 2  $\mu$ m; C = 2  $\mu$ m; D = 2  $\mu$ m; E = 2  $\mu$ m; F = 0,5  $\mu$ m. N = núcleo.

## 5.6. Ensaio de Eritrofagocitose

Com o objetivo de avaliar o papel de PTPases em eventos associados à virulência do parasito, como a fagocitose, particularmente de eritrócitos, realizamos experimentos para mensurar tal atividade. Trofozoítos de *E. histolytica* foram incubados por 15 minutos com eritrócitos na proporção de 1:10 após o tratamento com os moduladores da sinalização celular OVS, bpV(phen) e PAO, por um período de 60 minutos. Observou-se uma diminuição da capacidade fagocítica dos parasitos tratados por 1 hora com 1  $\mu$ M de PAO, o mesmo ocorrendo quando as hemácias foram expostas a amebas tratadas com 50  $\mu$ M de vanadato ou o seu derivado, bpV(phen) (figura 11). Nas mesmas condições, trofozoítos da cepa ICB – 452 fagocitaram menos eritrócitos do que as células da linhagem HM1:IMSS. O índice de fagocitose foi calculado a partir da contagem randomizada das amostras analisadas, onde se demonstra a diferença estatística entre os trofozoítos da cepa HM1:IMSS não tratados e as amebas pré-incubadas com estas substâncias, bem como com relação à linhagem ICB – 452. O índice de fagocitose foi mantido em níveis comparáveis ao controle após o pré-tratamento das células com 0,01% de DMSO (figura 12).



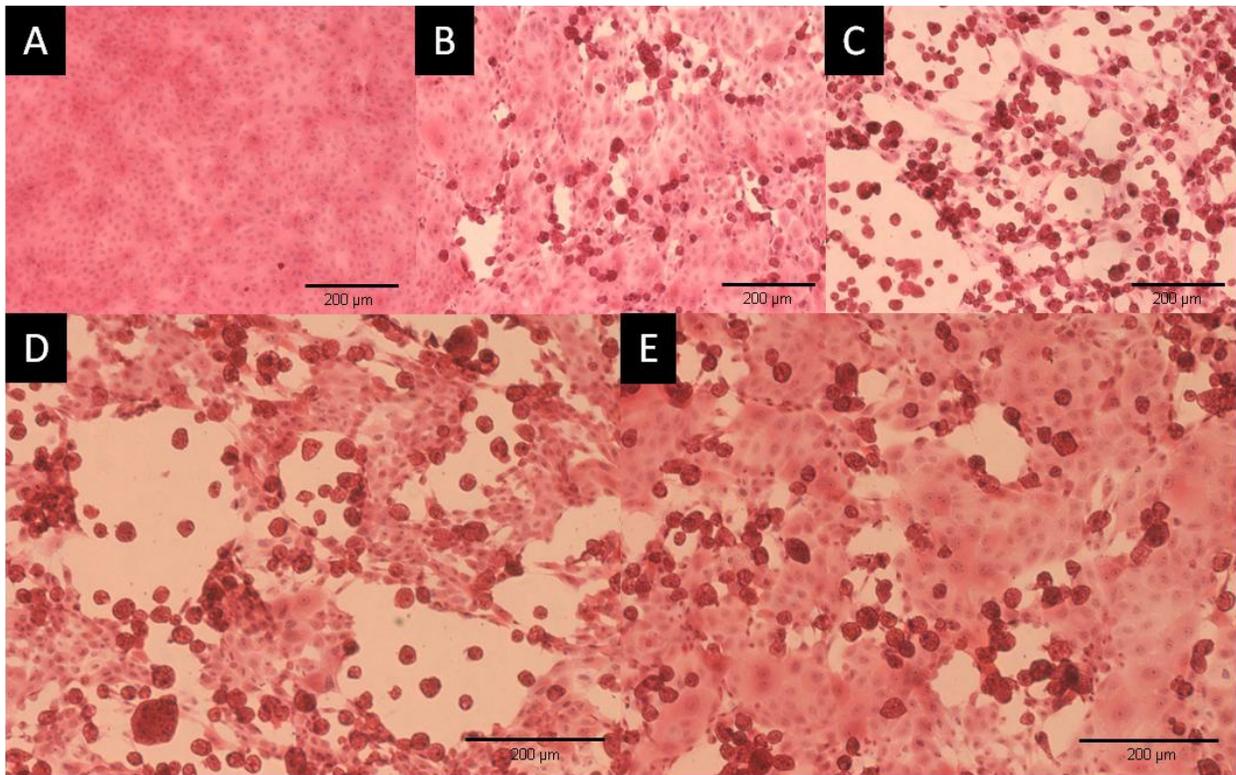
**Figura 11. Avaliação da capacidade fagocítica de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* na presença de moduladores da sinalização celular.** Trofozoítos das linhagens HM1:IMSS e ICB - 452 incubados por 15 minutos na proporção de 1:10 com eritrócitos isolados de sangue periférico humano. (A) Trofozoítos da cepa HM1:IMSS. (B) Células da linhagem ICB - 452. (C) Trofozoítos da linhagem HM1:IMSS pré-incubados por 1 hora com 0,01% de DMSO, (D) 1 µM de PAO, (E) 50 µM de ortovanadato de sódio e (F) bpV(phen).



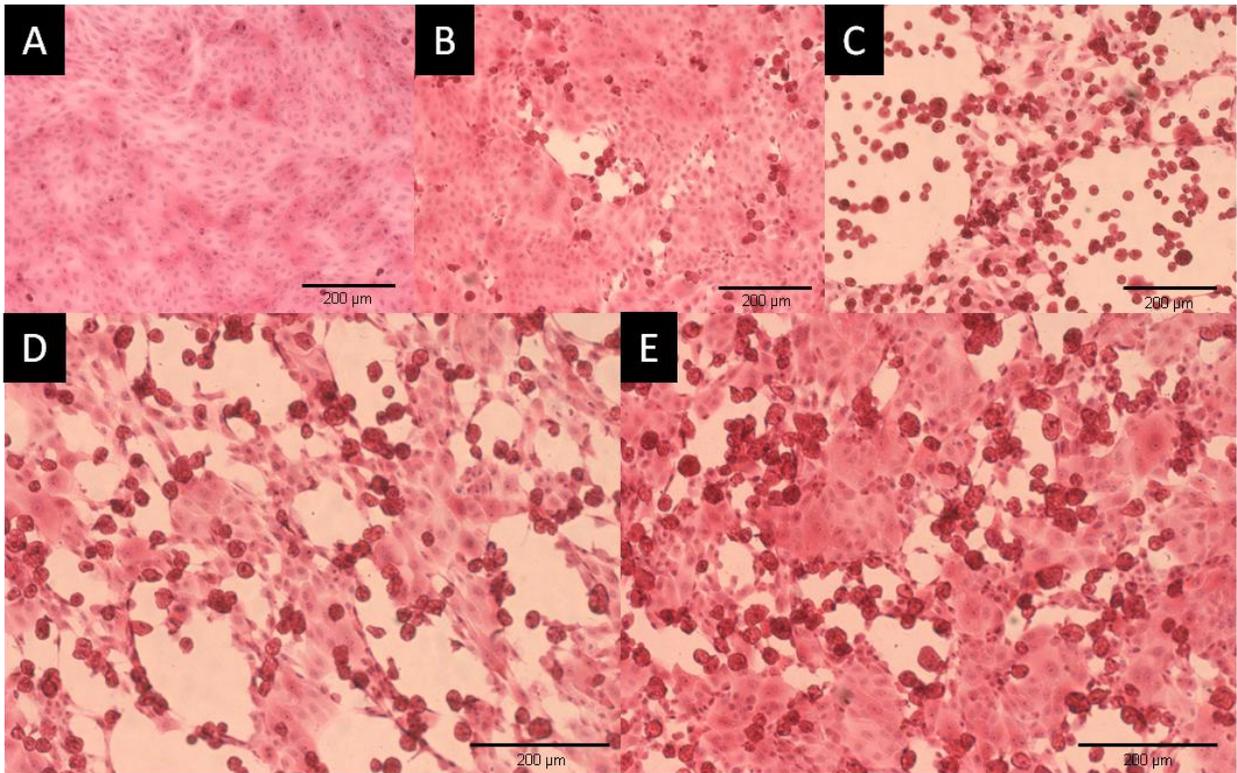
**Figura 12. Quantificação da capacidade fagocítica de trofozoítos de *E. histolytica* na presença de inibidores de PTPases.** Hemácias internalizadas após 15 minutos de interação com o parasito foram marcadas pela reação com diaminobenzidina e quantificadas para o cálculo do índice de fagocitose. (A) Parasitos da cepa HM1:IMSS pré-incubados ou não com PAO e o seu diluente, o DMSO. (B) Células da linhagem HM1:IMSS pré-tratadas ou não com o vanadato e o derivado de vanádio, bpV(phen). As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA, \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.7. Avaliação qualitativa e quantitativa da destruição da monocamada de células MDCK

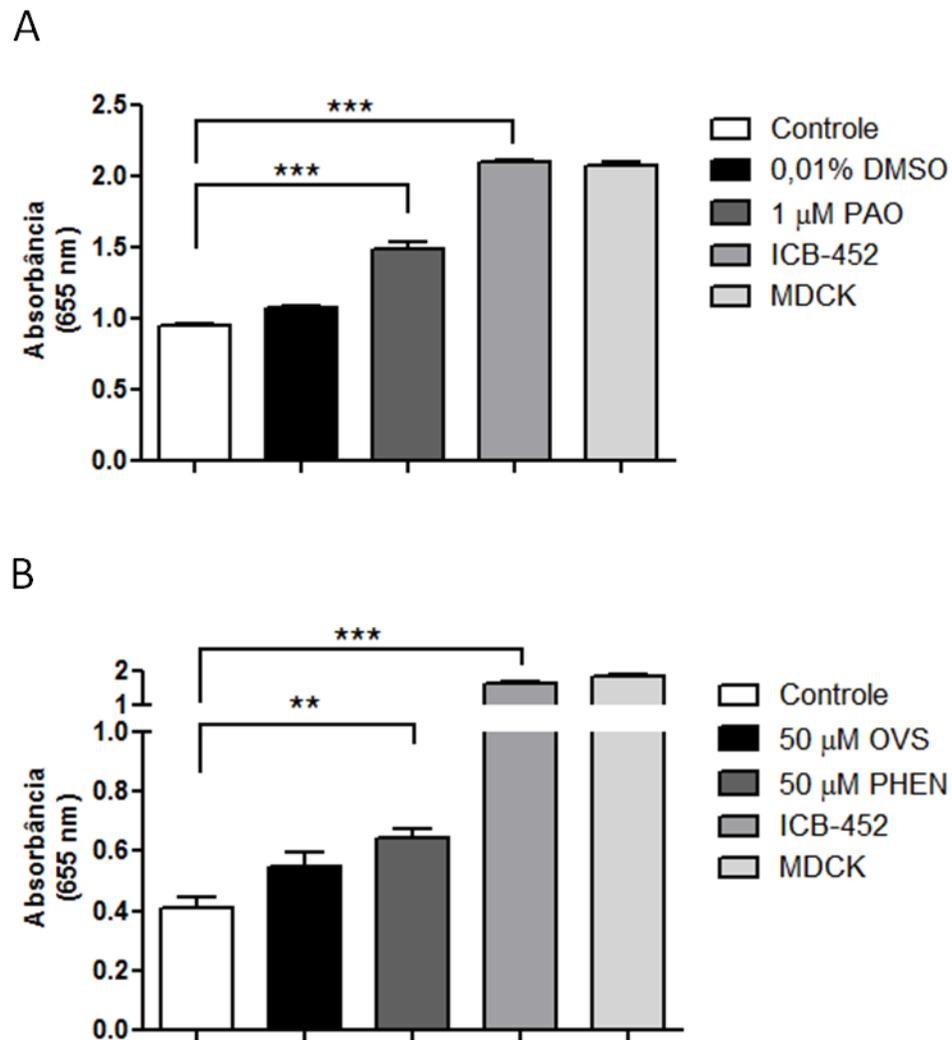
Após análise da capacidade fagocítica de amebas tratadas com conhecidos inibidores de PTPases, foram realizados ensaios de interação das mesmas com monocamadas de células MDCK com o objetivo de avaliar a participação destas proteínas em processos patológicos da amebíase, a exemplo de invasão tecidual. Observações morfológicas por microscopia óptica de lamínulas usadas como substrato para o crescimento das células de mamífero utilizadas neste estudo e coradas com HE demonstraram que na ausência da interação com o parasito, existe uma confluência destas células após 48 horas de incubação, caracterizando-a como uma monocamada (figuras 13 A e 14 A). Após 60 minutos de interação com amebas da linhagem ICB – 452, visualizamos alguns espaços entre as células, com alguns trofozoítos aderidos particularmente às áreas de descontinuidade (figuras 13 B e 14 B). Nas mesmas condições, amebas da linhagem HM1:IMSS promoveram uma destruição maciça da monocamada de células MDCK (Figuras 13 C e 14 C), o mesmo ocorrendo quando trofozoítos de *E. histolytica* desta mesma cepa foram pré-tratados com 0,01% de DMSO (figura 13 D). O tratamento com 1  $\mu$ M de PAO diminuiu de modo significativo as alterações morfológicas observadas no controle, apesar de aparentemente não haver redução da adesão do parasito a estas células (figura 13 E). A interação de amebas pré-incubadas com 50  $\mu$ M de vanadato com a monocamada de células MDCK resultou em uma diminuição parcial das alterações observadas no controle (figura 14 D), sendo esta diferença mais aparente quando visualizamos o resultado da interação entre trofozoítos de *E. histolytica* pré-tratados com 50  $\mu$ M de bpV(phen) e as células de mamífero confluentes (figura 14 E). Após experimentos de quantificação desta interação pelo método colorimétrico, observamos que os resultados são comparáveis aos mostrados pela análise qualitativa aqui descrita (figura 15 A e B).



**Figura 13. Avaliação da destruição da monocamada de células MDCK por trofozoítos de *E. histolytica*.** Monocamadas de células MDCK entram em confluência (A) e são expostos por 60 minutos à interação com inóculos de  $1 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB – 452 (B) ou HM1:IMSS (C). O pré-tratamento dos trofozoítos da linhagem HM1:IMSS com 0,01% de DMSO não afetou o padrão de interação (D). De modo adverso, a pré-incubação realizada com 1  $\mu$ M de PAO reduziu a atividade citopática do parasito (E).



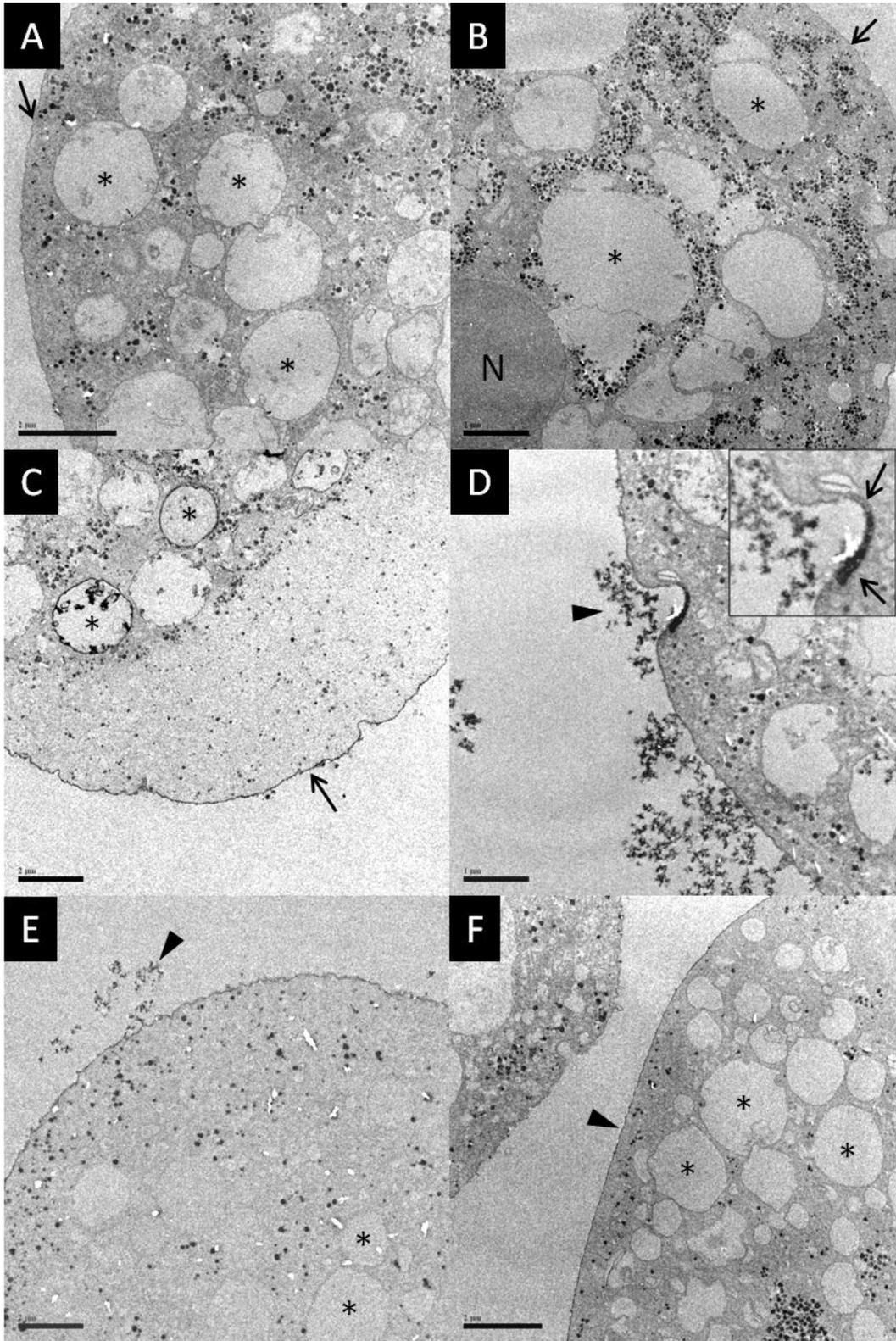
**Figura 14. Análise qualitativa da destruição da monocamada de células da linhagem MDCK pelo protozoário *Entamoeba histolytica*.** Células da linhagem MDCK confluentes (A) são expostas por 60 minutos à interação com  $1 \times 10^5$  trofozoítos de *Entamoeba histolytica* das cepas ICB – 452 (B) ou HM1:IMSS (C). Trofozoítos da linhagem HM1:IMSS pré-tratados com 50  $\mu$ M de vanadato (D) ou 50  $\mu$ M de bpV(phen) (E), apresentam uma redução da atividade citopática.



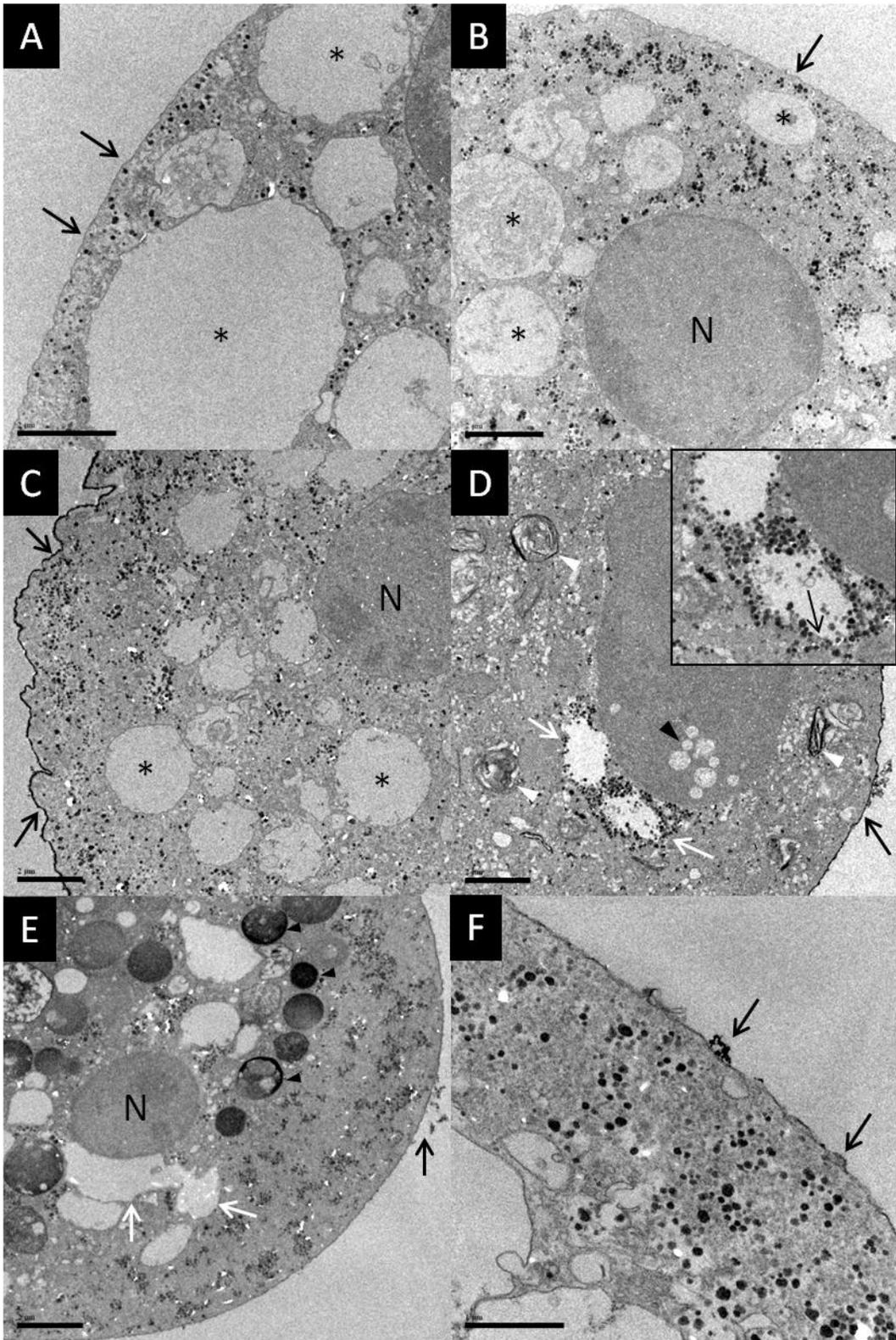
**Figura 15. Análise quantitativa da interação de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* com a monocamada de células da linhagem MDCK. (A) Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (cepa HM1:IMSS) pré-tratados ou não com 0,01% de DMSO e o modulador da sinalização celular PAO. Houve a interação também de células de *E. histolytica* da linhagem ICB – 452. (B) Células da linhagem HM1:IMSS pré-incubados ou não com o vanadato, ou o derivado de vanádio bpV(phen). A cepa ICB – 452 também interagiu com a monocamada de células. As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).**

### **5.8. Avaliação Ultraestrutural e da atividade fosfatase ácida de trofozoítos de *E. histolytica* tratados com moduladores da sinalização celular**

Com a finalidade de compreender os efeitos associados à ação dos moduladores da sinalização celular utilizados neste estudo sobre a biologia do parasito, nós realizamos experimentos de citoquímica enzimática para detecção de atividade fosfatásica e avaliação ultraestrutural de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da linhagem HM1:IMSS. As células foram pré-incubadas por 60 e 180 minutos em presença dos inibidores, sendo fixadas e processadas em seguida, de acordo com a metodologia descrita. Amebas incubadas com 1 mM de  $\text{CeCl}_2$  por 40 minutos em pH 5,0, na ausência do substrato  $\beta$ -glicerofosfato, não apresentaram marcação, exibindo aspecto ultraestrutural normal (figuras 16 A e 17 A). A adição do substrato à reação promoveu a deposição de material eletrondenso em vesículas presentes no citoplasma e na superfície do trofozoíto (figuras 16 C e 17 C). Amebas pré-tratadas com 1  $\mu\text{M}$  de PAO por 60 minutos exibiram forte marcação próxima à face externa e em compartimento subjacente à membrana plasmática, sugerindo que o tratamento com este composto aumenta a secreção destas enzimas pelo trofozoíto (figura 16 D). Após 3 horas de tratamento, observamos estruturas semelhantes a vesículas presentes no núcleo da célula, bem como regiões dilatadas e com acúmulo de grânulos de glicogênio próximos a esta organela. Também foram observadas marcações para atividade fosfatase na membrana do protozoário (figura 17 D). Parasitos pré-incubados por 1 hora com 50  $\mu\text{M}$  de vanadato apresentaram alterações ultraestruturais similares às visualizadas pelo tratamento com PAO, porém as deposições de material eletrondenso foram menos intensas em comparação ao composto supracitado (figura 16 E). Vesículas marcadas para atividade fosfatase ácida foram observadas após 3 horas de tratamento com OVS (figura 17 E). Houve uma expressiva redução da atividade fosfatase ácida em trofozoítos tratados por 60 minutos com 50  $\mu\text{M}$  de bpV(phen), evidenciada pela diminuição da deposição de material eletrondenso em vesículas e na membrana plasmática do parasito (figura 16 F). Este mesmo fato foi observado após 180 minutos de incubação com este derivado de vanádio (figura 17 F). Não foram visualizadas marcações semelhantes às encontradas neste ensaio após adição de 100  $\mu\text{M}$  de vanadato à reação em células não tratadas (figuras 16 B e 17 B).



**Figura 16. Detecção ultraestrutural da atividade fosfatase ácida em trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da linhagem HM1:IMSS em presença dos inibidores de PTPases.** Células incubadas por 40 minutos na ausência do substrato  $\beta$ -glicerofosfato, apresentando reação negativa para a atividade enzimática, tanto em vesículas citoplasmáticas (\*), quanto na membrana plasmática (seta) (A). O mesmo foi observado em células incubadas na presença de 100  $\mu$ M de vanadato durante o período de reação enzimática (B). Observa-se a presença de precipitados eletrondensos em vesículas citoplasmáticas (\*) e na superfície de trofozoítos de *E. histolytica* (seta) pré-tratados por 1 hora com 0,01% de DMSO (C). Há uma aparente secreção da enzima por parasitos pré-tratados por 60 minutos com 1  $\mu$ M de PAO, evidenciada pelo aumento da presença de precipitados indicativos de atividade enzimática em regiões próximas (D, ponta de seta) e subjacentes à membrana plasmática (D, em detalhe, setas). Trofozoítos pré-incubados com 50  $\mu$ M de OVS apresentaram alterações similares às observadas no composto supracitado (E, ponta de seta). Observa-se uma redução da marcação positiva para AcP, tanto em vesículas citoplasmáticas (\*), quanto na superfície de parasitos (ponta de seta), após o pré-tratamento com 50  $\mu$ M de bpV(phen) (F). Barras: A = 2  $\mu$ m; B = 2  $\mu$ m; C = 2  $\mu$ m; D = 1  $\mu$ m; E = 2  $\mu$ m; F = 2  $\mu$ m. N = núcleo



**Figura 17. Detecção da atividade fosfatásica em pH ácido e avaliação ultraestrutural de trofozoítos de *E. histolytica* da cepa HM1:IMSS em presença de inibidores de PTPases.**

Observa-se a ausência de precipitados indicativos de atividade enzimática em vesículas citoplasmáticas (\*) e membrana plasmática (setas) de trofozoítos incubados por 40 minutos na ausência do substrato  $\beta$ -glicerofosfato (A) ou em células incubadas na presença de 100  $\mu$ M de vanadato durante o período de reação enzimática (B). Vesículas citoplasmáticas (\*) e a superfície de trofozoítos de *E. histolytica* (setas) apresentaram reação positiva para AcP em parasitos pré-tratados por 3 horas com 0,01% de DMSO (C). Em trofozoítos pré-tratados pelo mesmo período de tempo com 1  $\mu$ M de PAO, foram observadas inúmeras vesículas (ponta de seta) presentes no núcleo (N) da célula, aparente dilatação de compartimentos membranares em regiões perinucleares, além do acúmulo de grânulos de glicogênio nestas regiões (D, setas brancas). A presença de vacúolos em provável processo autofágico (pontas de seta brancas) e precipitados eletrondensos na membrana plasmática do trofozoíto também foram visualizadas em D (setas). A dilatação supracitada também foi observada em células pré-incubadas com 50  $\mu$ M de OVS (E, setas brancas), além de um aumento do número de vesículas marcadas positivamente para a atividade enzimática (E, pontas de seta). Reação positiva para AcP também foi visualizada na face externa da membrana do trofozoíto (E, seta). Observa-se em F uma redução de precipitados eletrondensos na superfície do parasito (setas), após o pré-tratamento por 3 horas com 50  $\mu$ M de bpV(phen). Barras: A = 2  $\mu$ m; B = 2  $\mu$ m; C = 2  $\mu$ m; D = 1  $\mu$ m; E = 2  $\mu$ m; F = 2  $\mu$ m.

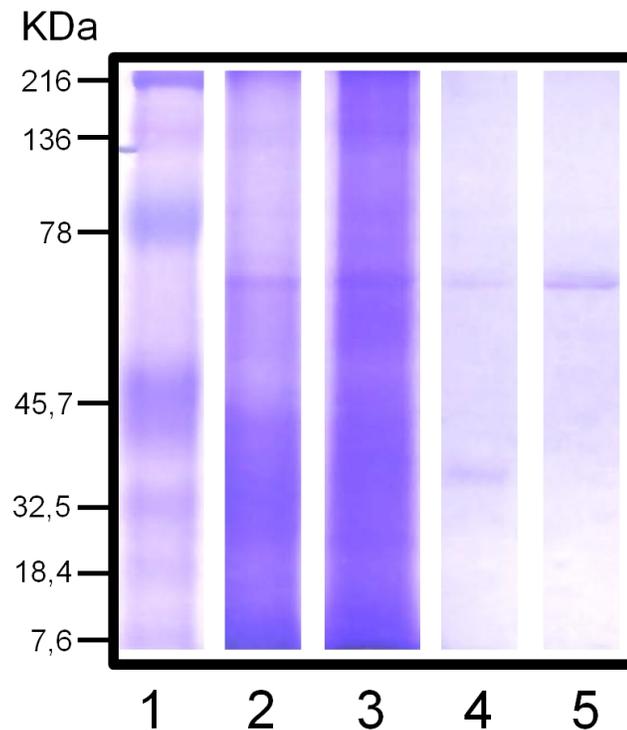
### **5.9. Purificação parcial e efeito de antagonistas de PTPases em trofozoítos de *Entamoeba histolytica***

Visando um maior entendimento da ação de moduladores da sinalização celular em PTPases de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, a sua purificação a partir da fração solubilizada do parasito, e posterior quantificação da atividade enzimática, foi realizada. A tabela 5 sumariza as etapas de purificação e seus respectivos percentuais de rendimento. A atividade específica da enzima aumentou cerca de duas vezes após a solubilização com triton X – 100, e em torno de treze vezes após a passagem pela coluna de Con A – sefarose. O padrão de eluição na coluna de DEAE – celulose exibiu um pico de atividade fosfatásica entre as frações 8 e 11 (dados não mostrados), com aumento da concentração enzimática total de aproximadamente 35 vezes. A análise eletroforética das diferentes etapas de purificação demonstrou um perfil proteico complexo para amostras oriundas do homogenato e fração solubilizada (figura 18, linhas 2 e 3), porém uma banda bem definida, com peso molecular entre 78 e 45,7 KDa, foi encontrada tanto na fração correspondente ao produto da eluição da coluna de Con A – sefarose, quanto à amostra procedente da fração 8 da coluna de DEAE – celulose (figura 18, linhas 4 e 5). A adição de 10  $\mu$ M de PAO à reação foi incapaz de inibir a atividade fosfatásica das frações purificadas (figura 19 A). No entanto, o vanadato e os derivados de vanádio inibiram de forma significativa a hidrólise do *p*-NPP pelas mesmas, com redução total da atividade enzimática para as amostras incubadas com 10  $\mu$ M de bpV(phen) e bpV(pic) (figura 19 B).

**Tabela 5.** Sumário da purificação parcial da fração solubilizada de trofozoítos de *Entamoeba histolytica*

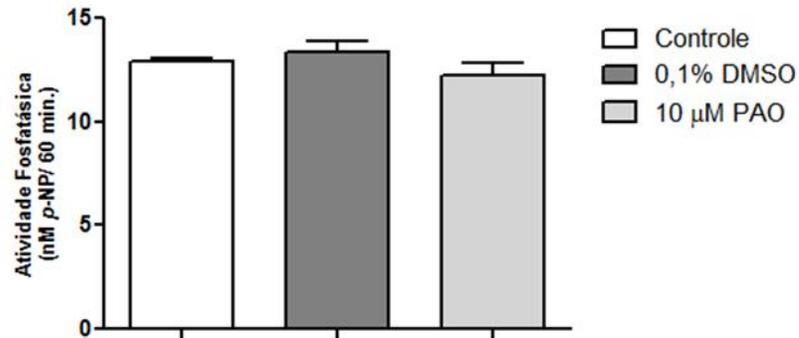
Etapas	Atividade específica (nM <i>p</i> -NP/ $\mu$ g proteína)	Rendimento (%)
Homogenato	0,59	100
Fração Solubilizada	1,18	200
(Con A) – Sefarose	7,55	1279,66
DEAE – Celulose <sup>1</sup>	20,72	3511,86

<sup>(1)</sup> A oitava fração de DEAE-celulose foi utilizada para o cálculo do percentual de rendimento.

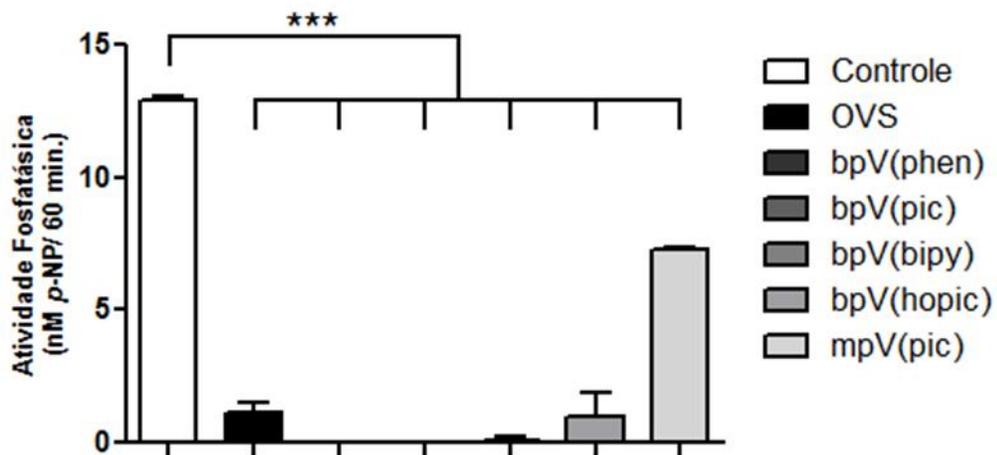


**Figura 18.** Eletroforese em gel de poli-acrilamida das amostras provenientes das diferentes etapas de purificação. Linha 1: padrão; linha 2: homogenato; linha 3: fração solubilizada; linha 4: eluato procedente da coluna de Con A-sefarose; linha 5: Fração 8 oriunda da coluna de DEAE – celulose.

A



B



**Figura 19. Avaliação da atividade fosfatásica das frações purificadas em presença de inibidores de PTPases.** As frações procedentes do material eluído da coluna de DEAE-celulose foram testadas para quantificação da atividade fosfatásica em presença de 10 mM de *p*-NPP e diferentes moduladores da sinalização celular. (A) Detecção da atividade enzimática da fração 8 na presença ou ausência de 0,1% de DMSO ou 1 µM de PAO e (B) do vanadato ou dos derivados de vanádio. As barras correspondem à média  $\pm$  erro padrão da média (ANOVA, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 6. DISCUSSÃO

---

Um dos principais eventos que envolvem vias de transdução de sinais é a fosforilação de proteínas, reação regulada pela ação conjunta de proteínas cinases e fosfatases. Enquanto as proteínas cinases transferem fosfato do ATP para grupos hidroxila de resíduos serina, treonina ou tirosina, as proteínas fosfatases hidrolisam o fosfato destes aminoácidos, em proteínas sinalizadoras intracelulares específicas (STONE e DIXON, 1994; TONKS, 1996).

A fosforilação reversível de resíduos de tirosina desempenha papel crucial no controle de processos fundamentais, tais como proliferação, diferenciação e locomoção celular, regulação do metabolismo e expressão gênica. As proteínas tirosina fosfatases atuam como verdadeiros efetores negativos da transdução de sinal, desfosforilando proteínas-alvo específicas e, conseqüentemente, assegurando a curta duração das fosforilações e o reduzido nível de tirosinas fosforiladas, o que as qualifica como possível alvo terapêutico em doenças em que há alterações neste perfil de fosforilação (HENDRIKS *et al.*, 2012; NINFA e DIXON, 1994; ÖSTMAN e BÖHNER, 2001).

Diversos estudos têm demonstrado que trofozoítos de *E. histolytica* secretam e apresentam em sua superfície proteína tirosina fosfatases, as quais vem sendo descritas na literatura como importantes fatores de virulência em diversos microorganismos patogênicos (ANDREEVA e KUTUZOV, 2008; GOMES *et al.*, 2011; WHITMORE e LAMONT, 2012). Em *E. histolytica*, dados da literatura sugerem que estas PTPases se apresentam sob duas formas: SAP – fosfatase acidófila secretada e MAP – fosfatase acidófila ligada à membrana (TALAMÁS-ROHANA, 1999). A análise destas proteínas tem sido realizada em uma série de patógenos, porém pouco ainda se sabe acerca do papel fisiológico destas enzimas nestes parasitos. Uma das ferramentas utilizadas para a caracterização de fosfatases é a avaliação enzimática e funcional destas proteínas através de inibidores, quelantes de metal e/ou cátions divalentes, em diferentes condições de pH (GOMES *et al.*, 2011).

A análise da proliferação celular de trofozoítos de *E. histolytica* tratados com conhecidos moduladores da sinalização celular em concentrações micromolares, demonstrou que estas células foram susceptíveis, nas condições avaliadas, apenas ao PAO e ao derivado de vanádio bpV(phen). No que concerne a este último, os compostos peroxovanádio foram sintetizados por POSNER e colaboradores (1994), após observações de que a combinação do vanadato com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) apresentava um efeito sinérgico na ativação do receptor de

insulina cinase (IRK) em adipócitos, e mimético da insulina (KADOTA *et al.*, 1987). Sugeriu-se que estes efeitos deveriam-se à formação de complexos peroxovanádio aquosos ( $pV[aq])^2$ , onde o íon peróxido entra na esfera de coordenação do vanádio. Estes compostos sintetizados foram relacionados à inibição da atividade fosfotirosina fosfatase associada à IRK em endossomas de fígado de ratos. Além disso, há neste estudo, uma aparente correlação entre o número de grupos peroxo em cada composto sintetizado e a sua atividade biológica (POSNER *et al.*, 1994). Isso poderia explicar, em parte, a diferença observada na detecção de atividade fosfatásica entre os compostos que possuem dois grupos peroxo utilizados em nosso estudo, como o bpV(phen), bpV(bipy), bpV(pic), bpV(hopic), e o mpV(pic), que apresenta apenas um grupo peroxo. De modo semelhante, estudos anteriores demonstraram uma variação considerável na atividade destas substâncias a depender do ligante auxiliar coordenado ao vanádio, já que alguns complexos peroxovanádio apresentam efeito inibitório preferencial na desfosforilação de IRK, em comparação ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (POSNER *et al.*, 1994). Os derivados de vanádio são considerados potentes inibidores de proteína tirosina fosfatases, atuando como moduladores oxidativos do resíduo de cisteína presente no sítio catalítico, regulando negativamente a atividade enzimática (AOYAMA *et al.*, 2003). O ortovanadato de sódio, mais conhecido como vanadato, é um clássico inibidor de proteína tirosina fosfatases, sendo considerado um análogo estrutural do fosfato (HUYER *et al.*, 1997). Como tal, este composto também pode inibir a atividade de uma série de enzimas que utilizam grupos fosfato como substrato, a exemplo de  $Na^+, K^+$ -ATPase (CARUSO-NEVES *et al.*, 1998),  $Ca^{2+}$ -ATPase (FRAQUEZA *et al.*, 2012) e fosfofrutocinase (INOUE *et al.*, 1994; SIGNORINI e BERGAMINI, 1990).

O óxido de fenilarsina é considerado um potente inibidor de proteína tirosina fosfatases permeável à membrana. Este é um composto arsênico trivalente, o qual se liga covalentemente à resíduos cisteína residentes no sítio catalítico da enzima, impedindo a ação de PTPases (GERHARD *et al.*, 2003). No entanto, esta substância também atua em outras fosfatases que possuem grupamentos tiol vicinais, a exemplo de calcineurina, uma serina/treonina fosfatase dependente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (BOGUMIL *et al.*, 2000). Além disso, a inibição estérica de NFκB pelo PAO é responsável, possivelmente, pela redução da ligação deste fator de transcrição ao DNA em hepatócitos (ODA *et al.*, 2000). Outro efeito observado em timócitos e atribuído a este composto é o aumento da mobilização intracelular do cálcio resultante da inibição da

ATPase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  (HMADCHA *et al.*, 1999), que está diretamente associada à regulação da concentração de cálcio do retículo nucleoplasmático em eucariotos superiores (ABRENICA e GILCHRIST, 2000; ALONSO e GARCÍA-SANCHO, 2011; ESCHEVARRÍA *et al.*, 2003). Este mecanismo envolve bombas ou canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em membranas próximas ao núcleo destas células (ABRENICA e GILCHRIST, 2000), e alterações na homeostase de cálcio intracelular podem gerar respostas celulares fisiológicas específicas. Em neutrófilos, foi observada uma diminuição da produção de radicais livres de oxigênio, com concomitante aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promovido pela oxidação de grupos tiol vicinais por este composto arsênico (WANG *et al.*, 2005). A redução dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial em células HeLa foi associado à abertura do poro de transição de permeabilidade pelo PAO, um mecanismo que está intimamente associado à morte celular por apoptose (VAY *et al.*, 2009).

Apesar de ter apresentado importante efeito antiproliferativo em trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, o PAO não apresentou efeito inibitório significativo na atividade ectofosfatásica nas concentrações utilizadas. Embora este composto bloqueie a atividade de PTPases em outros tipos celulares, ele não é um inibidor exclusivo desta proteína e é possível que ligações sejam feitas pelo PAO em outros grupamentos tiol em resíduos cisteína de proteínas expressas pelo parasito. No que se refere à L-cisteína, este é um aminoácido essencial em processos celulares vitais do parasito, a exemplo de metabolismo de aminoácidos que contém enxofre e regulação redox, este último de importância crucial no processo de invasão tecidual (HUSAIN *et al.*, 2011). Outro fato observado é que em concentrações acima de  $1 \mu\text{M}$  de PAO, há um aumento da atividade fosfatásica de trofozoítos de *E. histolytica*. É possível que em concentrações elevadas este composto apresente efeito citotóxico, com liberação do conteúdo vacuolar dos trofozoítos para o meio extracelular. A viabilidade, analisada por exclusão de corante de trofozoítos tratados em concentrações acima de  $10 \mu\text{M}$ , foi reduzida em comparação ao controle (dados não mostrados). Apesar do provável efeito citotóxico em concentrações micromolares, dados de citoquímica enzimática avaliados por microscopia eletrônica de transmissão para detecção da atividade de fosfatases em pH ácido de parasitos tratados com  $1 \mu\text{M}$  de PAO, evidenciaram um aumento de precipitados eletrondensos próximos à face externa da membrana plasmática, indicando que a secreção enzimática é um provável mecanismo de atuação deste composto arsênico na biologia do trofozoíto. A este respeito, na mesma concentração supracitada, a viabilidade deste patógeno foi avaliada através da análise colorimétrica da redução

do MTT à formazan por desidrogenases do parasito (CEDILLO-RIVERA *et al.*, 1992). Observou-se que nestas condições, não houve alteração da viabilidade de trofozoítos tratados com este composto. Novos estudos visando o entendimento dos possíveis mecanismos de ação deste inibidor em *Entamoeba histolytica* são necessários.

Outros típicos inibidores de PTPases descritos na literatura testados em trofozoítos de *E. histolytica* apresentaram pouco ou nenhum efeito na atividade proliferativa e ectofosfatásica destas células. O composto antimonial pentavalente estibogluconato de sódio (Pentostam®) tem sido utilizado há mais de 60 anos para o tratamento da leishmaniose visceral e cutânea (SEIFERT, 2011). No entanto, casos de resistência têm sido relatados na literatura e o seu uso foi descontinuado em algumas regiões do mundo (SUNDAR *et al.*, 2000). Antimoniais pentavalentes precisam ser reduzidos para a forma trivalente para exercer a sua atividade biológica. Os mecanismos de redução e atuação deste composto na interface parasito – hospedeiro ainda não são bem compreendidos, porém dados indicam que há um comprometimento do metabolismo redox de grupos tiol de *Leishmania donovani* sensível ao antimonial trivalente (WYLLIE *et al.*, 2004). O estibogluconato de sódio é um inibidor irreversível da atividade de PTPases, incluindo enzimas com domínios de homologia à src SHP- 1 e SHP-2, além de PTP1B (PATHAK e YI, 2001), porém esta inibição enzimática não foi observada em trofozoítos de *E. histolytica* tratados com este composto. Resultados semelhantes foram vistos tanto para a defostatina, quanto para o substrato 4-MUP. A defostatina é um inibidor de PTPases de ocorrência natural descoberto em 1993 (UMEZAWA *et al.*, 2003). Este inibidor também induz liberação de cálcio intracelular, o que promove a secreção de amilase em células pancreáticas. É possível que este efeito seja gerado pela ação oxidante deste composto (LAJAS *et al.*, 2000). Análogos desta substância também foram responsáveis pela liberação de óxido nítrico (NO) em neurônios (CULMSEE *et al.*, 2005). O composto 4-MUP é um conhecido substrato fluorescente para fosfatase alcalina. A utilização desta substância em ensaios de proliferação celular e de atividade enzimática se deveu à hipótese de uma possível inibição competitiva de PTPases do parasito em condições *in vitro*. O DMHV é um potente inibidor reversível de proteína tirosina fosfatases. Esta molécula não apresenta cargas em pH fisiológico, e devido a esta característica, apresenta maior permeabilidade à membrana plasmática do que o vanadato. Dados da literatura indicam que células de mamíferos intactas tratadas com o DMHV apresentaram maiores níveis de proteínas fosforiladas em resíduos tirosina do que as incubadas com o vanadato. Em níveis comparativos, a

captação de glicose aumentou em cerca de 10 a 20 vezes, bem como a síntese de glicogênio em adipócitos tratados com o composto permeável à membrana, provavelmente devido ao aumento da fosforilação de receptores de insulina (CUNCIC *et al.*, 1999). Apesar disso, este composto não inibiu a atividade ectofosfatásica em trofozoítos de *E. histolytica* de modo similar ao observado no tratamento com o vanadato e seus derivados.

Dentre as cepas utilizadas neste estudo, a HM1:IMSS foi a que apresentou maiores níveis de atividade, tanto para a fosfatase acidófila secretada, quanto para a detectada na face externa da membrana plasmática. A cepa ICB – CSP apresentou uma redução desta atividade ectofosfatásica em comparação à linhagem supracitada, porém seus níveis foram maiores do que os encontrados na linhagem ICB – 452. As cepas HM1:IMSS e ICB – CSP são classificadas na literatura como altamente virulentas, enquanto que a cepa ICB – 452 é considerada avirulenta (SILVA, 1997). As cepas HM1:IMSS, isolada no México, e ICB – CSP, oriunda de paciente do estado da Bahia, foram isoladas de pacientes sintomáticos apresentando colite disentérica (SILVA, 1997). Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo de De Sá-Pinheiro e colaboradores (2007), onde demonstrou-se que a atividade ectofosfatásica da cepa de *E. histolytica* considerada virulenta foi maior do que a da linhagem não virulenta e de vida livre. Em um estudo desenvolvido por Talamás-Rohana e colaboradores (1999), observou-se que há uma secreção ativa de fosfatases acidófilas por trofozoítos de *E. histolytica*, particularmente entre 45 e 68 horas de cultivo, correspondente à fase logarítmica de crescimento. Esta atividade secretória ocorreu em diferentes linhagens de *E. histolytica*, independente do seu grau de virulência e/ou patogenicidade. Contudo, ficou evidenciado que *Entamoeba dispar*, uma espécie não patogênica, contém fosfatase acidófila associada à membrana, porém não a secreta, reforçando a tese de que as proteínas fosfatases de *E. histolytica* podem desempenhar importante papel no processo patogênico da amebíase.

Sabe-se que a evolução da infecção por *E. histolytica* é decorrente da interação de fatores do hospedeiro e mecanismos de virulência do parasito. A qualidade da resposta inflamatória, status nutricional e o tipo de flora bacteriana são reconhecidos como alguns dos fatores que interferem no desfecho sintomático ou assintomático da doença (LEJEUNE *et al.*, 2009; MENDOZA-MACÍAS *et al.*, 2009). Uma definição importante diante da discussão na literatura acerca dos termos “patogenicidade” e “virulência” é a de Gladstone (1970) apud Talamás-Rohana e colaboradores (1999). Segundo este autor, patogenicidade é a capacidade de produzir a

doença, sem especificação das condições. Virulência é a capacidade de produzir a doença em um determinado conjunto de circunstâncias. Vários graus de virulência podem ser encontrados a depender das condições, mas os organismos ou são patogênicos, ou não são. Nesse sentido, diferenças no perfil de atividade fosfatásica podem ser encontradas em linhagens patogênicas de *Entamoeba histolytica*, uma vez que a virulência abrange múltiplos fatores e inúmeras moléculas do parasito estão envolvidas neste processo (ANAYA-VALÁZQUEZ e PADILLA-VACA, 2011).

A família de proteína tirosina fosfatases possui um domínio catalítico altamente conservado ([I/V]HCXAGXXR[S/T]G), onde cisteína (C) e a arginina (R) são essenciais para a catálise enzimática (AOYAMA *et al.*, 2003). A presença da cisteína no sítio ativo das PTPases é crucial para formação do intermediário tiofosforil enzima-fosfato, enquanto que a arginina tem a função de se ligar ao substrato, estabilizando o estado de transição, para que este possa ser hidrolisado (AOYAMA *et al.*, 2003). Um estudo de Herrera-Rodríguez e colaboradores (2006), demonstrou através da identificação e clonagem de genes de *E. histolytica* associados à PTPases, que as fosfatases deste parasito codificadas pelos genes *EhPTPA* e *EhPTPB* apresentam domínio catalítico conservado, similar ao de PTPases encontradas em outros microorganismos.

As PTPases são reguladas por reações de oxidação-redução. A oxidação do resíduo de cisteína do sítio ativo, através de agentes oxidantes como o vanadato e  $H_2O_2$ , causa alteração reversível deste resíduo, com produção de ácido sulfênico, o que tem sido caracterizado como um mecanismo de regulação negativa desta enzima. Isto se deve provavelmente ao fato de a cisteína do sítio catalítico se apresentar na forma de ânion tiolato, o que a torna mais susceptível à oxidação (HUYER *et al.*, 1997). A formação de ácidos sulfínico e sulfônico por novas oxidações no sítio catalítico gera inibição enzimática irreversível (BARRETT *et al.*, 1999; CALLSEN *et al.*, 1999; THOMAS e MALLIS, 2001). Em trofozoítos de *E. histolytica* o tratamento com  $ZnCl_2$ , um conhecido agente que interage com resíduos cisteína em proteínas (FRANCO *et al.*, 1999), inibiu de modo dose-dependente a atividade enzimática de ectofosfatases neste parasito, possivelmente pela sua ação oxidante em grupamentos tiol. Em contrapartida, agentes redutores, como ditioneitol (DTT) e glutatona reduzida aumentaram a atividade enzimática desta proteína, demonstrando que a mesma é regulada por reações de oxidação e redução (DE SÁ-PINHEIRO *et al.*, 2007).

A fagocitose se caracteriza como um evento crucial durante o processo de invasão de

trofozoítos de *E. histolytica*, no qual ele adere, mata e fagocita células epiteliais, do sistema imune e eritrócitos (BOETTNER *et al.*, 2005), sendo considerado um marcador de virulência neste patógeno (VOIGT *et al.*, 1999). A importância da fagocitose na patogenicidade deste protozoário se tornou evidente quando se demonstrou que cepas que não tinham a capacidade de fagocitar eram consideradas avirulentas (OROZCO *et al.*, 1983). Neste estudo, demonstramos que trofozoítos de *E. histolytica* da linhagem HM1:IMSS, que apresentam maior atividade fosfatásica, tanto na superfície, quanto secretória, possuem maior capacidade fagocítica do que células que possuem seus níveis de atividade reduzidos, como a cepa avirulenta ICB – 452. Parasitos da linhagem HM1:IMSS tratados com os moduladores da sinalização celular diminuem a sua capacidade eritrofagocítica. Esta variação na fagocitose pode ser explicada em parte por diferenças na expressão de receptores de superfície do protozoário ligados a eventos como adesão e internalização da célula do hospedeiro (SATERIALE e HUSTON, 2011). Além disso, a análise proteômica de fagossomos de *Entamoeba histolytica* detectou a presença de duas fosfatases acidófilas nestas organelas, sugerindo que estas proteínas também estejam envolvidas no processo de digestão neste parasito (OKADA *et al.*, 2005). É possível também que fosfatases presentes na membrana plasmática do trofozoíto e/ou secretadas desempenhem importante papel na fagocitose de eritrócitos e outras células imunes. Alguns trabalhos têm apontado a participação de proteína tirosina fosfatases do parasito como promotor de morte celular através da indução de apoptose da célula do hospedeiro (KIM *et al.*, 2010; TEIXEIRA e MANN, 2002). Trofozoítos de *E. histolytica* utilizam fosfatidilserina para reconhecer e fagocitar células do hospedeiro, a exemplo de eritrócitos (BOETTNER *et al.*, 2005) e linfócitos (HUSTON *et al.*, 2003).

O efeito citopático de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da cepa HM1:IMSS sobre monocamadas de células da linhagem MDCK também apresentou-se significativamente maior, em comparação ao da linhagem avirulenta ICB – 452. A destruição de monocamadas de células de mamíferos por trofozoítos de *E. histolytica* constitui um importante parâmetro utilizado na avaliação do grau de virulência das linhagens desta espécie (KEENE *et al.*, 1990; OROZCO *et al.*, 1983). A amebíase invasiva é caracterizada pela ruptura e invasão da mucosa colônica pelo parasito, e a perda da função da barreira entérica é uma das principais causas de manifestações clínicas observadas nesta doença (LEROY *et al.*, 2000). Os mecanismos citopatogênicos relacionados a este processo envolvem a adesão do trofozoíto à célula do hospedeiro (RAVDIN e GUERRANT, 1981), porém moléculas secretadas pelo parasito também têm sido relatadas na

literatura como causa de citotoxicidade em monocamadas de células de mamíferos (GADASI e KOBILER, 1983; RAVDIN *et al.*, 1985; REED *et al.*, 1989). Alterações na resistência elétrica transepitelial são atribuídas às mudanças moleculares em proteínas do complexo “tight junctions” (*i. e.*, zonula ocludens), como demonstrado por Leroy e colaboradores. (2000). Neste estudo, observou-se uma degradação de ZO-1 e desfosforilação de ZO-2. Em nosso trabalho, observamos que há uma redução significativa da destruição da monocamada de células da linhagem MDCK por trofozoítos de *E. histolytica* da cepa HM1:IMSS pré-tratados por 1 hora com o inibidor de PTPases bpV(phen). O vanadato também apresentou um efeito similar, contudo menor do que o observado para o seu derivado. Estes fatos podem estar ligados à diminuição da especificidade deste composto à PTPases, em comparação aos bpV(phen). O ortovanadato de sódio é caracterizado como um inibidor de fosfatases de amplo espectro, bloqueando também a ação de fosfatases acidófilas e alcalófilas (MCLAUHLAN *et al.*, 2010; WHISNANT e GILMAN, 2002) bem como a atividade de outras enzimas não correlatas, a exemplo de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (MAKIHIRA *et al.*, 2011) e fosfofrutocinase (KHOJA *et al.*, 1996). O bpV(phen) é mil vezes mais potente na inibição da desfosforilação de receptores de insulina autofosforilados *in situ* do que o ortovanadato de sódio (POSNER *et al.*, 1994). Trofozoítos pré-incubados com PAO também apresentaram efeito citopático reduzido, em comparação ao controle.

A detecção citoquímica de fosfatase acidófila por microscopia eletrônica de transmissão de trofozoítos de *E. histolytica* demonstrou que esta atividade se localiza tanto na membrana plasmática destas células, quanto em vacúolos citoplasmáticos. De modo semelhante, Batista e colaboradores (2000), em um trabalho desenvolvido com o objetivo de caracterizar a via endocítica de *E. histolytica*, também demonstrou reação positiva para AcP em vesículas presentes em numerosos compartimentos no endoplasma. Nesse sentido, Temesvari e colaboradores (1999), demonstraram que endossomas tardios, seguidos de iniciais purificados magneticamente, apresentam de forma decrescente maior atividade fosfatase acidófila do que o seu homogenato. Análises de frações microssomais de *E. histolytica* também detectaram atividade para esta enzima em estruturas celulares que apresentavam atividade típica de retículo endoplasmático (SALGADO *et al.*, 2005). Vesículas muito próximas à membrana plasmática com reação positiva para AcP também foram observadas nestas células em nosso estudo, porém não foi possível avaliar se estas tinham natureza exocítica ou endocítica. Além disso, nas três cepas utilizadas, numerosas vesículas marcadas positivamente para atividade fosfatásica em pH ácido foram

visualizadas em provável processo de fusão com compartimentos não marcados para tal atividade. Processos fusionais entre vesículas com conteúdo vacuolar diverso já foram demonstrados neste patógeno, onde se visualizou que alguns compartimentos marcados positivamente para a atividade peroxidase estavam fusionando com vesículas que não apresentavam tal marcação (BATISTA *et al.*, 2000). Ainda em nosso estudo, foram visualizados em trofozoítos da cepa ICB – CSP estruturas semelhantes a corpos multivesiculares apresentando reação positiva para atividade fosfatase em pH ácido. Esta organela já foi descrita neste patógeno, estando associada à destinação final de material a ser degradado (BAÑUELOS *et al.*, 2012).

Em termos comparativos, a cepa HM1:IMSS apresentou maior atividade enzimática do que as cepas ICB – CSP e ICB – 452, particularmente no que concerne à superfície do trofozoíto. Em algumas células, os precipitados eletrondensos presentes na membrana plasmática não apresentavam distribuição uniforme, fato mais frequentemente observado na cepa ICB – 452. De Sá Pinheiro e colaboradores (2007) também demonstrou, através de análise citoquímica para atividade fosfatase, reação positiva na membrana plasmática de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* da cepa invasiva. Em outro estudo, a localização *in situ* da fosfatase acidófila deste patógeno, realizada através de imunodeteção por anticorpo policlonal em fígado de hamster infectado, revelou que esta enzima está presente no sistema vacuolar de trofozoítos, na interface parasito – célula do hospedeiro, e em material engolfado de polimorfonucleares (VENTURA-JUÁREZ *et al.*, 2000). Ainda neste trabalho, foi possível detectar em trofozoítos de *E. histolytica* a marcação pelo anticorpo de alguns grânulos em provável processo secretório, confirmando a hipótese de que a atividade fosfatásica deste patógeno pode ser um importante mecanismo patogênico (VENTURA-JUÁREZ *et al.*, 2000).

Trofozoítos da cepa HM1:IMSS pré-tratados por 1 hora com 1  $\mu$ M de PAO apresentaram uma maior quantidade de depósitos eletrondensos na região extracelular, sugerindo que haja uma maior atividade secretória desta enzima por estas células na presença deste composto. Em diferentes tipos celulares foi constatado o aumento da atividade secretória após tratamento das mesmas com este composto arsênico. Em células acinares do pâncreas de ratos, a mobilização do cálcio pelo PAO de estoques intracelulares induziu um aumento da secreção basal de amilase, efeito este bloqueado pelo uso do ditiotreitol (DTT), indicando que a atuação deste composto provavelmente se dá pela inativação de bombas e/ou canais contendo grupamentos tiol vicinais (LAJAS *et al.*, 1999). Bennett e colaboradores (2000) demonstraram que há uma indução de

'shedding' de L-selectina em neutrófilos incubados com PAO, independente da ativação leucocitária. Em macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), este composto arsênico aumentou, significativamente, a secreção de IL-12p40 pela inibição do elemento de resposta ao AMP cíclico (CRE) (CHO *et al.*, 2010). O PAO é muito utilizado como ferramenta para estudos acerca de processos exo- e endocíticos (TARASENKO *et al.*, 2005), visto que este composto é um conhecido inibidor de endocitose dependente de clatrina (TAKANO *et al.*, 2004; YUMOTO *et al.*, 2006). Após 3 horas de incubação, ainda é possível observar marcação para fosfatase acidófila na superfície do trofozoíto, indicando que o mecanismo de ação desta substância não se dá através da inibição enzimática de fosfatases de *E. histolytica*. Além disso, nestas células foi observada uma dilatação de estruturas que apresentava perfil membranoso e grânulos de glicogênio na região perinuclear, além de vesículas presentes no núcleo observado em trofozoítos tratados com este composto. Vesículas nucleares já foram descritas em trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, assim como acúmulo de grânulos de glicogênio em determinadas regiões citoplasmáticas, porém não relacionadas à dilatação de estruturas associadas à membranas em locais próximos ao núcleo (ROSENBAUM e WITTNER, 1970). É provável que este fenômeno esteja associado a um desequilíbrio na homeostase de cálcio, como observado em alguns eucariotos superiores, onde se visualiza uma dilatação do retículo endoplasmático nestas células com o concomitante aumento do cálcio citoplasmático (LIU *et al.*, 2010; RAEYMAEKERS e LARIVIÈRE, 2011). Em trofozoítos de *E. histolytica*, a secreção de vesículas acídicas por este parasito é dependente de temperatura, microfilamentos, cálcio e estimulada por ésteres de forbol (RAVDIN *et al.*, 1988). Estes mesmos autores também sugeriram que o fluxo de cálcio intracelular e a entrada de cálcio extracelular interferem em processos secretórios neste parasito (RAVDIN *et al.*, 1985).

Após o pré-tratamento destas células com 50  $\mu\text{M}$  de vanadato por 60 minutos, observamos uma menor atividade fosfatase acidófila na membrana do trofozoíto de *Entamoeba histolytica*, e uma secreção menos acentuada do que a observada em trofozoítos pré-incubados com PAO. Vesículas com depósito de material eletrondenso foram observadas em parasitos pré-tratados com o vanadato por 180 minutos, indicando haver uma reversibilidade do efeito observado anteriormente. Uma das explicações para este fato é o provável efeito reversível deste composto em proteína tirosina fosfatases deste patógeno, algo que já foi demonstrado em outros tipos celulares (CUNCIC *et al.*, 1999; MIKALSEN e KAALHUS, 1996). Outra possibilidade é

de que o rápido ‘turnover’ de membranas apresentado por este parasito possibilitaria uma expressão *de novo* de proteínas de superfície pelo mesmo (CALDERÓN *et al.*, 1980). Dilatação de estruturas associadas à membrana em regiões perinucleares também foi observada em trofozoítos tratados pelo mesmo período de tempo supracitado, possivelmente pela inibição de enzimas associadas ao transporte do íon cálcio pelo referido composto. Em um trabalho desenvolvido por Sangramitha e colaboradores (1994), demonstrou-se que houve um alto grau de inibição pelo vanadato da incorporação de cálcio dependente de ATP, com subsequente liberação intracelular deste íon induzida por trifosfato de inositol (InsP<sub>3</sub>). Dados da literatura indicam que este inibidor inespecífico diminui a incorporação de cálcio em *Herpetomas* sp., sendo este efeito relacionado, aparentemente, ao retículo endoplasmático do parasito (SODRÉ *et al.*, 2009). Alguns trabalhos têm evidenciado a presença de retículo endoplasmático em trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (BREDESTON *et al.*, 2005; GIRARD-MISGUICH *et al.*, 2008; VAITHILINGAM *et al.*, 2008). O pré-tratamento do trofozoíto com 50 µM de bpV(phen), por 1 e 3 horas, demonstrou uma redução significativa de depósitos eletrondensos na membrana plasmática do parasito, indicando que há uma irreversibilidade da atividade fosfatase acidófila por este composto. A inibição da capacidade proliferativa de trofozoítos de *E. histolytica* tratados com este derivado de vanádio pode estar relacionada a esta característica associada ao tratamento com o composto supracitado.

Diversos estudos têm apontado a presença de fosfatase acidófila em compartimentos endossomais (TEMESVARI *et al.*, 1999), frações microssomais (SALGADO *et al.*, 2005), fagossomos (BOETTNER *et al.*, 2008; OKADA *et al.*, 2005) e membrana plasmática de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (DE SÁ-PINHEIRO *et al.*, 2007). Além disso, uma fosfatase acidófila expressa pelo parasito foi localizada na interface parasito – célula do hospedeiro, bem como em material engolfado por leucócitos polimorfonucleares (VENTURA-JUÁREZ *et al.*, 2000). A caracterização enzimática destas fosfatases de *E. histolytica* tornou-se possível após a purificação desta enzima, e inibidores ou ativadores específicos foram testados para uma maior compreensão da atividade exercida por estas proteínas neste protozoário. Em um trabalho desenvolvido por Aguirre-García e colaboradores (2003), a inibição de uma fosfatase que apresentava pH ótimo em torno de 5,0 e purificada da fração solubilizada (MAP) de trofozoítos de *E. histolytica*, foi realizada com sucesso em concentrações micromolares por inibidores competitivos de proteínas tirosina fosfatases, como o ortovanadato de sódio, molibdato

de amônio e tungstato de sódio. No entanto, o ácido ocadáico, um conhecido inibidor de serina/treonina fosfatases, não apresentou efeito algum sobre esta enzima (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2000). Entretanto, a fosfatase acidófila secretada (SAP) demonstrou uma resistência parcial a conhecidos inibidores de PTPases (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2000). O reconhecimento da enzima MAP pelo anticorpo que se liga ao domínio catalítico conservado de uma proteína tirosina fosfatase da placenta humana, a PTP-1B, indica que é possível que este sítio também seja conservado na fosfatase do parasito (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2003). Em nosso estudo, a purificação de fosfatases da fração solubilizada de trofozoítos de *E. histolytica* se deu pela metodologia utilizada por Aguirre-García *et al.* (2000). Em um trabalho anterior publicado pelo mesmo grupo, diversas lectinas foram testadas para avaliar a sua capacidade de se ligar à fosfatase acidófila. A concanavalina A (Con A) foi a que apresentou a maior eficiência neste processo (ANAYA-RUIZ *et al.*, 1997). A capacidade desta fosfatase acidófila se ligar à lectinas indica que esta enzima é glicosilada (AGUIRRE-GARCÍA *et al.*, 2003), possivelmente em resíduos de asparagina. A este respeito, foi demonstrado que Con A se liga à glicoproteínas da superfície de trofozoítos de *E. histolytica*, agregando-os em ‘caps’, que são eliminados para o ambiente extracelular através de ‘shedding’ (ARHETS *et al.*, 1995). Este resultado indicou uma alta concentração de manose em N-glicanos (MAGNELLI *et al.*, 2008) A cromatografia de troca aniônica realizada comumente através da coluna de DEAE – celulose é amplamente usada para purificação de diversas fosfatases acidófilas de microorganismos, a exemplo de *Leishmania donovani* (NANDI e SARKAR, 1995) e *Trypanosoma brucei* (AMLABU *et al.*, 2009). Em nosso estudo, observamos que a atividade desta proteína purificada de frações solubilizadas de trofozoítos de *E. histolytica* foi inibida de modo semelhante pelo vanadato e os seus derivados, à exceção do composto que apresenta apenas um grupamento peroxo em sua molécula, o mpV(pic), que demonstrou um efeito inibitório reduzido em comparação às outras substâncias avaliadas. Em contrapartida, o PAO não apresentou inibição desta atividade nas frações testadas, confirmando os achados que obtivemos até o presente momento com relação à atuação destes compostos em proteínas fosfatases de trofozoítos de *E. histolytica*.

No presente estudo, foram detectados diferentes perfis de atividade fosfatásica na superfície de cepas de trofozoítos de *E. histolytica*, com graus de virulência distintos. Tal atividade enzimática foi avaliada em células viáveis, pela adição do substrato exógeno *p*-nitrofenilfosfato, considerado um análogo da fosfotirosina (FURUYA *et al.*, 1998). Além disso, a

inibição da atividade de fosfatases presentes na superfície de trofozoítos pelo vanadato, um clássico inibidor de PTPases (GOMES *et al.*, 2011), indica que existe uma alta probabilidade desta enzima se caracterizar como uma ectofosfatase que hidrolisa substratos que contenham resíduos fosfotirosina em sua sequência de aminoácidos. Dados ultraestruturais de citoquímica enzimática para atividade de fosfatases, através da adição do substrato  $\beta$ -glicerofosfato ao meio de reação em pH 5,0, sugerem que esta ectofosfatase atua em pH ácido. Vesículas presentes no citoplasma do trofozoíto também foram marcadas positivamente para atividade fosfatase em pH ácido. Não foi observada reação positiva para AcP em trofozoítos onde houve a adição do vanadato ao meio de reação, corroborando a hipótese de que se tratam de enzimas que desfosforilam resíduos de fosfotirosina. A purificação da fração solubilizada deste parasito nos forneceu indícios da atuação do vanadato e seus derivados na biologia do parasito, e novos estudos devem ser desenvolvidos para a compreensão dos mecanismos utilizados pelo PAO para alterar aspectos funcionais relevantes em trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

O conjunto de resultados aqui relatado e brevemente discutido indica que a abordagem funcional de proteína tirosina fosfatases em *Entamoeba histolytica* pode promover o entendimento dos mecanismos patogênicos da amebíase, e fornecer valiosas estratégias terapêuticas para esta doença.

## 7. CONCLUSÕES

---

- 7.1. Os trofozoítos de *E. histolytica* apresentam uma maior suscetibilidade aos moduladores da sinalização celular bpV(phen) e PAO, onde há uma relação de concentração-dependência em seus efeitos antiproliferativos;
- 7.2. A análise enzimática revelou que há uma maior atividade secretória de fosfatase acidófila em trofozoítos da linhagem HM1:IMSS, bem como da sua atividade ectofosfatásica, havendo inibição da mesma pelo vanadato e seus derivados. Em contrapartida, a cepa ICB – 452, isolada de paciente assintomático, apresentou, comparativamente, a menor atividade fosfatásica das linhagens testadas neste estudo, indicando a participação destas proteínas como importantes fatores de virulência neste parasito;
- 7.3. Os moduladores OVS, bpv(phen) e PAO interferem em eventos relacionados à virulência em trofozoítos de *E. histolytica*, a exemplo de eritrofagocitose e efeito citopático, indicando no caso específico do vanadato e seu derivado bpV(phen) a provável participação de PTPases do parasito neste processo;
- 7.4. A atividade fosfatase acidófila de trofozoítos de *E. histolytica* é inibida pelo vanadato e bpV(phen), mas não pelo PAO;
- 7.5. A compreensão dos mecanismos envolvidos na suscetibilidade parasitária a este composto poderia ajudar na elucidação dos eventos associados à patogênese da amebíase.

## 8. REFERÊNCIAS

---

- ABRENICA, B.; GILCHRIST, J. S. Nucleoplasmic Ca<sup>(2+)</sup> loading is regulated by mobilization of perinuclear Ca<sup>(2+)</sup>. **Cell Calcium**, v. 28 (2), p. 127-36, 2000.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; ANAYA-RUIZ, M.; TALAMÁS-ROHANA, P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. **Parasitology**, v. 126, p. 195-202, 2003.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; CERBÓN, J.; TALAMÁS-ROHANA, P. Purification and properties of an acid phosphatase from *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 585-91, 2000.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; ROSALES-ENCINA, J. L.; TALAMÁS-ROHANA, P. Secreted *Entamoeba histolytica* acid phosphatase (SAP). **Arch Med Res**, v. 28, p. 184-5, 1997.
- AKBAR, M. A.; CHATTERJEE, N. S.; SEN, P.; DEBNATH, A.; PAL, A.; BERA, T.; DAS, P. Genes induced by a high-oxygen environment in *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 133 (2), p.187-96, 2004.
- ALI, I. K.; CLARK, C. G.; PETRI, W. A. JR. Molecular epidemiology of amebiasis. **Infect Genet Evol**, v. 8 (5), p. 698-707, 2008.
- ALI, V.; NOZAKI, T. Current therapeutics, their problems, and sulfur-containing-amino-acid metabolism as a novel target against infections by “amitochondriate” protozoan parasites. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, p. 164-87, 2007.
- ALONSO, A.; SASIN, J.; BOTTINI, N.; FRIEDBERG, I.; FRIEDBERG, I.; OSTERMAN, A.; GODZIK, A.; HUNTER, T.; DIXON, J.; MUSTELIN, T. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117 (6), p. 699-711, 2004.
- ALONSO, M. T.; GARCÍA-SANCHO, J. Nuclear Ca<sup>(2+)</sup> signalling. **Cell Calcium**, v. 49 (5), p. 280-9, 2011.
- ALVIANO, D. S.; KNEIPP, L. F.; LOPES, A. H.; TRAVASSOS, L. R.; MEYER-FERNANDES, J. R.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S. Differentiation of *Fonsecaea pedrosoi* mycelial forms into sclerotic cells is induced by platelet-activating factor. **Res Microbiol**, v. 154 (10), p. 689-95, 2003.
- AMAZONAS, J. N.; COSENTINO-GOMES, D.; WERNECK-LACERDA, A.; PINHEIRO, A. A.; LANFREDI-RANGEL, A.; DE SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Giardia lamblia*: Characterization of ecto-phosphatase activities. **Exp Parasitol**, v. 121 (1), p. 15-21, 2009.

AMLABU, E.; NOK, A. J.; SALLAU, A. B. Purification and biochemical characterization of lysosomal acid phosphatases (EC 3.1.3.2) from blood stream forms, *Trypanosoma brucei brucei*. **Parasitol Int**, v. 58 (3), p. 238-42, 2009.

ANAYA-RUIZ, M.; PÉREZ-SANTOS, J. L.; TALAMÁS-ROHANA, P. An ecto-protein tyrosine phosphatase of *Entamoeba histolytica* induces cellular detachment by disruption of actin filaments in HeLa cells. **Int J Parasitol**, v. 33, p. 663-70, 2003.

ANAYA-RUIZ, M.; ROSALES-ENCINA, J. L.; TALAMÁS-ROHANA, P. Membrane acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res**, v. 28, p. 182-3, 1997.

ANAYA-VELÁZQUEZ, F.; PADILLA-VACA, F. Virulence of *Entamoeba histolytica*: a challenge for human health research. **Future Microbiol**, v. 6 (3), p. 255-8, 2011.

ANDREEVA, A. V.; KUTUZOV, M. A. Protozoan protein tyrosine phosphatases. **Int J Parasitol**, v. 38 (11), p. 1279-95, 2008.

ANKRI, S.; PADILLA-VACA, F.; STOLARSKY, T.; KOOLE, L.; KATZ, U.; MIRELMAN, D. Antisense inhibition of expression of the light subunit (35 kDa) of the Gal/GalNac lectin complex inhibits *Entamoeba histolytica* virulence. **Mol Microbiol**, v. 33 (2), p. 327-37, 1999.

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, A.; FERREIRA, C. V. **Proteínas** tirosina fosfatases: Propriedades e função biológica. **Quim. Nova**, v. 26 (6), p. 896-900, 2003.

ARHETS, P.; GOUNON, P.; SANSONETTI, P.; GUILLÉN, N. Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 63 (11), p. 4358-67, 1995.

ARRICAU, N.; HERMANT, D.; WAXIN, H.; POPOFF, M. Y. Molecular characterization of the *Salmonella typhi* StpA protein that is related to both *Yersinia* YopE cytotoxin and YopH tyrosine phosphatase. **Res Microbiol**, v. 148 (1), p. 21-6, 1997.

AYEH-KUMI, P. F.; ALI, I. M.; LOCKHART, L. A.; GILCHRIST, C. A.; PETRI, W. A. JR.; HAQUE, R. *Entamoeba histolytica*: genetic diversity of clinical isolates from Bangladesh as demonstrated by polymorphisms in the serine-rich gene. **Exp Parasitol**, v. 99 (2), p. 80-8, 2001.

BAKALARA, N.; SANTARELLI, X.; DAVIS, C.; BALTZ, T. Purification, cloning, and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**, v. 275 (12), p. 8863-71, 2000.

BAKATSELOU, C.; BESTE, D.; KADRI, A. O.; SOMANATH, S.; CLARK, C. G. Analysis of genes of mitochondrial origin in the genus *Entamoeba*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 50 (3), p. 210-4, 2003.

BAÑUELOS, C.; GARCÍA-RIVERA, G.; LÓPEZ-REYES, I.; MENDOZA, L.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; HERRANZ, S.; VINCENT, O.; OROZCO, E. EhADH112 is a Bro1 domain-containing protein involved in the *Entamoeba histolytica* multivesicular bodies pathway. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, 657942, 2012.

BARRETT, W. C.; DEGNORE, J. P.; KENG, Y. J.; KENG, Y. F.; ZHANG, Z.Y.; YIM, M. B.; CHOCK, P. B. Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. **J Biol Chem**, v. 274 (49), p. 34543-6, 1999.

BASSILY, S.; FARID, Z.; EL MASRY, N. A.; MIKHAIL, E. M. 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.

BATISTA, E. J.; DE MENEZES FEITOSA, L. F.; DE SOUZA, W. The endocytic pathway in *Entamoeba histolytica*. **Parasitol Res**, v. 86 (11), p. 881-90, 2000.

BAXT, L. A.; SINGH, U. New insights into *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 21 (5), p. 489-494, 2008.

BAXT, L. A.; RASTEW, E.; BRACHA, R.; MIRELMAN, D.; SINGH, U. Downregulation of an *Entamoeba histolytica* Rhomboid Protease Reveals Roles in Regulating Parasite Adhesion and Phagocytosis. **Eukaryot Cell**, v. 9 (8), p. 1283-93, 2010.

BECK, D. L.; BOETTNER, D. R.; DRAGULEV, B.; READY, K.; NOZAKI, T.; PETRI, W. A. JR. Identification and Gene Expression Analysis of a Large Family of Transmembrane Kinases Related to the Gal/GalNAc Lectin in *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell**, v. 4 (4), p. 722-32, 2005.

BENDESKY, A., MENENDEZ, D., OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutat Res**, v. 511, p. 133-44, 2002.

BENETTON, M. L.; GONÇALVES, A. V.; MENEGHINI, M. E.; SILVA, E. F.; CARNEIRO, M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 99 (7), p. 532-40, 2005.

BENNETT, T. A.; EDWARDS, B. S.; SKLAR, L. A.; ROGELJ, S. Sulfhydryl regulation of L-selectin shedding: phenylarsine oxide promotes activation-independent L-selectin shedding from leukocytes. **J Immunol**, v. 164 (8), p. 4120-9, 2000.

BERNINGHAUSEN, O.; LEIPPE, M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 65, p. 3615-21, 1997.

BLANCHETTE, J.; RACETTE, N.; FAURE, R.; SIMINOVITCH, K. A.; OLIVIER, M. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. **Eur J Immunol**, v. 29, p. 3737-44, 1999.

BLISKA, J. B. Yop effectors of *Yersinia* spp. and actin rearrangements. **Trends Microbiol**, v. 8 (5), p. 205–8, 2000.

BOETTNER, D. R.; HUSTON, C. D.; LINFORD, A. S.; BUSS, S. N.; HOUPPT, E.; SHERMAN, N. E.; PETRI, W. A. JR. *Entamoeba histolytica* Phagocytosis of Human Erythrocytes Involves PATMK, a Member of the Transmembrane Kinase Family. **PLoS Pathog**, v. 4 (1), p. e8, 2008.

BOETTNER, D. R.; HUSTON, C. D.; SULLIVAN, J. A.; PETRI, W. A. JR. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. **Infect Immun**, v. 73, p. 3422–30, 2005.

BOGUMIL, R.; NAMGALADZE, D.; SCHAARSCHMIDT, D.; SCHMACHTEL, T.; HELLSTERN, S.; MUTZEL, R.; ULLRICH, V. Inactivation of calcineurin by hydrogen peroxide and phenylarsine oxide. Evidence for a dithiol-disulfide equilibrium and implications for redox regulation. **Eur J Biochem**, v. 267, p. 1407–1415, 2000.

BRACHA, R.; MIRELMAN, D. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. **J Exp Med**, v. 160 (2), p. 353-68, 1984.

BRAGA, L. L.; GOMES, M. L.; SILVA, M. W.; PAIVA, C.; SALES, A.; MANN, B. J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, p. 467-71, 2001.

BREDESTON, L. M.; CAFFARO, C. E.; SAMUELSON, J.; HIRSCHBERG, C. B. Golgi and endoplasmic reticulum functions take place in different subcellular compartments of *Entamoeba histolytica*. **J Biol Chem**, v. 280 (37), p. 32168-76, 2005.

BROEKHUYSEN, J., STOCKIS, A., LINS, R.L., DE GRAEVE, J., ROSSIGNOL, J.F. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. **Int J Clin Pharmacol Ther**, 38: 387-94, 2000.

BUSATTI, H. G.; GOMES, M. A. A simple colourimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol Res**, v. 101, p. 819-21, 2007.

BUSS, S. N.; HAMANO, S.; VIDRICH, A.; EVANS, C.; ZHANG, Y.; CRASTA, O. R.; SOBRAL, B. W.; GILCHRIST, C. A.; PETRI, W. A. JR. Members of the *Entamoeba histolytica* transmembrane kinase family play non-redundant roles in growth and phagocytosis. **Int J Parasitol**, v. 40 (7), p. 833-43, 2010.

CALDERÓN, J.; MUÑOZ, M. L.; ACOSTA, H. M. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. **J Exp Med**, v. 151 (1), p. 184-93, 1980.

CALLSEN, D.; SANDAU, K. B.; BRÜNE, B. Nitric oxide and superoxide inhibit platelet-derived growth factor receptor phosphotyrosine phosphatases. **Free Radic Biol Med**, v. 26 (11-12), p. 1544-53, 1999.

CARUSO-NEVES, C.; EINICKER-LAMAS, M.; CHAGAS, C.; OLIVEIRA, M. M.; VIEYRA, A.; LOPES, A. G. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes express the ouabain- and vanadate-sensitive (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase activity. **Z Naturforsch C**, v. 53 (11-12), p. 1049-54, 1998.

CEDILLO-RIVERA, R.; RAMÍREZ, A.; MUÑOZ, O. A rapid colorimetric assay with the tetrazolium salt MTT and phenazine methosulfate (PMS) for viability of *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res**, v. 23 (2), p. 59-61, 1992.

CHAN, K. W.; SLOTBOOM, D. J.; COX, S.; EMBLEY, T. M.; FABRE, O.; VAN DER GIEZEN, M.; HARDING, M.; HORNER, D. S.; KUNJI, E. R.; LEÓN-AVILA, G.; TOVAR, J. A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. **Curr Biol**, v. 15 (8), p. 737-42, 2005.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTAÑÓN, G.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Ultrastructural Evidence of Smooth Endoplasmic Reticulum and Golgi-Like Elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Arch Med Res**, v. 31, p. 165-7, 2000.

CHO, Y. C.; LEE, K. Y.; KANG, B. Y.; PARK, H. S. Enhanced IL-12p40 production by phenylarsine oxide is mediated by cAMP response element in macrophages. **Arch Pharm Res**, v. 33 (5), p. 745-51, 2010.

CLARK, C. G.; ALSMARK, U. C.; TAZREITER, M.; SAITO-NAKANO, Y.; ALI, V.; MARION, S.; WEBER, C.; MUKHERJEE, C.; BRUCHHAUS, I.; TANNICH, E.; LEIPPE, M.; SICHERITZ-PONTEN, T.; FOSTER, P. G.; SAMUELSON, J.; NOËL, C. J.; HIRT, R. P.; EMBLEY, T. M.; GILCHRIST, C. A.; MANN, B. J.; SINGH, U.; ACKERS, J. P.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A.; LOHIA, A.; GUILLÉN, N.; DUCHÊNE, M.; NOZAKI, T.; HALL, N. Structure and content of the *Entamoeba histolytica* genome. **Adv Parasitol**, v. 65, p. 51-190, 2007.

COLLOPY-JUNIOR, I.; ESTEVES, F. F.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R. An ectophosphatase activity in *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Res**, v. 6 (7), p. 1010-7, 2006.

CONUS, S.; BRUNO, A.; SIMON, H. U. Leptin is an eosinophil survival factor. **J Allergy Clin Immunol**, v. 116 (6), p. 1228-34, 2005.

CULMSEE, C.; GERLING, N.; LANDSHAMER, S.; RICKERTS, B.; DUCHSTEIN, H. J.; UMEZAWA, K.; KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Nitric oxide donors induce neurotrophin-like survival signaling and protect neurons against apoptosis. **Mol Pharmacol**, v. 68 (4), p. 1006-17, 2005.

CUNCIC, C.; DESMARAIS, S.; DETICH, N.; TRACEY, A. S.; GRESSER, M. J.; RAMACHANDRAN, C. Bis(N,N-dimethylhydroxamido)hydroxooxovanadate inhibition of protein tyrosine phosphatase activity in intact cells: comparison with vanadate. **Biochem Pharmacol**, v. 58 (12), p. 1859-67, 1999.

CUNCIC, C.; DETICH, N.; ETHIER, D.; TRACEY, A. S.; GRESSER, M. J.; RAMACHANDRAN, C. Vanadate inhibition of protein tyrosine phosphatases in Jurkat cells: modulation by redox state. **J Biol Inorg Chem**, v. 4 (3), p. 354-9, 1999.

DE JESUS, J. B.; PODLYSKA, T. M.; HAMPSHIRE, A.; LOPES, C. S.; VANNIER-SANTOS, M. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. **Parasitol Res**, v. 88 (11), p. 991-7, 2002.

DENU, J. M.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. **Curr Opin Chem Biol**, v. 2 (5), p. 633-41, 1998.

DE SÁ PINHEIRO, A. A.; AMAZONAS, J. N.; DE SOUZA BARROS, F.; DE MENEZES, L. F.; BATISTA, E. J.; SILVA, E. F.; DE SOUZA, W.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Entamoeba histolytica*: an ecto-phosphatase activity regulated by oxidation-reduction reactions. **Exp Parasitol**, v. 115(4), p. 352-8, 2007.

DEY, I.; KELLER, K.; BELLEY, A.; CHADEE, K. Identification and characterization of a cyclooxygenase-like enzyme from *Entamoeba histolytica*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100 (23), p. 13561-6, 2003.

DEY, I.; CHADEE, K. Prostaglandin E2 produced by *Entamoeba histolytica* binds to EP4 receptors and stimulates interleukin-8 production in human colonic cells. **Infect Immun**, v. 76 (11), p. 5158-63, 2008.

DICK, C. F.; DOS-SANTOS, A. L.; FONSECA-DE-SOUZA, A. L.; ROCHA-FERREIRA, J.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Trypanosoma rangeli*: differential expression of ecto-phosphatase activities in response to inorganic phosphate starvation. **Exp Parasitol**, v. 124 (4), p. 386-93, 2010.

DUGGAL, P.; HAQUE, R.; ROY, S.; MONDAL, D.; SACK, R. B.; FARR, B. M.; BEATY, T. H.; PETRI, W. A. JR. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. **J Infect Dis**, v. 189 (3), p. 520-6, 2004.

DUGGAL, P.; GUO, X.; HAQUE, R.; PETERSON, K. M.; RICKLEFS, S.; MONDAL, D.; ALAM, F.; NOOR, Z.; VERKERKE, H. P.; MARIE, C.; LEDUC, C. A.; CHUA, S. C. JR.; MYERS, M. G. JR.; LEIBEL, R. L.; HOUP, E.; GILCHRIST, C. A.; SHER, A.; PORCELLA, S. F.; PETRI, W. A. JR. A mutation in the leptin receptor is associated with *Entamoeba histolytica* infection in children. **J Clin Invest**, v. 121 (3), p. 1191-8, 2011.

DUNN, E. F.; CONNOR, J. H. HijAkt: The PI3K/Akt pathway in virus replication and pathogenesis. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 106, p. 223-50, 2012.

EL-KADI, M. A.; DORRAH, A. O.; SHOUKRY, N. M. Patients with gastrointestinal complains due to enteric parasites, with reference to *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* as detected by ELISA *E. histolytica* adhesion in stool. **J. Egypt Soc. Parasitol**, v. 36, p. 53-64, 2006.

EPSTEIN, P.; FORD, T.; PUCCIA, C.; POSSAS, C. D. A. Marine Ecosystem Health. Implications for Public Health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 740, p. 13-23, 1994.

ECHIVARRÍA, W.; LEITE, M. F.; GUERRA, M. T.; ZIPFEL, W. R.; NATHANSON, M. H. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. **Nat Cell Biol**, v. 5 (5), p. 440-6, 2003.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, p. 318-31, 2000.

FADOK, V. A.; VOELKER, D. R.; CAMPBELL, P. A.; COHEN, J. J.; BRATTON, D. L.; HENSON, P. M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **J Immunol**, v. 148 (7), p. 2207-16, 1992.

FERNANDES, E. C.; MEYER-FERNANDES, J. R.; SILVA-NETO, M. A.; VERCESI, A. E. *Trypanosoma brucei*: ecto-phosphatase activity present on the surface of intact procyclic forms. **Z Naturforsch C**, v. 52 (5-6), p. 351-8, 1997.

FONSECA-DE-SOUZA, A. L.; DICK, C. F.; DOS SANTOS, A. L.; FONSECA, F. V.; MEYER-FERNANDES, J. R. *Trypanosoma rangeli*: a possible role for ecto-phosphatase activity on cell proliferation. **Exp Parasitol**, v. 122 (3), p. 242-6, 2009.

FRANCO, E.; SOARES, R. M. A.; MEZA, I. Specific and reversible inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine-proteinase activities by  $Zn^{2+}$ : implications for adhesion and cell damage. **Arch Med Res**, v. 30, p. 82-8, 1999.

FRAQUEZA, G.; BATISTA DE CARVALHO, L. A.; MARQUES, M. P.; MAIA, L.; OHLIN, C. A.; CASEY, W. H.; AURELIANO, M. Decavanadate, decaniobate, tungstate and molybdate interactions with sarcoplasmic reticulum  $Ca^{(2+)}$ -ATPase: quercetin prevents cysteine oxidation by vanadate but does not reverse ATPase inhibition. **Dalton Trans**, v. 41 (41), p. 12749-58, 2012.

FURUYA, T.; ZHONG, L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; LU, H. G.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Ecto-protein tyrosine phosphatase activity in *Trypanosoma cruzi* infective stages. **Mol Biochem Parasitol**, v. 92 (2), p. 339-48, 1998.

GADASI, H.; KOBILER, D. *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. **Exp Parasitol**, v. 55 (1), p. 105-10, 1983.

GARCIA-NIETO, R. M.; RICO-MATA, R.; ARIAS-NEGRETE, S.; AVILA, E. E. Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity. **Parasitol Int**, v. 57 (4), p. 417-23, 2008.

GARDNER, T.B., HILL, D.R. Treatment of giardiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, p. 114-28, 2001.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Mol Immunol**, v. 41 (11), p. 1089-98, 2004.

GERHARD, R.; JOHN, H.; AKTORIES, K.; JUST, I. Thiol-Modifying Phenylarsine Oxide Inhibits Guanine Nucleotide Binding of Rho but Not of Rac GTPases. **Mol Pharmacol**, v. 63, p. 1349–1355, 2003.

GHOSH, S.; FIELD, J.; ROGERS, R.; HICKMAN, M.; SAMUELSON, J. The *Entamoeba histolytica* mitochondrion-derived organelle (crypton) contains double-stranded DNA and appears to be bound by a double membrane. **Infect Immun**, v. 68 (7), p. 4319-22, 2000.

GHOSH, P. K.; VENTURA, G. J.; GUPTA, S.; SERRANO, J.; TSUTSUMI, V.; ORTIZ-ORTIZ, L. Experimental amebiasis: immunohistochemical study of immune cell populations. **J Eukaryot Microbiol**, v. 47, p. 395-9, 2000.

GHOSH, S. K. J.; FIELD, M.; FRISARDI, B.; ROSENTHAL, Z.; MAI, R.; ROGERS.; SAMUELSON, J. Chitinase secretion by encysting *Entamoeba invadens* and transfected *Entamoeba histolytica* trophozoites: localization of secretory vesicles, endoplasmic reticulum, and Golgi apparatus. **Infect Immun**, v. 67, p. 3073–81, 1999.

GILCHRIST, C. A.; PETRI, W. A. Virulence factors of *Entamoeba histolytica*. **Curr Opin Microbiol**, v. 2 (4), p. 433-7, 1999. Review.

GILMAN, R. H.; PRATHAP, K. Acute intestinal amoebiasis--proctoscopic appearances with histopathological correlation. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 65, p. 359-65, 1971.

GIRARD-MISGUICH, F.; SACHSE, M.; SANTI-ROCCA, J.; GUILLÉN, N. The endoplasmic reticulum chaperone calreticulin is recruited to the uropod during capping of surface receptors in *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 157 (2), p. 236-40, 2008.

GOMES, M T.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. Possible roles of ectophosphatases in host-parasite interactions. **J Parasitol Res**, v. 2011, 479146, 2011

GONZALEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R.; AGUIRRE, A.; CASTANON, G.; HALL, A.; GUHL, F.; RUIZ-PALACIOS, G.; MILES, A.; WARHURST, D. C. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. **J Clin Pathol**, v. 47, p. 236–239, 1994.

GUAN, K. L.; DIXON, J. E. Bacterial and viral protein tyrosine phosphatases. **Semin Cell Biol**, v. 4 (6), p. 389-96, 1993.

GUAN, K. L.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. **Science**, v. 249, p. 553-6, 1990.

HAGHIGHI, A.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; MASUDA, G.; NOZAKI, T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. **J Clin Microbiol**, v. 40 (11), p. 4081-90, 2002.

HAQUE, R.; ALI, I. K.; PETRI, W. A. JR. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 60, p. 1031–1034, 1999.

HAQUE, R.; FARUQUE, A. S.; PETRI, W. A. JR. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. **Arch Med Res**, v. 28, p. 317-8, 1997.

HENDRIKS, W. J.; ELSON, A.; HARROCH, S.; PULIDO, R.; STOKER, A.; DEN HERTOOG, J. Protein tyrosine phosphatases in health and disease. **FEBS J**, 2012.

HENEBERG, P. Finding the smoking gun: protein tyrosine phosphatases as tools and targets of unicellular microorganisms and viruses. **Curr Med Chem**, v. 19 (10), p. 1530-66, 2012.

HERRERA-RODRÍGUEZ, S. E.; BAYLÓN-PACHECO, L.; TALAMÁS-ROHANA, P.; ROSALES-ENCINA, J. L. Cloning and partial characterization of *Entamoeba histolytica* PTPases. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, p. 1014-21, 2006.

HILL, J.; SAMUEL, J. E. *Coxiella burnetii* acid phosphatase inhibits the release of reactive oxygen intermediates in polymorphonuclear leukocytes. **Infect Immun**; v. 79 (1), 2011.

HMADCHA, A.; CARBALLO, M.; CONDE, M.; MÁRQUEZ, G.; MONTESEIRÍN, J.; MARTIN-NIETO, J.; BEDOYA, F. J.; PINTADO, E.; SOBRINO, F. Phenylarsine oxide increases intracellular calcium mobility and inhibits Ca<sup>(2+)</sup>-dependent ATPase activity in thymocytes. **Mol Genet Metab**, v. 68 (3), p. 363-70, 1999.

HUGHES, M. A.; PETRI, W. A. JR. Amebic liver abscess. **Infect Dis Clin North Am**, v. 14, p. 565-82, 2000.

HUNG, C. C.; KO, N. Y.; KO, W. C.; LEE, H. C.; JI, D. D.; LIU, W. C.; CHANG, S. C. Amoebiasis among patrons visiting gay saunas in Taiwan. **HIV Med**, v. 9 (9), p. 787-9, 2008.

HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. **Cell**, v. 80 (2), p. 225-36, 1995. Review

HUSAIN, A.; JEELANI, G.; SATO, D.; NOZAKI, T. Global analysis of gene expression in response to L-Cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 275, 2011.

HUSTON, C. D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends Parasitol**, v. 20, p. 23-6, 2004.

HUSTON, C. D.; BOETTNER, D. R.; MILLER-SIMS, V.; PETRI, W. A. JR.. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Infect. Immun**, v. 71, p. 964–72, 2003.

HUYER, G.; LIU, S.; KELLY, J.; MOFFAT, J.; PAYETTE, P.; KENNEDY, B.; TSAPRAILIS, G.; GRESSER, M. J.; RAMACHANDRAN, C. Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. **J Biol Chem**, v. 272 (2), p. 843-51, 1997.

INOUE, H.; KAKU, K.; MATSUTANI, A.; TAO, T.; AYAME, H.; KANEKO, T. Insulin-like effects of vanadate on rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA and protein inductions in diabetic rats. **Endocr J**, v. 41 (1), p. 75-82, 1994.

JAMES, R.; BARRATT, F.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J.; STARK, D. Seroprevalence of *Entamoeba histolytica* Infection among Men Who Have Sex with Men in Sydney, Australia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83 (4), p. 914–916, 2010.

JARILLO-LUNA, R. A.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; TSUTSUMI, V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. **Exp Parasitol**, v. 101, p. 40-56, 2002.

KADOTA, S.; FANTUS, I. G.; DKRAGON, G.; GUYDA, H. J.; POSNER, B. I. Stimulation of insulin-like growth factor II receptor binding and insulin receptor kinase activity in rat adipocytes. Effects of vanadate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **J Biof Chem**, v. 262, p. 8252-8256, 1987.

KASSEEM, H. H.; ZAED, H. A.; SADAGA, G. A. Intestinal parasitic infection among children and neonatus admitted to Ibn-Sina Hospital, Sirt Libya. **J. Egypt Soc. Parasitol**, v. 37, p. 371–380, 2007.

KASTNER, R.; DUSSURGET, O.; ARCHAMBAUD, C.; KERNBAUER, E.; SOULAT, D.; COSSART, P. DECKER, T. LipA, a tyrosine and lipid phosphatase involved in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Infect Immun**, v. 79 (6), p. 2489–2498, 2011.

KAVOUSI, S. Giardiasis in infancy and childhood: a prospective study of 160 cases with comparison of quinacrine (Atabrine) and metronidazole (Flagyl). **Am J Trop Med Hyg**, v. 28, p. 19-23, 1979.

KEENE, W. E.; HIDALGO, M. E.; OROZCO, E.; MCKERROW, J. H. *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase **Experimental Parasitology**, v. 71 (2), p. 199–206, 1990.

KELSALL, B. L.; RAVDIN, J. I. Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis**, v. 168 (5), p. 1319-22, 1993.

KHOJA, S. M.; ABUELGASSIM, A. O.; AL-BAR, O. A. Effect of vanadate on the activity of rat jejunal 6-phosphofructo-1-kinase. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v. 115 (3), p. 217-21, 1996.

KIFFER-MOREIRA, T.; DE SÁ PINHEIRO, A. A.; ALVIANO, W. S.; BARBOSA, F. M.; SOUTO-PADRÓN, T.; NIMRICHTER, L.; RODRIGUES, M. L.; ALVIANO, C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R. An ectophosphatase activity in *Candida parapsilosis* influences the interaction of fungi with epithelial cells. **FEMS Yeast Res**, v. 7 (4), p. 621-8, 2007.

KIM, K. A.; LEE, Y. A.; SHIN M. H. Calpain-dependent cleavage of SHP-1 and SHP-2 is involved in the dephosphorylation of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. **Parasite Immunol**, v. 32 (3), p. 176-83, 2010

KÖHLER, S.; TANNICH, E. A family of transcripts (K2) of *Entamoeba histolytica* contains polymorphic repetitive regions with highly conserved elements. **Mol Biochem Parasitol**, v. 59 (1), p. 49-58, 1993.

KROGSTAD, D. J.; SPENCER, H. C. JR.; HEALY, G. R.; GLEASON, N. N.; SEXTON, D. J.; HERRON, C. A. Amebiasis: Epidemiologic studies in the United States, 1971-1974. **AM Intern Med**, p. 8839-97, 1978.

LAJAS, A. I.; POZO, M. J.; CAMELLO, P. J.; SALIDO, G. M.; SINGH, J.; PARIENTE, J. A. Effect of dephostatin on intracellular free calcium concentration and amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. **Mol Cell Biochem**, v. 205 (1-2), p.163-9, 2000.

LAJAS, A. I.; POZO, M. J.; CAMELLO, P. J.; SALIDO, G. M.; PARIENTE, J. A. Phenylarsine oxide evokes intracellular calcium increases and amylase secretion in isolated rat pancreatic acinar cells. **Cell Signal**, v. 11 (10), p. 727-34, 1999.

LAM, Q. L.; LIU, S.; CAO, X.; LU, L. Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. **Eur J Immunol**, v. 36 (12), p. 3118-30, 2006.

LEIPPE, M.; ANDRÄ, J.; NICKEL, R.; TANNICH, E.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. 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 (5), p. 895-904, 1994.

LEJEUNE, M.; RYBICKA, J. M.; CHADEE, K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. **Future Microbiology**, v. 4, p. 105-18, 2009.

LEROY, A.; LAUWAET, T.; DE BRUYNE, G.; CORNELISSEN, M.; MAREEL, M. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. **FASEB J**, v. 14, p. 1139-46, 2000.

LEVI, G. C.; DE AVILA, C. A.; NETO, V. A. Efficacy of various drugs in treatment of giardiasis: comparative study. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 19, p. 422-4, 1977.

LI, Y. P.; CURLEY, G.; LOPEZ, M.; CHAVEZ, M.; GLEW, R.; ARAGON, A.; KUMAR, H.; BACA, O. G. Protein-tyrosine phosphatase activity of *Coxiella burnetii* that inhibits human neutrophils. **Acta Virol**, v. 40 (5-6), p. 263-72, 1996.

LI, E.; STENSON, W. F.; KUNZ-JENKINS, C.; SWANSON, P. E.; DUNCAN, R.; STANLEY, S. L. JR. *Entamoeba histolytica* interactions with polarized human intestinal Caco-2 epithelial cells. **Infect Immun**, v. 62, p. 5112-9, 1994.

LINDMARK, D.G., MÜLLER, M. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 10, p. 476-82, 1976.

LINDMO, K.; STENMARK, H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. **J Cell Sci**, v. 119, p. 605-14, 2006. Review.

LIU, X.; ONG, H. L.; PANI, B.; JOHNSON, K.; SWAIM, W. B.; SINGH, B.; AMBUDKAR, I. Effect of cell swelling on ER/PM junctional interactions and channel assembly involved in SOCE. **Cell Calcium**, v. 47 (6), p. 491-9, 2010.

LOFTUS, B.; I. ANDERSON, R.; DAVIES, U. C.; ALSMARK, J.; SAMUELSON, P.; AMEDEO, P.; RONCAGLIA, M.; BERRIMAN, R. P.; HIRT, B. J.; MANN, T.; NOZAKI, B.; SUH, M.; POP, M.; DUCHENE, J.; ACKERS, E.; TANNICH, M.; LEIPPE, M.; HOFER, I.; BRUCHHAUS, U.; WILLHOEFT, A.; BHATTACHARYA, T.; CHILLINGWORTH, C.; CHURCHER, Z.; HANCE, B.; HARRIS, D.; HARRIS, K.; JAGELS, S.; MOULE, K.; MUNGALL, D.; ORMOND, R.; SQUARES, S.; WHITEHEAD, M. A.; QUAIL, E.; RABBINOWITSCH, H.; NORBERTCZAK, C.; PRICE, Z.; WANG, N.; GUILLEN, C.; GILCHRIST, S. E.; STROUP, S.; BHATTACHARYA, A.; LOHIA, P. G.; FOSTER, T.; SICHERITZ-PONTEN, C.; WEBER, U.; SINGH, C.; MUKHERJEE, N. M.; EL- SAYED, PETRI, W. A. JR.; CLARK, C. G.; EMBLEY, T. M.; BARRELL, B.; FRASER, C. M.; HALL, N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **Nature**, v. 433, p. 865-868, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193 (1), p. 265-75, 1951.

MACFARLANE, R. C.; SINGH, U. Identification of an *Entamoeba histolytica* serine-, threonine-, and isoleucine-rich protein with roles in adhesion and cytotoxicity. **Eukaryot Cell**, v. 6 (11), p. 2139-46, 2007.

MACFARLANE, R.; BHATTACHARYA, D.; SINGH, U. Genomic DNA microarrays for *Entamoeba histolytica*: applications for use in expression profiling and strain genotyping. **Exp Parasitol**, v. 110 (3), p. 196-202, 2005.

MAGNELLI, P.; CIPOLLO, J. F.; RATNER, D. M.; CUI, J.; KELLEHER, D.; GILMORE, R.; COSTELLO, C. E.; ROBBINS, P. W.; SAMUELSON, J. Unique Asn-linked oligosaccharides of the human pathogen *Entamoeba histolytica*. **J Biol Chem**, v. 283 (26), p. 18355-64, 2008.

MAI, Z.; SAMUELSON, J. A new gene family (ariel) encodes asparagine-rich *Entamoeba histolytica* antigens, which resemble the amebic vaccine candidate serine-rich *E. histolytica* protein. **Infect Immun**, v. 66 (1), p. 353-5, 1998.

MAKIHIRA, S.; NIKAWA, H.; KAJIYA, M.; KAWAI, T.; MINE, Y.; KOSAKA, E.; SILVA, M. J.; TOBIUME, K.; TERADA, Y. Blocking of sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase- $\alpha 1$  with ouabain and vanadate suppresses cell-cell fusion during RANKL-mediated osteoclastogenesis. **Eur J Pharmacol**, v. 670 (2-3), p. 409-18, 2011.

MALDONADO-BERNAL, C.; KIRSCHNING, C. J.; ROSENSTEIN, Y.; ROCHA, L. M.; RIOS-SARABIA, N.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; BECKER, I.; ESTRADA, I.; SALAZAR-GONZÁLEZ, R. M.; LÓPEZ-MACÍAS, C.; WAGNER, H.; SÁNCHEZ, J.; ISIBASI, A. The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. **Parasite Immunol**, v. 27 (4), p. 127-37, 2005.

MANN, B. J.; TORIAN, B. E.; VEDVICK, T. S.; PETRI, W. A. JR.. Sequence of the cysteine-rich heavy subunit of the galactose lectin of *Entamoeba histolytica*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 3248-3252, 1991.

MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298 (5600), p. 1912-34, 2002.

MANNING, G.; PLOWMAN, G. D.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends Biochem Sci**, v. 27 (10), p. 514-20, 2002.

MARTINEZ-PALOMO, A.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; CHÁVEZ, B.; OROZCO, E.; FERNÁNDEZ-CASTELO, S.; CERVANTES, A. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J Protozool**, v. 32 (1), p. 166-75, 1985.

MARTINEZ-PALOMO, A. The Biology of *Entamoeba histolytica*. **Immunology**, v. 49 (1), p. 201–202, 1983.

MARTINY, A.; MEYER-FERNANDES, J. R.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M. A. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania amastigotes*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 102 (1), p. 1-12, 1999.

MCCOY, J. J.; WEAVER, A. M.; PETRI, W. A. JR. Use of monoclonal anti-light subunit antibodies to study the structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc adherence lectin. **Glycoconj J**, v. 11, p. 432-6, 1994.

MCLAUCHLAN, C. C.; HOOKER, J. D.; JONES, M. A.; DYMON, Z.; BACKHUS, E. A.; GREINER, B. A.; DORNER, N. A.; YOUKHANA, M. A.; MANUS, L. M. Inhibition of acid, alkaline, and tyrosine (PTP1B) phosphatases by novel vanadium complexes. **J Inorg Biochem**, v. 104 (3), p. 274-81, 2010.

MEHRA, A.; FREDRICK, J.; PETRI, W. A. JR.; BHATTACHARYA, S.; BHATTACHARYA, A.; Expression and Function of a Family of Transmembrane Kinases from the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun**, v. 74 (9), p. 5341–5351, 2006.

MENDOZA-MACÍAS, C. L.; BARRIOS-CEBALLOS, M. P.; DE LA PEÑA, L. P.; RANGEL-SERRANO, A.; ANAYA-VELÁZQUEZ, F.; MIRELMAN, D.; PADILLA-VACA, F. *Entamoeba histolytica*: effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with *Escherichia coli* 055. **Exp Parasitol**, v. 121 (2), p. 167-74, 2009.

MEYER-FERNANDES, J. R.; DA SILVA-NETO, M. A.; SOARES, M. S.; FERNANDES, E.; VERCESI, A. E.; DE OLIVEIRA, M. M. Ecto-phosphatase activities on the cell surface of the amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Z Naturforsch C**, v. 54 (11), p. 977-84, 1999.

MEZA, I.; TALAMÁS-ROHANA. P.; VARGAS, M. A. The cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: structure, function, and regulation by signaling pathways. **Arch Med Res**, v. 37, p. 234-43, 2006.

MEZA, I. Extracellular matrix-induced signaling in *Entamoeba histolytica*: its role in invasiveness. **Parasitol Today**, v. 16, p. 23-8, 2000.

MIKALSEN, S. O.; KAALHUS, O. A characterization of pervanadate, an inducer of cellular tyrosine phosphorylation and inhibitor of gap junctional intercellular communication. **Biochim Biophys Acta**, v. 1290 (3), p. 308-18, 1996.

MITTAL, K.; WELTER, B. H.; TEMESVARI, L. A. *Entamoeba histolytica*: lipid rafts are involved in adhesion of trophozoites to host extracellular matrix components. **Exp Parasitol**, v. 120 (2), p. 127-34, 2008.

MOORE, S. E.; MORGAN, G.; COLLINSON, A. C.; SWAIN, J. A.; O'CONNELL, M. A.; PRENTICE, A. M. Leptin, malnutrition, and immune response in rural Gambian children. **Arch Dis Child**, v. 87 (3), p. 192-7, 2002.

MORTIMER, L.; CHADEE, K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. **Exp Parasitol**, v. 126 (3), p. 366-80, 2010.

NACCACHE, P. H.; GILBERT, C.; CAON, A. C.; GAUDRY, M.; HUANG, C. K.; BONAK, V. A.; UMEZAWA, K.; MCCOLL, S. R. Selective inhibition of human neutrophil functional responsiveness by erbstatin, an inhibitor of tyrosine protein kinase. **Blood**, v. 76, p. 2098-104, 1990.

NAJIB, S.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway. **Cell Immunol**, v. 220 (2), p. 143-9, 2002.

NANDAN, D.; KNUTSON, K. L.; LO, R.; REINER, N. E. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. **J Leukoc Biol**, v. 67, p. 464-70, 2000.

NANDI, S.; SARKAR, D. Partial purification and characterization of a soluble protein phosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol Cell Biochem**, v. 148 (2), p. 191-8, 1995.

NAVARRO-GARCÍA, F.; CHÁVEZ-DUEÑAS, L.; TSUTSUMI, V.; POSADAS DEL RÍO, F.; LÓPEZ-REVILLA, R. *Entamoeba histolytica*: increase of enterotoxicity and of 53- and 75-kDa cysteine proteinases in a clone of higher virulence. **Exp Parasitol**, v. 80 (3), p. 361-72, 1995.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NINFA, E. G.; DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatases in disease processes. **Trends Cell Biol**, v. 4 (12), p. 427-30, 1994.

NORHAYATI, T. S. A. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: a review. **M.Trop Biomed**, v. 28 (2), p. 194-222, 2011. Review

NOZAKI, T.; KOBAYASHI, S.; TAKEUCHI, T.; HAGHIGHI, A. Diversity of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* in Japan. **Arch. Med. Res**, v. 37, p. 277-79, 2006.

ODA, M.; SAKITANI, K.; KAIBORI, M.; INOUE, T.; KAMIYAMA, Y.; OKUMURA, T. Vicinal dithiol-binding agent, phenylarsine oxide, inhibits inducible nitric-oxide synthase gene expression at a step of nuclear factor-B DNA binding in hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 275, p. 4369-4373, 2000.

OKADA, M.; HUSTON, C. D.; MANN, B. J.; PETRI, W. A. JR.; KITA, K.; NOZAKI, T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell**, v. 4 (4), p. 827-31, 2005.

OROZCO, E.; GUARNEROS, G.; MARTINEZ-PALOMO, A.; SÁNCHEZ, T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. **J Exp Med**, v. 158 (5), p. 1511-21, 1983.

ÖSTMAN, A.; BÖHMER, F. D. Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases. **Trends Cell Biol**, v. 11 (6), p. 258-66, 2001.

PAPATHANASSOGLU, E.; EL-HASCHIMI, K.; LI, X. C.; MATARESE, G.; STROM, T.; MANTZOROS, C. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. **J Immunol**, v. 176 (12), p. 7745-52, 2006.

PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. **J Immunol**, v. 167 (6), p. 3391-7, 2001.

PEREZ, M.; HASCHKE, B.; DONATO, N. J. Differential expression and translocation of protein tyrosine phosphatase 1B-related proteins in ME-180 tumor cells expressing apoptotic sensitivity and resistance to tumor necrosis factor: potential interaction with epidermal growth factor receptor. **Oncogene**, v. 18, p. 967-78, 1999.

PERSON, C. N.; CARBALLEIRA, H.; WOLF-WATZ.; FALLMAN, M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia* tyrosine phosphorylation of p130<sup>Cas</sup> and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesions. **EMBO J**, v. 16, p. 2307-2318.

PIMENTEL, D.; COOPERSTEIN, S.; RANDELL, H.; FILIBERTO, D.; SORRENTINO, S.; KAYE, B.; NICKLIN, C.; YAGI, J.; BRIAN, J.; O'HERN, J.; HABAS, A.; WEINSTEIN, C. Ecology of Increasing Diseases: Population Growth and Environmental Degradation. **Hum Ecol**, v. 35, p. 653-668, 2007.

PIRES-SANTOS, G. M.; SANTANA-ANJOS, K. G.; VANNIER-SANTOS, M. A. Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing in vitro. **Exp Parasitol**, v. 4894 (12), p. 290-1, 2012.

PORTELA, M. B.; KNEIPP, L. F.; RIBEIRO DE SOUZA, I. P.; HOLANDINO, C.; ALVIANO, C. S.; MEYER-FERNANDES, J. R.; DE ARAÚJO SOARES, R. M. Ectophosphatase activity in *Candida albicans* influences fungal adhesion: study between HIV-positive and HIV-negative isolates. **Oral Dis**, v. 16 (5), p. 431-7, 2010.

POSNER, B. I.; FAURE, R.; BURGESS, J. W.; BEVAN, A. P.; LACHANCE, D.; ZHANG-SUN, G.; FANTUS, I. G.; NG, J. B.; HALL, D. A.; LUM, B. S.; SHAVER, A. Peroxovanadium

compounds. A new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269 (6), p. 4596-604, 1994.

QUE, X.; REED, S. L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13 (2), p. 196–206, 2000.

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

RAEYMAEKERS, L.; LARIVIÈRE, E. Vesicularization of the endoplasmic reticulum is a fast response to plasma membrane injury. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 414 (1), p. 246-51, 2011.

RAGLAND, B. D.; ASHLEY, L. S.; VAUX, D. L.; PETRI, W. A. JR. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. **Exp Parasitol**, v. 79, p. 460-7, 1994.

RALSTON, K. S.; PETRI, W. A. JR. Tissue destruction and invasion by *Entamoeba histolytica*. **Trends Parasitol**, v. 27 (6), p. 254–263, 2011.

RAVDIN, J. I.; ABD-ALLA, M. D.; WELLES, S. L.; REEDY, S.; JACKSON, T. F. Intestinal antilectin immunoglobulin A antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. **Infect Immun**, v. 71, p. 6899–6905, 2003.

RAVDIN, J. I. Amebiasis. Series on tropical medicine: Science and practice – vol. 2. Imperial College Press. London, 2000.

RAVDIN, J. I.; MURPHY, C. F.; SCHLESINGER, P. H. The cellular regulation of vesicle exocytosis by *Entamoeba histolytica*. **J Protozool**, v. 35 (1), p. 159-63, 1988.

RAVDIN, J. I.; MURPHY, C. F.; GUERRANT, R. L.; LONG-KRUG, S. A. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis**, v. 152, p. 542-9, 1985.

RAVDIN, J. I.; SPERELAKIS, N.; GUERRANT, R. L. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis**, v. 146, p. 335-40, 1982.

RAVDIN, J. I.; GUERRANT, R. L. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. **J Clin Invest**, v. 68 (5), p. 1305-13, 1981.

RAVDIN, J. I.; CROFT, B. Y.; GUERRANT, R. L. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J Exp Med**, v. 152, p. 377-90, 1980.

REED, S. L.; EMBER, J. A.; HERDMAN, D. S.; DISCIPIO, R. G.; HUGLI, T. E.; GIGLI, I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. **J Immunol**, v. 155 (1), p. 266-74, 1995.

REED, S. L.; KEENE, W. E.; MCKERROW, J. H. Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **J Clin Microbiol**, v. 27 (12), p. 2772-7, 1989.

REYES-LÓPEZ, M.; BERMÚDEZ-CRUZ, R. M.; AVILA, E. E.; DE LA GARZA, M. Acetaldehyde/alcohol dehydrogenase-2 (EhADH2) and clathrin are involved in internalization of human transferrin by *Entamoeba histolytica*. **Microbiology**, v. 157, p. 209-19, 2011.

RODRÍGUEZ, M. A.; OROZCO, E. Isolation and characterization of phagocytosis- and virulence-deficient mutants of *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis**, v. 154(1), p. 27-32, 1986.

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 (2), p. 367-82, 1970.

ROSSIGNOL, J. F.; AYOUB, A.; AYERS, M. S. Treatment of diarrhea caused by *Giardia intestinalis* and *Entamoeba histolytica* or *E. dispar*: a randomized, double-blind, placebo-controlled study of nitazoxanide. **J Infect Dis**, v. 184 (3), p. 381-4, 2001.

RYAN, K. R.; SHAPIRO, L. Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. **Annu Rev Biochem**, v. 72, p. 367-94, 2003.

SALATA, R. A.; PEARSON, R. D.; RAVDIN, J. I. Interaction of human leukocytes and *Entamoeba histolytica*. Killing of virulent amebae by the activated macrophage. **J Clin Invest**, v. 76, p. 491-9, 1985.

SALGADO, M.; VILLAGÓMEZ-CASTRO, J. C.; ROCHA-RODRÍGUEZ, R.; SABANERO-LÓPEZ, M.; RAMOS, M. A.; ALAGÓN, A.; LÓPEZ-ROMERO, E.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, R. *Entamoeba histolytica*: biochemical and molecular insights into the activities within microsomal fractions. **Exp Parasitol**, v. 110 (4), p. 363-73, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SANTOS, H. L.; PERALTA, R. H.; DE MACEDO, H. W.; BARRETO, M. G.; PERALTA, J. M. Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Braz J Infect Dis**, v. 11, p. 365-70, 2007.

SANTOS, F. L. N.; SOARES, N. M. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44 (4), p. 249-61, 2008.

SATERIALE, A.; HUSTON, C. D. A Sequential Model of Host Cell Killing and Phagocytosis by *Entamoeba histolytica*. **J Parasitol Res**, 2011.

SAVIOLI, L.; SMITH, H.; THOMPSON, A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. **Trends Parasitol**, v. 22, p. 203-8, 2006.

SCHULTE, W.; SCHOLZE, H. Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. **J Protozool**, v. 36 (6), p. 538-43, 1989.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **Open Med Chem J**, v. 5, p. 31-39, 2011.

SEYDEL, K. B.; STANLEY, S. L. JR. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. **Infect Immun**, v. 66, p. 2980-3, 1998.

SHIO, M. T.; HASSANI, K.; ISNARD, A.; RALPH, B.; CONTRERAS, I.; GOMEZ, M. A.; ABU-DAYYEH, I.; OLIVIER, M. Host cell signalling and *Leishmania* mechanisms of evasion. **J Trop Med**, 2012.

SIGNORINI, M.; BERGAMINI, C. M. Vanadate promotes photooxidative cleavage and inactivation of muscle phosphofructokinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 172 (2), p. 919-24, 1990.

SILVA, E. F. *Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade in vivo e in vitro. Belo Horizonte [Tese de doutorado em Parasitologia – IC B/UFMG], 1997.

SILVA, M. C.; MONTEIRO, C. DO S.; ARAÚJO, B. DOS A.; SILVA, J. V.; PÓVOA, M. M. Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belém, Pará, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection. **Cad Saude Publica**, v. 21, p. 969-73, 2005.

SIMJEE, A. E.; GATHIRAM, V.; JACKSON, T.F.; KHAN, B. F. A comparative trial of metronidazole v. tinidazole in the treatment of amoebic liver abscess. **S Afr Med J**, v. 68, p. 923-24, 1985

SODRÉ, C. L.; MOREIRA, B. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; DUTRA, P. M.; LOPES, A. H.; SCOFANO, H. M.; BARRABIN, H. Characterization of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in a subcellular membrane fraction of *Herpetomonas* sp. promastigotes. **Parasitology**, v. 136 (6), p. 657-63, 2009.

STONE, R. L.; DIXON, J. E. Protein-tyrosine phosphatases. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 1323–26, 1994.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, p. 1104-7, 2000.

TAKANO, M.; KOYAMA, Y.; NISHIKAWA, H.; MURAKAMI, T.; YUMOTO, R. Segment-selective absorption of lysozyme in the intestine. **Eur J Pharmacol**, v. 502 (1–2), p. 149–155, 2004.

TALAMÁS-ROHANA, P.; AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; ANAYA-RUIZ, M.; ROSALES-ENCINA, J. L. *Entamoeba dispar* contains but does not secrete acid phosphatase as does *Entamoeba histolytica*. **Exp Parasitol**, v. 92, p. 219-22, 1999.

TARASENKO, A.S.; KOSTRZHEVSKA, O. G.; STORCHAK, L. G.; LINETSKA, M. V.; BORISOVA, T. A.; HIMMELREICH, N. H. Phenylarsine oxide is able to dissipate synaptic vesicle acidic pool. **Neurochem Int**, v. 46 (7), p. 541-50, 2005.

TRAN, V. Q.; HERDMAN, D. S.; TORIAN, B. E.; REED, S. L. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. **J Infect Dis**, v. 177 (2), p. 508-11, 1998.

TEIXEIRA, J. E.; HUSTON, C. D. Participation of the Serine-Rich *Entamoeba histolytica* Protein in Amebic Phagocytosis of Apoptotic Host Cells. **Infect Immun**, v. 76 (3), p. 959–966, 2008.

TEIXEIRA, J. E.; HUSTON, C. D. Evidence of a continuous endoplasmic reticulum in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Eukaryot Cell**, v. 7 (7), p. 1222-6, 2008.

TEIXEIRA, J. E.; MANN, B. J. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. **Infect Immun**, v. 70, p. 1816-23, 2002.

TEMESVARI, L. A.; HARRIS, E. N.; STANLEY, S. L. JR.; CARDELLI, J. A. Early and late endosomal compartments of *Entamoeba histolytica* are enriched in cysteine proteases, acid phosphatase and several Ras-related Rab GTPases. **Mol Biochem Parasitol**, v. 103 (2), p. 225-41, 1999.

TENGGU, S. A.; NORHAYATI, M. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: a review. **Trop Biomed**, v. 28 (2), p. 194-222, 2011.

THOMAS, J. A.; MALLIS, R. J. Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls. **Exp Gerontol**, v. 36 (9), p. 1519-26, 2001.

TONKS, N. The family of Protein Tyrosine Phosphatases and the Control of Cellular Signaling Responses. **Principles of Medical Biology**, v. (4), p. 179-199, 1996.

TOVAR, J.; FISCHER, A.; CLARK, C. G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. **Mol Microbiol**, v. 32 (5), p. 1013-21, 1999.

UMEZAWA, K.; KAWAKAMI, M.; WATANABE, T. Molecular design and biological activities of protein-tyrosine phosphatase inhibitors. **Pharmacol Ther**, v. 99 (1), p. 15-24, 2003.

URBAN, S.; FREEMAN, M. Substrate specificity of Rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. **Molecular Cell**, v. 11, p. 1425-1434, 2003.

URBAN, S. Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. **Genes and Development**, v. 20 (22), p. 3054-68, 2006.

VAITHILINGAM, A.; TEIXEIRA, J. E.; HUSTON, C. D. Endoplasmic reticulum continuity in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*: Evolutionary implications and a cautionary note. **Commun Integr Biol**, v. 1 (2), p. 172-4, 2008.

VAY, L.; HERNÁNDEZ-SANMIGUEL, E.; LOBATÓN, C. D.; MORENO, A.; MONTERO, M.; ALVAREZ, J. Mitochondrial free [Ca<sup>2+</sup>] levels and the permeability transition. **Cell Calcium**, v. 45 (3), p. 243-50, 2009.

VÁZQUEZ, J.; FRANCO, E.; REYES, G.; MEZA, I. Characterization of adhesion plates induced by the interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with fibronectin. **Cell Motil Cytoskeleton**, v. 32 (1), p. 37-45, 1995.

VEGA-ROBLEDO, G. B.; LEANDRO, E.; SILVA, R.; OLIVOS, A.; RICO, G. Effect of zinc-treated *Entamoeba histolytica* on the human polymorphonuclear respiratory burst. **Arch Med Res**, v. 36, p. 75-9, 2005.

- VENTURA-JUÁREZ, J.; AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; TALAMÁS-ROHANA, P. Subcellular distribution and in situ localization of the acid phosphatase of *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res**, v. 31, p. 183-4, 2000.
- VINES, R. R.; RAMAKRISHNAN, G.; ROGERS, J. B.; LOCKHART, L. A.; MANN, B. J.; PETRI, W. A. JR. Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta2 integrin motif. **Mol Biol Cell**, v. 9 (8), p. 2069-79, 1998.
- VOIGT, H.; OLIVO, J. C.; SANSONETTI, P.; GUILLÉN, N. Myosin IB from *Entamoeba histolytica* is involved in phagocytosis of human erythrocytes. **J Cell Sci**, v. 112 (8), p. 1191-201, 1999.
- VOOGD, C. E. On the mutagenicity of nitroimidazoles. **Mutat Res**, v. 86, p. 243-77, 1981.
- WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 344 (14), p. 1058-66, 2001.
- WANG, J. P.; TSAI, J. J.; CHEN, Y. S.; HSU, M. F. Stimulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation in neutrophils by thiol-oxidizing phenylarsine oxide. **Biochem Pharmacol**, v. 69 (8), p. 1225-34, 2005.
- WHISNANT, A. R.; GILMAN, S. D. Studies of reversible inhibition, irreversible inhibition, and activation of alkaline phosphatase by capillary electrophoresis. **Anal Biochem**, v. 307 (2), p. 226-34, 2002.
- WHITMORE, S. E.; LAMONT, R. J. Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. **Int J Oral Sci**, v. 4 (1), p. 1-6, 2012.
- WHO/PAHO/UNESCO report: a consultation with experts on amoebiasis: Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. **Epidemiol Bull**. v. 18 (1), p. 13-14, 1997.
- WRIGHT, J.M., DUNN, L.A., UPCROFT, P., UPCROFT, J.A. Efficacy of anti-giardial drugs. **Expert Opin Drug Saf**, v. 2, p. 529-41, 2003.
- WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279, 39925-32.
- XIMÉNEZ, C.; CERRITOS, R.; ROJAS, L.; DOLABELLA, S.; MORÁN, P.; SHIBAYAMA, M.; GONZÁLEZ, E.; VALADEZ, A.; HERNÁNDEZ, E.; VALENZUELA, O.; LIMÓN, A.; PARTIDA, O.; SILVA, E. F. Human amebiasis: breaking the paradigm? **Int J Environ Res Public Health**, v. 7 (3), p. 1105-20, 2010.

XIMÉNEZ, C.; MORÁN, P.; ROJAS, L.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. **Infect Genet Evol**, v. 9, p. 1023-32, 2009.

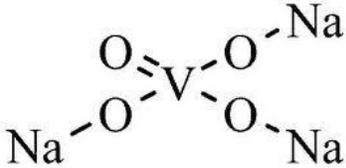
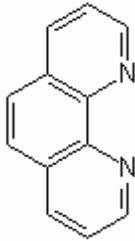
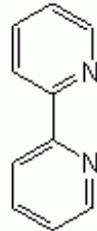
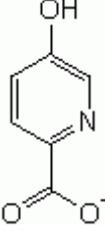
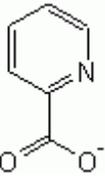
YUMOTO, R.; NISHIKAWA, H.; OKAMOTO, M.; KATAYAMA, H.; NAGAI, J.; TAKANO, M. Clathrin-mediated endocytosis of FITC-albumin in alveolar type II epithelial cell line RLE-6TN. **American Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290 (5), p. 946–55, 2006

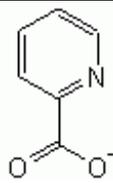
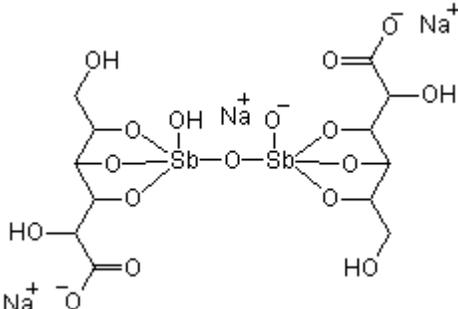
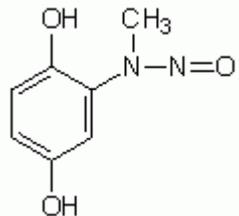
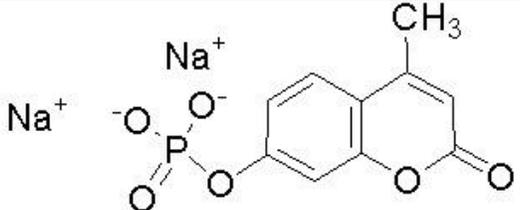
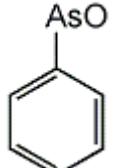
ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 42, p. 209-34, 2002.

ZURITA, M.; ALAGÓN, A.; VARGAS-VILLARREAL, J.; LIZARDI, P. M. The *Entamoeba histolytica* rDNA episome: nuclear localization, DNAase I sensitivity map, and specific DNA-protein interactions. **Mol Microbiol**, v. 5 (8), p. 1843-51, 1991.

## 9. APÊNDICES

**Tabela 6.** Lista dos compostos utilizados neste estudo, com as respectivas fórmulas estruturais.

Compostos	Estrutura Molecular	
Ortovanadato de sódio <sup>1</sup>		
bpV(phen) <sup>2</sup>	 <p data-bbox="1023 892 1421 955">Ligante auxiliar coordenado ao vanádio</p>	
bpV(bipy) <sup>2</sup>	<p data-bbox="600 1176 909 1291"><math>VO(O_2)_2 \cdot K^+</math> Bisperoxovanádio</p>  <p data-bbox="1023 1207 1421 1270">Ligante auxiliar coordenado ao vanádio</p>	
bpV(hopic) <sup>2</sup>	 <p data-bbox="1023 1512 1421 1575">Ligante auxiliar coordenado ao vanádio</p>	
bpV(pic) <sup>2</sup>	 <p data-bbox="1023 1764 1421 1827">Ligante auxiliar coordenado ao vanádio</p>	

$\text{mpV(pic)}^2$	$\text{VO(O}_2\text{)}\cdot\text{K}^+$ Monoperoxovanádio	 Ligante auxiliar coordenado ao vanádio
$\text{DMHV}^3$		
Estibogluconato de sódio <sup>2</sup>		
Defostatina <sup>2</sup>		
4-MUP <sup>4</sup>		
PAO <sup>2</sup>		

<sup>(1)</sup> Fonte: [www.coleparmer.com](http://www.coleparmer.com);

<sup>(2)</sup> Fonte: [www.calbiochem.com](http://www.calbiochem.com);

<sup>(3)</sup> A fórmula estrutural deste composto não se encontrava disponível na internet até o dia 13/06/2013;

<sup>(4)</sup> Fonte: [www.scbt.com](http://www.scbt.com).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexpr](http://www.elsevier.com/locate/yexpr)

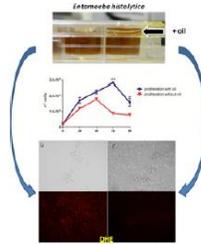
Research Brief

Optimization of *Entamoeba histolytica* culturing *in vitro*G.M. Pires-Santos<sup>a</sup>, K.G. Santana-Anjos<sup>a</sup>, M.A. Vannier-Santos<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup>Lab. Biomorfologia Parasitária, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-BA, Brazil<sup>b</sup>INCT-Instituto Nacional para Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/MCT, Brazil

## HIGHLIGHTS

- ▶ Mineral oil can significantly enhanced *Entamoeba histolytica* proliferation in microplates.
- ▶ Mineral oil covered medium-containing wells produced higher trophozoite numbers kept adherent and motile.
- ▶ Mineral oil addition reduces oxidative stress, down modulating reactive oxidative species production within trophozoites.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 24 May 2011

Received in revised form 15 June 2012

Accepted 21 September 2012

Available online 28 September 2012

## Keywords:

*Entamoeba histolytica*

Trophozoite cultivation

Cell culture

Anaerobiosis

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is among the most deadly parasites accounting for the second highest mortality rate among parasitic diseases. Nevertheless, contrary to trypanosomatids, this protozoan is hardly studied by parasitology groups. This astonishing discrepancy is largely due to the remarkable intricate conditions required for parasite proliferation *in vitro*, particularly whenever large cell numbers are required. The present study was undertaken in order to optimize *E. histolytica* culturing harvest, using mineral oil layers preventing culture medium-air contact to maintain anaerobic conditions in culture plate wells.  $2 \times 10^4$  trophozoites were plated on each well in 2.0 mL YI-S-33 medium, supplemented with bovine serum and 700  $\mu$ L mineral oil. Parasites were daily quantified by light microscopy counting for up to 96 h and trophozoite motility was also assessed. We notice that *E. histolytica* cultures in 24-well plates reached several-fold higher cell densities, particularly whenever the mineral oil layer was placed on top of the medium surface, blocking the air interface.

At least 99% of the parasites were vigorously motile for 72 h in oil-containing wells, whereas only less than 5% displayed significant motility in oil-devoid wells.

In order to determine whether such different growth responses were due at least in part to the oxidative stress, we used the reactive oxidant species fluorescent probe dihydroethidium (DHE).

The remarkably higher DHE parasite labeling in oil-devoid cultures indicate that oxidative stress reduction can play a significant role in elevated growth rates observed in oil supplemented cultures. Propidium iodide and Trypan blue dye-exclusion assays indicate that parasite necrosis resulted from the stressing conditions.

The present study indicates that *E. histolytica* culturing in oil-sealed wells may comprise a valuable tool for bioactivity of antiparasitic compounds.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

\* Corresponding author. Address: Laboratório de Biologia Parasitária, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ-BA, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, Bahia 40295-001, Brazil. Fax: +55 071 31762236.

E-mail addresses: [marcos.vannier@pesquisador.cnpq.br](mailto:marcos.vannier@pesquisador.cnpq.br), [vannier@bahia.fiocruz.br](mailto:vannier@bahia.fiocruz.br) (M.A. Vannier-Santos).

## 1. Introduction

*Entamoeba histolytica* is the protozoan parasite responsible for human amoebiasis which comprises a potentially fatal disease of cosmopolitan distribution, reaching up to 10% of world population,

causing *circa* 100,000 deaths every year (Garcia-Zepeda et al., 2007; Upcroft and Upcroft, 2001; WHO, 2012).

The disease is established with the ingestion of food or water contaminated with parasite cysts and progresses with the proliferation of trophozoites in the large intestine lumen (Pritt and Clack, 2008; Upcroft and Upcroft, 2001). This luminal parasite mostly survive commensally feeding on bacteria, but can eventually injure the large intestine epithelial layer, ulcerate the mucosal tissues and reach other organs such as liver, lungs and even brain (Espinosa-Cantellano and Martínez-Palomo, 2000). There are innumerable unanswered questions on the amoebiasis pathophysiology. Many of them wait to be elucidated because of deficient experimental models. Despite the medical importance of this disease of high lethality and the relevant scientific questions regarding the control of virulence in a protozoan which may shift between an asymptomatic infestation to a deadly infection, *E. histolytica* is seldom approached experimentally. The tricky and burdensome isolation and cultivating procedures have usually hampered attempts to study this parasite.

*E. histolytica* dwell in low oxygen tension conditions, but immune responses and even the protozoan *per se* produce oxygen and nitrogen reactive species (Wang et al., 1994; Tekmani and Mehlotra, 1999) which may be toxic for the parasite, nevertheless little is known about the mechanisms employed to endure oxidative stress during tissue invasion or experimental handling. Therefore, cultivation of this parasite requires microaerophilic conditions, mimicking the human gut environment.

The present study was undertaken in order to standardize the anaerobic/microaerobic *in vitro* conditions adapting the early methodology of oil blocking culture medium surface to optimize *E. histolytica* axenic proliferation in multi-well plates.

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasite cell culture

*E. histolytica* HM1-SS strain was kindly provided by the Dr. Edward Felix Silva and Dr. Maria A. Gomes, Parasitology Department, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and maintained in YI-S-33 medium.

### 2.2. Proliferation assays

*E. histolytica* routine growth was performed in 15 mL test tubes, containing 12 mL YI-S-33 medium supplemented with 20% (v/v) bovine serum, using  $2 \times 10^4$ /mL inoculum. The tube ice-cold-detached cells were centrifuged at 380g, 4 °C, for 10 min, washed in cold PBS, pH 7.2, before counting. Parasite proliferation was assessed by daily light microscopy direct counting on Neubauer chambers for 96 h.

For assays performed in 24-well plates, each well was seeded with  $2 \times 10^4$ /mL *E. histolytica* trophozoites, in 2 mL YI-S-33 medium supplemented with 20% (v/v) bovine serum. Some wells also received a 700  $\mu$ L mineral oil (Nujol®) layer on top of the culture medium surface (Fig. 1). The oil layer was carefully laid on the center of the culture medium surface and whenever necessary the tip was gently used to lay it down regularly. Different mineral oil trademarks were tested, producing the same results (not shown). Living trophozoites were incubated with either 4% trypan blue (TB) or DAPI before counting on an inverted microscope.

Dye exclusion assays were performed with coverslip-adherent parasites, so that detached parasites were removed.

Statistical analysis and data plotting were performed using Graphpad Prism 5.0 employing ANOVA and Tukey as a post-test.

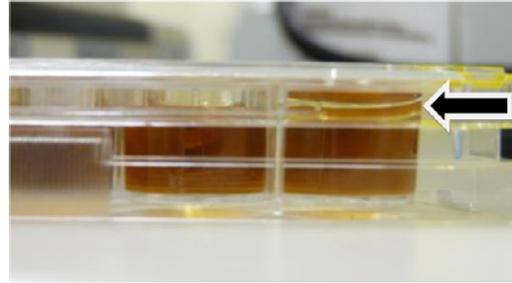


Fig. 1. Side view of a 24-well culture plate displaying wells with (arrow) and without added 700  $\mu$ L mineral oil (Nujol®) layer on top of the 2 mL YI-S-33 culture medium, supplemented with 20% (v/v) bovine serum.

### 2.3. Detection of ROS

In order to detect reactive oxidant species (ROS) we used the probe DHE. Glass coverslip-containing wells were plated with  $2 \times 10^5$  trophozoites/mL with and without mineral oil and cultured for 72 h. Living trophozoites were incubated with 5  $\mu$ M/mL DHE for 10 min and directly observed under an Olympus BX51 fluorescence microscope and all micrographs were made in using the same capture parameters.

## 3. Results

*E. histolytica* proliferation in both tubes and 24-wells plates peaked within 72 h, but the growth in tubes was characterized by a long lag phase, whereas in plates the parasites entered an early log phase, therefore the cell densities achieved were three-fold higher, although the medium volume used was 6 times lower.

We compared the *E. histolytica* proliferation in oil-covered medium within 24-well plates with cultures carried out in anaerobic jars. Interestingly no significant difference was observed but the handling was quicker and easier (particularly microscopical monitoring) in the former. The parasite growth in tissue culture plates displayed similar pattern in the first 48 h, but addition of a mineral oil layer on the top of the culture medium significantly ( $p < 0.0001$ ) enhanced *E. histolytica* trophozoite numbers in 72 and 96 h time-points (Fig. 2). This effect was not achieved by adding the same volume of medium. At 48 h the parasites grown in oil-covered medium displayed about 25% enhanced proliferation, higher motility and substrate adherence than the ones kept in oil-devoid wells. At 72 h, oil-containing *E. histolytica* cultures reached an almost complete confluency, covering most of the well bottom area and kept high motility with constant pseudopod emitting, whereas the oil-devoid wells presented mostly immotile, clustered and/or detached parasites (Fig. 3). At this time point mineral oil-containing cultures presented about 120% more adherent and fully motile trophozoites (Fig. 2).

Cell viability, was assessed by adherence, DAPI and TB dye exclusion. Proliferation in the oil-containing wells was maintained all over the assay and final cell counts were enhanced by *circa* 98% and less than 1% of cells were DAPI- (not shown) or TB-stained (Fig. 4). It is noteworthy that most of the cells cultured without oil were detached and therefore not counted.

We also approached the possible effects of oxidative stress on trophozoite viability. The fluorescent probe DHE was used for ROS detection. We observed that protozoans cultured without mineral oil were remarkably more labeled, indicating intense ROS production (Fig. 5).

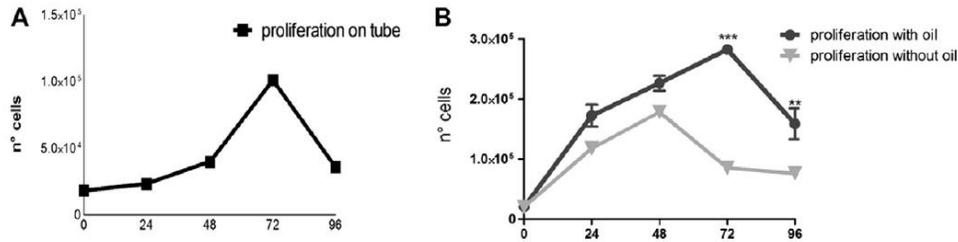


Fig. 2. *Entamoeba histolytica* trophozoite proliferation curves. Parasite growth in test tubes, containing 12 mL YI-S-33 medium seeded with  $2 \times 10^4$  trophozoites/mL (A). For trophozoite culture in plates, each well was seeded with  $2 \times 10^4$  parasite cells/mL inoculums, in 2 mL of the same medium supplemented (●) or not (▼) with 700  $\mu$ L oil (B). Note the significantly enhanced parasite proliferation. The symbols \*\* and \*\*\* indicate  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

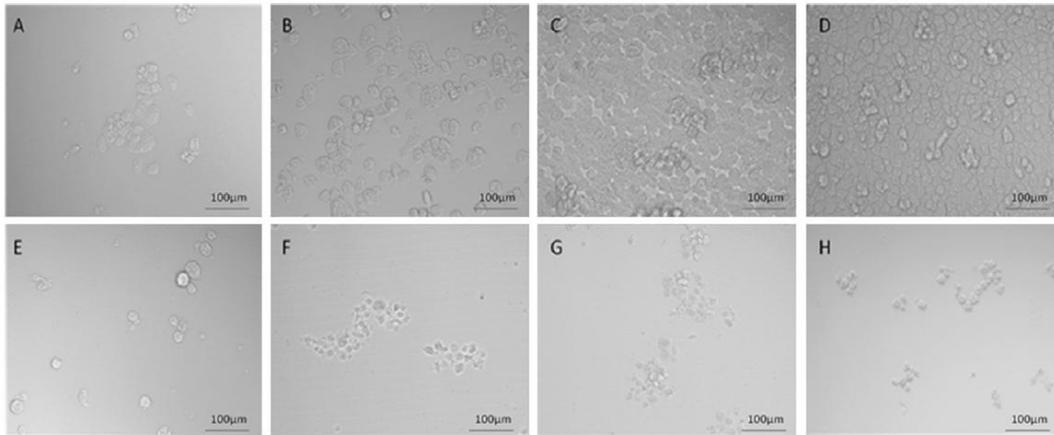


Fig. 3. Interference contrast microscopy of *Entamoeba histolytica* trophozoites in YI-S-33 medium, plus bovine serum, supplemented (A–D) or not (E–H) with mineral oil and cultured for 24 (A, E), 48 (B, F), 72 (C, G) and 96 (D, H) hours. Although often in apparent confluency (C and D), the trophozoites were adherent and highly motile, displaying profuse pseudopod emitting.

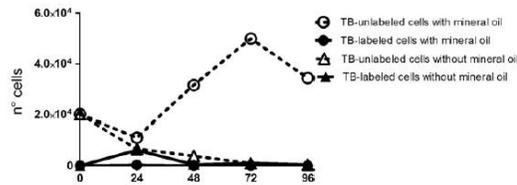


Fig. 4. Proliferation/survival curves of *Entamoeba histolytica* coverslip-adherent trophozoites in well plates with (●, ○) and without (▼, ▽) mineral oil, taken daily for 96 h stained (closed symbols) or not (open symbols) with trypan blue (TB).

#### 4. Discussion

*E. histolytica* is a widespread pathogen associated to high mortality in many parts of the globe (Ravdin, 2000). Nevertheless only a few research teams focus this protozoan experimentally. This unexpected and astonishing observation is largely due to the intricate culturing procedures required for maintaining and proliferation of this cavitary parasite. The present study was undertaken in order to optimize axenic *E. histolytica* *in vitro* culture, employing a simple and inexpensive procedure. We employed mineral oil overlays on the air-medium interface to decrease oxygen tension, so promoting parasite proliferation (Ahn and Burne, 2007). We standardized culture conditions in 24-well plates so that culturing

outcomes may be followed continually with minimal contamination risks. The reduced medium volume and high number of viable trophozoites yielded indicate the technique is suitable for anti-amoebic compound *in vitro* assays. This simple approach may comprise a valuable tool since anaerobic parasites such as trichomonads, *Giardia lamblia* and *Entamoeba* sp. are often cultured in tubes (e.g. Bernardino et al., 2006; Maia et al., 2008; Jesus et al., 2002, 2004; Reis et al., 1999). It is noteworthy that these protozoa are often adherent while viable and parasite attachment maybe modulated by surface charge (Saraiva et al., 1989) and free energy (Silva Filho et al., 1990). In this regard oxidative damage was shown to affect bacterial surface free energy and adhesion (Marciano et al., 2009).

Cell proliferation was enhanced by over four-fold by addition of a mineral oil layer, presumably due to the increased viability, as assessed by DAPI and TB exclusion. It is noteworthy that parasites maintained under such conditions displayed much higher motility, indicating remarkably elevated metabolic rates. It is also interesting to remark that trophozoites grown in oil-devoid medium were largely aggregated, what may hamper some assays and may point out to the oxidative stress effect.

It has not been established why plate-grown trophozoites did not enter a lag phase but the bacterial lag growth phase is associated with oxidative stress resistance (Rolfe et al., 2012; Lei et al., 2011; Altincicek et al., 2011; Pin et al., 2009; Zheng et al., 2011).

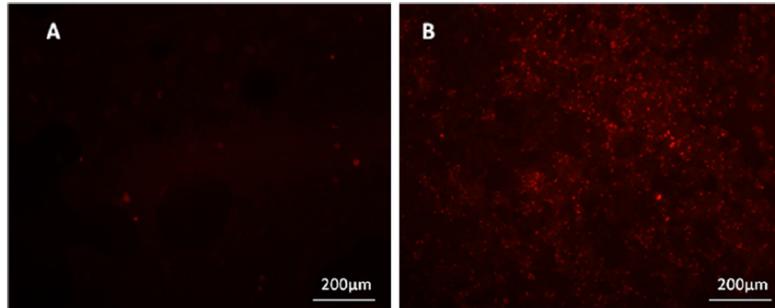


Fig. 5. Fluorescence microscopy for ROS detection in of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Parasites were cultured for 72 h in plate wells with (A) and without (B) mineral oil, before incubation with 5  $\mu$ M of DHE probe for 10 min. Oil addition clearly reduced probe labeling of trophozoites.

Cell aggregation may comprise an escape mechanism employed by microbial organisms including bacteria/mycobacteria (Wu et al., 1999; Carvalho et al., 2004; Klebensberger et al., 2006; Klebensberger et al., 2007; Bible et al., 2008) fungi (Giacometti et al., 2011) and slime mold myxomycetes (Maniak and Nellen, 1988). Stress also leads to human leukocyte aggregation (Arber et al., 1991; Berliner and Aronson, 1991; Schapiro et al., 1995) and disrupted cells may form aggregates (Dewitz et al., 1977).

Cell aggregation can also be brought by oxidative stress conditions upon prokaryotic and mammalian cells (Baskurt et al., 1998; Ben-Hur et al., 1997; Calejo et al., 2010) and may protect cells from oxidative damage (Schwochau et al., 1998; Schembri et al., 2003; Nachin et al., 2005; Tree et al., 2007). Thus it seems reasonable to infer that the trophozoite aggregation and even the culturing lag phase reported here are related to the oxidative damage of parasites in oil-devoid cultures. This inference is supported by the high frequency of DHE-labeled parasites in such conditions.

Taken together these data indicate that this method allows high *E. histolytica* yields, using small culture medium volumes in a safe reliable and uncomplicated procedure, quite suitable for antiparasitic compound assays.

#### Acknowledgments

Sponsored by Grants from: FAPESB, CNPq, PRONEX/MCT, PP-SUS, CAPES and INCT-INPeTam/CNPq/MCT. MAVS is a CNPq research fellow.

#### References

- Ahn, S.J., Burne, R.A., 2007. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtIA autolysin of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 189, 6293–6302.
- Altincicek, B., Ter Braak, B., Loughton, A.M., Udekwu, K.I., Gerardo, N.M., 2011. *Escherichia coli* K-12 pathogenicity in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, reveals reduced antibacterial defense in aphids. *Developmental & Comparative Immunology* 35, 1091–1097.
- Arber, N., Berliner, S., Rotenberg, Z., Friedman, J., Belagodatni, E., Ostfeld, I., Aronson, M., Pinkhas, J., 1991. Detection of aggregated leukocytes in the circulating pool during stress-demargination is not necessarily a result of decreased leukocyte adhesiveness. *Acta Haematologica* 86, 20–24.
- Baskurt, O.K., Temiz, A., Meiselman, H.J., 1998. Effect of superoxide anions on red blood cell rheologic properties. *Free Radical Biology & Medicine* 24, 102–110.
- Ben-Hur, E., Barshtein, G., Chen, S., Yedgar, S., 1997. Photodynamic treatment of red blood cell concentrates for virus inactivation enhances red blood cell aggregation: protection with antioxidants. *Photochemistry and Photobiology* 66, 509–512.
- Berliner, S., Aronson, M., 1991. The phenomenon of leukergy (leukocyte adhesiveness/aggregation): a powerful investigative tool and a sensitive indicator of inflammation, trauma and stress. *Israel Journal of Medical Sciences* 27, 164–172.
- Bernardino, A.M., Da Silva Pinheiro, L.C., Rodrigues, C.R., Loureiro, N.I., Castro, H.C., Lanfredi-Rangel, A., Sabatini-Lopes, J., Borges, J.C., Carvalho, J.M., Romero, G.A., Ferreira, V.F., Frugulhetti, L.C., Vannier-Santos, M.A., 2006. Design, synthesis, SAR, and biological evaluation of new 4-(phenylamino)thieno[2,3-b]pyridine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 5765–5770.
- Bible, A.N., Stephens, B.B., Ortega, D.R., Xie, Z., Alexandre, G., 2008. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping, and cell length in the alphaproteobacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 190, 6365–6375.
- Calejo, A.I., Rodriguez, E., Silva, V.S., Jorgacevski, J., Stenovec, M., Kreft, M., Santos, C., Zorec, R., Gonçalves, P.P., 2010. Life and death in aluminium-exposed cultures of rat lactotrophs studied by flow cytometry. *Cell Biology and Toxicology* 26, 341–353.
- Carvalho, C.C., Da Cruz, A.A., Pons, M.N., Pinheiro, H.M., Cabral, J.M., Da Fonseca, M.M., Ferreira, B.S., Fernandes, P., 2004. *Mycobacterium* sp., *Rhodococcus erythropolis*, and *Pseudomonas putida* behavior in the presence of organic solvents. *Microscopy Research and Technique* 64, 215–222.
- Dewitz, T.S., Hung, T.C., Martin, R.R., McIntire, L.V., 1977. Mechanical trauma in leukocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 90, 728–736.
- Espinosa-Cantellano, M., Martínez-Palomo, A., 2000. Pathogenesis of intestinal amoebiasis: from molecules to disease. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 318–331.
- García-Zepeda, E.A., Rojas-López, A., Esquivel-Velázquez, M., Ostoa-Saloma, P., 2007. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunology* 29, 679–684.
- Giacometti, R., Kronberg, F., Biondi, R.M., Passeron, S., 2011. *Candida albicans* Tpk1p and Tpk2p isoforms differentially regulate pseudohyphal development, biofilm structure, cell aggregation and adhesin expression. *Yeast* 28, 293–308.
- Jesus, J.B., Podlyska, T.M., Hampshire, A., Lopes, C.S., Vannier-Santos, M.A., Meyer-Fernandes, J.R., 2002. Characterization of an ecto-phosphatase activity in the human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Research* 88, 991–997.
- Jesus, J.B., Vannier-Santos, M.A., Britto, C., Godefroy, P., Silva-Filho, F.C., Pinheiro, A.A., Rocha-Azevedo, B., Lopes, A.H., Meyer-Fernandes, J.R., 2004. *Trichomonas vaginalis* virulence against epithelial cells and morphological variability: the comparison between a well-established strain and a fresh isolate. *Parasitology Research* 93, 369–377.
- Klebensberger, J., Rui, O., Fritz, E., Schink, B., Philipp, B., 2006. Cell aggregation of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 as an energy-dependent stress response during growth with sodium dodecyl sulfate. *Archives of Microbiology* 185, 417–427.
- Klebensberger, J., Lautenschlager, K., Bressler, D., Wingender, J., Philipp, B., 2007. Detergent-induced cell aggregation in subpopulations of *Pseudomonas aeruginosa* as a preadaptive survival strategy. *Environmental Microbiology* 9, 2247–2259.
- Lei, Y., Zhang, Y., Guenther, B.D., Kreth, J., Herzberg, M.C., 2011. Mechanism of adhesion maintenance by methionine sulphoxide reductase in *Streptococcus gordonii*. *Molecular Microbiology* 80, 726–738.
- Maia, C., Lanfredi-Rangel, A., Santana-Anjos, K.G., Oliveira, M.F., De Souza, W., Vannier-Santos, M.A., 2008. Effects of a putrescine analog on *Giardia lamblia*. *Parasitology Research* 103, 363–370.
- Maniak, M., Nellen, W., 1988. A developmentally regulated membrane protein gene in *Dictyostelium discoideum* is also induced by heat shock and cold shock. *Molecular Cell Biology* 8, 153–159.
- Marciano, F.R., Lima-Oliveira, D.A., Da-Silva, N.S., Diniz, A.V., Corat, E.J., Trava-Airoldi, V.J., 2009. Antibacterial activity of DLC films containing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Journal of Colloid Interface Science* 340, 87–92.
- Nachin, L., Nannmark, U., Nyström, M.T., 2005. Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *Journal of Bacteriology* 187, 6265–6272.
- Pin, C., Rolfe, M.D., Muñoz-Cuevas, M., Hinton, J.C., Peck, M.W., Walton, N.J., Baranyi, J., 2009. Network analysis of the transcriptional pattern of young and old cells of *Escherichia coli* during lag phase. *BMC Systems Biology* 3, 108.
- Pritt, B.S., Clack, C.G., 2008. Amebiasis. *Mayo Clinic Proceedings* 83, 1154–1159.
- Ravdin, J. (Ed.), 2000. Amebiasis. Series on Tropical Medicine: Science and Practice. Imperial College Press.

- Reis, I.A., Martinez, M.P., Yarlett, N., Johnson, P.J., Silva-Filho, F.C., Vannier-Santos, M.A., 1999. Inhibition of polyamine synthesis arrests trichomonad growth and induces destruction of hydrogenosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 1919–1923.
- Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., Hinton, J.C., 2012. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *Journal of Bacteriology* 194, 686–701.
- Saraiva, E.M., Vannier-Santos, M.A., Silva-Filho, F.C., de Souza, W., 1989. Anionic site behavior in *Leishmania* and its role in the parasite-macrophage interaction. *Journal of Cell Science* 93, 481–489.
- Schapiro, J.M., Arber, L., Lev, D., Weksler, D., Liberman, E., Winder, A., Berliner, S., Arber, N., 1995. Increase in leukocyte adhesiveness and aggregation with stress: a model of human congestive heart failure. *Mount Sinai Journal of Medicine* 62, 298–301.
- Schembri, M.A., Hjerrild, L., Gjermansen, M., Klemm, P., 2003. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *Journal of Bacteriology* 185, 2236–2242.
- Schwochau, G.B., Nath, K.A., Rosenberg, M.E., 1998. Clusterin protects against oxidative stress *in vitro* through aggregative and nonaggregative properties. *Kidney International* 53, 1647–1653.
- Silva Filho, F.C., Saraiva, E.M., Santos, M.A., de Souza, W., 1990. The surface free energy of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Cell Biophysics* 17, 137–151.
- Tekmani, B.L., Mehlotra, R.K., 1999. Molecular basis of defense against oxidative stress in *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection* 1, 385–394.
- Tree, J.J., Ulett, G.C., Hobman, J.L., Constantinidou, C., Brown, N.L., Kershaw, C., Schembri, M.A., Jennings, M.P., Mcewan, A.G., 2007. The multicopper oxidase (CueO) and cell aggregation in *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology* 9, 2110–2116.
- Upcroft, P., Upcroft, J.A., 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 150–164.
- WHO (World Health Organization), 2012. Initiative for Vaccine Research (IVR) Parasitic Diseases: Amoebiasis. <[http://www.who.int/vaccine\\_research/diseases/soa\\_parasitic/en/index1.html](http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index1.html)>.
- Wang, W., Keller, K., Chadee, K., 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunology* 83, 601–610.
- Wu, K., An, F.Y., Clewell, D.B., 1999. *Enterococcus faecalis* pheromone-responding plasmid pAD1 gives rise to an aggregation (clumping) response when cells are exposed to subinhibitory concentrations of chloramphenicol, erythromycin, or tetracycline. *Plasmid* 41, 82–88.
- Zheng, W.J., Hu, Y.H., Sun, L., 2011. The two Dps of *Edwardsiella tarda* are involved in resistance against oxidative stress and host infection. *Fish and Shellfish Immunology* 31, 985–992.

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_,  
 nacionalidade \_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, estado civil \_\_\_\_\_, profissão  
 \_\_\_\_\_,  
 endereço \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_, estou sendo convidado a participar de um estudo denominado **MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO NA INTERFACE *Entamoeba histolytica* - CÉLULA DO HOSPEDEIRO**, cujo objetivo é estudar os mecanismos de ação que possam constituir alvo para terapias alternativas no tratamento da amebíase através da interação parasito-célula do hospedeiro.

A minha participação no referido estudo será através da doação de sangue. Os procedimentos para coleta consistem no posicionamento do braço em uma linha reta do ombro ao punho, de maneira que as veias fiquem mais acessíveis. Após, uma tira de borracha (garrote) será colocada para facilitar a localização das veias e o local escolhido para punção (furar uma veia com agulha para retirar uma amostra de sangue) será higienizado com álcool 70%. Em seguida, uma agulha será introduzida e, em seguida conectada a um tubo de coleta. Quando o sangue estiver fluindo para dentro do tubo, o garrote será retirado. Completado os 25 mL de sangue, a agulha será retirada e o local será novamente higienizado com álcool 70% e uma fita curativa será colocada, pressionando o local para que o sangue seja estancado. Todo o material utilizado será estéril e descartável. Todos os esclarecimentos necessários sobre as possíveis dores e desconfortos gerados pela coleta foram dados.

A amostra de sangue será utilizada para o isolamento de neutrófilos e eritrócitos. Um dos benefícios da pesquisa será a promoção do desenvolvimento das ciências, com possíveis aplicações na terapia contra a amebíase. O material coletado será de uso exclusivo para a finalidade prevista no protocolo de pesquisa.

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo.

Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e se desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo.

Os integrantes do referido projeto são o pesquisador Marcos André Vannier dos Santos e a doutoranda Karla Graziela Santana dos Anjos, da Fundação Oswaldo Cruz e com eles poderei manter contato pelos telefones (71) 3176-2236 e 3176-2208.

Durante toda pesquisa, me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Salvador, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Nome e assinatura do sujeito da pesquisa

---

Dr. Marcos André Vannier dos Santos  
Pesquisador Responsável

## 10. ANEXOS

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 75 (2013) 160–164



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/diagmicrobio](http://www.elsevier.com/locate/diagmicrobio)Effects of metronidazole analogues on *Giardia lamblia*: experimental infection and cell organization<sup>☆</sup>Haendel G.N.O. Busatti<sup>a,b,c</sup>, Ricardo J. Alves<sup>b</sup>, Karla G. Santana-Anjos<sup>d</sup>, Frederico F. Gil<sup>a</sup>, Marcia C. Cury<sup>e</sup>, Marcos A. Vannier-Santos<sup>d</sup>, Maria A. Gomes<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Depto. Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil<sup>b</sup> Depto. Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, CP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil<sup>c</sup> Depto. Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade de Itaúna, Brazil<sup>d</sup> Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, INPeTAm INCT, Salvador, Bahia, Brazil<sup>e</sup> Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 June 2012

Received in revised form 29 October 2012

Accepted 3 November 2012

## Keywords:

Giardicidal activity  
Metronidazole analogues  
Parasite load  
Electron microscopy

## ABSTRACT

The chemotherapeutic agents used for the treatment of giardiasis are often associated with adverse side effects and are refractory cases, due to the development of resistant parasites. Therefore the search for new drugs is required. We have previously reported the giardicidal effects of metronidazole (MTZ) and its analogues (MTZ-Ms, MTZ-Br, MTZ-N<sub>3</sub>, and MTZ-I) on the trophozoites of *Giardia lamblia*. Now we evaluated the activity of some giardicidal MTZ analogues in experimental infections in gerbils and its effects on the morphology and ultrastructural organization of *Giardia*. The giardicidal activity in experimental infections showed ED<sub>50</sub> values significantly lower for MTZ-I and MTZ-Br when compared to MTZ. Transmission electron microscopy was employed to approach the mechanism(s) of action of MTZ analogues upon the protozoan. MTZ analogues were more active than MTZ in changing significantly the morphology and ultrastructure of the parasite. The analogues affected parasite cell vesicle trafficking, autophagy, and triggered differentiation into cysts. These results coupled with the excellent giardicidal activity and lower toxicity demonstrate that these nitroimidazole derivatives may be important therapeutic alternatives for combating giardiasis. In addition, our results suggest a therapeutic advantage in obtaining synthetic metronidazole analogues for screening of activities against other infectious agents.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Giardia lamblia* is a parasitic protozoan that colonizes the human intestinal tract causing a wide clinical spectrum disorder called giardiasis. The disease is a zoonosis which is considered an important public health problem in many countries worldwide. It infects about 200 million people in Asia, Africa, and Latin America (Yason and Rivera, 2007). *G. lamblia* is a major cause of diarrhea among children and travelers (Buret, 2008).

Infected individuals may be asymptomatic or present dehydration-causing diarrhea and abdominal discomfort. Giardiasis can produce chronic diarrhea, lasting for several months, which may result in malabsorption and weight loss, contributing to the increased mortality of individuals who are malnourished or immune deficient in the first 3 years of life (Buret et al., 2002; Ankarklev et al., 2010; Wensaas et al., 2010; Cotton et al., 2011). Both host and parasite factors contribute to the

pathogenesis of giardiasis. Malabsorption, maldigestion, chloride hypersecretion, and increased rates of small intestinal transit are the main factors involved in the onset of diarrhea (Buret, 2008; Cotton et al., 2011).

Therefore *G. lamblia* has been implicated in the disturbance of physical (Farthing et al., 1986; Simsek et al., 2004) and cognitive (Thompson et al., 1993) development among children. It is estimated that the incidence of giardiasis in the world reached 1 billion cases, constituting one of the most common protozoan infection (Wright et al., 2003). Nevertheless, it is a neglected disease. A variety of chemotherapeutic agents have been used in the treatment of giardiasis. However, most of the drugs used display significant side effects and are contraindicated in some cases. Moreover, *Giardia* is able to develop resistance to these agents (Wright et al., 2003; Müller et al., 2000). Giardiasis was included in the 'Neglected Diseases Initiative' (Savioli et al., 2006) highlighting the need for new effective nontoxic giardicidal drugs.

The introduction of nitroheterocyclic drugs, in the 1950s, represented a new era in the treatment of bacterial and protozoan infections. Metronidazole (1-β-hydroxyethyl-2-methyl-5-nitroimidazole) is currently the most widely used drug for the treatment of infections caused by *G. lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, and *Blastocystis* spp. (Upcroft and Upcroft, 2001; Busatti et al., 2009; Leitsch

<sup>☆</sup> This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas-FAPEMIG (grant number APQ 01766-10), FAPESB, PP-SUS, CNPq, and FIOCRUZ.

\* Corresponding author. Tel.: +55 31 3409 2846; fax: +55 31 3409 2970.

E-mail address: [magomes@icb.ufmg.br](mailto:magomes@icb.ufmg.br) (M.A. Gomes).

et al., 2011; Mirza et al., 2011). Cases of recurrent symptoms and resistance have been documented in all these parasites (Upcroft et al., 2006; Bansal et al., 2006; Tejman-Yarden et al., 2011), encouraging the advancement of research on alternative drugs against these parasites.

Metronidazole (MTZ) analogues have been developed and tested against different microorganisms, and some of them have proved effective against *Giardia*, *Trichomonas*, and *Entamoeba histolytica* (Upcroft et al., 2006; Barbosa et al., 2006; Busatti et al., 2007).

Previously, we reported the activity of MTZ analogues against *G. lamblia* (Busatti et al., 2007). Here we evaluated the giardicidal activity of some MTZ analogues in experimentally infected gerbils and employed an ultrastructural analysis as an instrumental tool to clarify the mechanisms of action of these potential drugs upon the parasite.

## 2. Material and methods

### 2.1. Synthesis of MTZ analogues

MTZ analogues were obtained by reactions as described previously (Busatti et al., 2007). The purity of these compounds was evaluated by thin layer chromatography on silica gel plates. The structures were confirmed by spectral data analysis (RMN <sup>1</sup>H and RMN <sup>13</sup>C). The dose–response curves were obtained by associating axenic cultures of *Giardia* with increasing concentrations of MTZ, MTZMs, MTZN<sub>3</sub>, MTZ-Br, and MTZI, ranging from 0.08 to 30 μmol/L.

### 2.2. Cultures and growth conditions

*G. lamblia* Portland strain (ATCC 30888) was used in all experiments. It was kept axenically at 37 °C in Diamond's modified TYI-S-33 medium (Keister, 1983) supplemented with heat-inactivated bovine serum at 10%. To quantify the drug's action,  $1.5 \times 10^5$  trophozoites of *Giardia* were grown in culture plates of 24 wells (Nunc, Berkeley, CA, USA) in CO<sub>2</sub> atmosphere at 37 °C for 48 h.

### 2.3. Antigiardial activity in vivo

Giardicidal activity, in vivo, of MTZ analogues was assessed by determining the parasitic load of trophozoites as previously described (Belosevic et al., 1983; Araújo et al., 2008) with some modifications. The activity of MTZ analogues on *Giardia* trophozoites was evaluated in vivo using gerbils (*Meriones unguiculatus*) as an experimental model. The experiments were performed in compliance with the guidelines of the Institutional Animal Care and Committee on Ethics of Animal Experimentation (Comitê de Ética em Experimentação Animal–CETEA, national guidelines Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008) of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; protocol number 181/2008, approved on 03/04/2009). Animals aged 4–8 weeks of both sexes were used. They were divided into groups of 6 animals for each compound: a negative control group (in the absence of nitroimidazoles), a group that received the vehicle (phosphate buffered saline [PBS, pH 7.2], containing dimethyl sulfoxide [DMSO, 0.05%]); a positive control group (in the presence of metronidazole); and 5 test groups, where animals infected with *G. lamblia* were treated with 0.1 to 6.0 μmol/kg of MTZ and its analogues, MTZ-I and MTZ-Br.

For the inhibition assay,  $1 \times 10^6$  *G. lamblia* trophozoites in 1 mL of PBS were inoculated in gerbils by gavage. Six days after inoculation, the animals were treated intragastrically with 1 mL of the nitroimidazoles, dissolved in PBS containing 0.05% DMSO. Two days after the treatment with drugs (8 days after inoculation), the animals were sacrificed and 18 cm of the small intestine of each animal was removed, opened longitudinally, and placed in glass tubes containing 10 mL of cold PBS for 20 min. ED<sub>50</sub>, which is the dose leading to 50% parasite growth inhibition, compared to growth in the control, was determined for each compound.

### 2.4. Transmission electron microscopy

Parasites were fixed in 4% paraformaldehyde (Polysciences, Warrington, PA, USA), 2.5% glutaraldehyde (Polysciences), 4% sucrose in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for at least 1 h, post-fixed in 1% osmium tetroxide (Polysciences) and 0.8% potassium ferricyanide in the same buffer for 40 min, dehydrated in acetone series, and embedded in Polybed resin (Polysciences). Thin sections were stained with 2% uranyl acetate for 20 min and with 1% lead citrate for 5 min and observed under a Zeiss 900 transmission electron microscope (Carl-Zeiss, Oberkochen, Germany).

The morphometric analysis of peripheral vesicles of trophozoites was performed before and after MTZ-I treatments. The area determination was made based on the limits of these organelles, using the software SIS ITEM (SIS ITEM, Palatka, FL, USA). Three vesicles per cell were selected randomly on at least 20 cells observed on ultrathin sections. The data plotted in GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) are represented as the mean ± SEM and were analyzed by Student's *t* test with a significance level of *P* < 0.05.

### 2.5. Statistical analysis

Each experiment was done at least 3 times in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was used to analyze differences between IC<sub>50</sub> (dose required for 50% growth inhibition in vitro) and ED<sub>50</sub> (dose required to inhibit 50% of organisms growth in vivo) values. *P* values below 0.05 were considered statistically significant.

## 3. Results

### 3.1. Antigiardial activity

The IC<sub>50</sub> of MTZ-Ms (0.69 ± 0.05), MTZ-N3 (0.70 ± 0.16), MTZ-I (0.40 ± 0.03), and MTZ-Br (0.28 ± 0.04) tested presented higher giardicidal activity when compared with MTZ (1.96 ± 0.13). MTZ-Br and MTZ-I were the most active (*P* < 0.001), so they were chosen to determine the anti-giardial activity in vivo.

Both the MTZ analogues MTZ-I and MTZ-Br were able to significantly (*P* < 0.001) reduce the *G. lamblia* parasite load in infected gerbils. MTZ-Br and MTZ-I had greater giardicidal activity, with ED<sub>50</sub> values significantly lower than the MTZ (Table 1).

### 3.2. Transmission electron microscopy

Ultrastructural analysis of untreated control *G. lamblia* trophozoite fixed after 48 h of incubation in the presence of 0.05% DMSO did not induce alterations in the ultrastructure of the protozoan (Fig. 1A), indicating that this solvent concentration was nontoxic.

Trophozoites incubated with MTZ showed evident ultrastructural disorganization (Fig. 1B) characterized by the centripetal displacement of the peripheral vesicles and internalization of the cytoskeletal components of the flagella and adhesive disk into the cytoplasmic matrix.

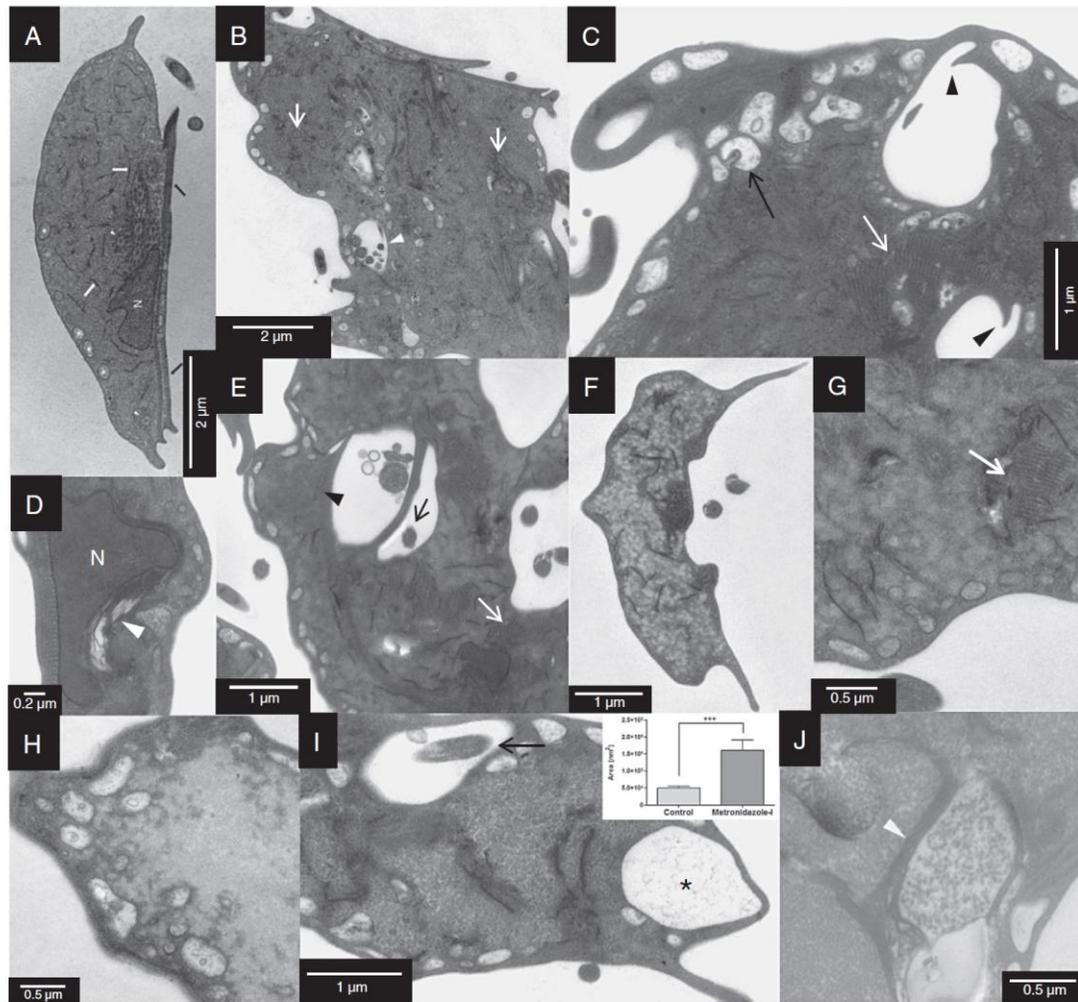
**Table 1**  
Activity in vivo of MTZ analogues against *G. lamblia* in gerbils.<sup>a</sup>

Compound	ED <sub>50</sub> (μmol/kg) <sup>b</sup>
MTZ <sup>c</sup>	0.74 (0.78–0.72)
MTZ-Br	0.51 (0.53–0.49)
MTZ-I	0.38 (0.42–0.34)

<sup>a</sup> Results are expressed as mean (*n* = 6).

<sup>b</sup> Dose required to inhibit 50% of organism growth with 95% confidence limits.

<sup>c</sup> Positive control.



**Fig. 1.** (A) Cross section of *Giardia lamblia* trophozoite incubated with 0.05% DMSO showing characteristic ultrastructure, with the presence of peripheral vesicles (\*), endoplasmic reticulum cisternae (white arrows), nucleus (N), adhesive disk (black arrows), and axonemes of the flagella (arrowheads) within the homogeneously electron-dense cytoplasm. (B) *G. lamblia* trophozoites incubated with 0.85  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole for 48 h, with ultrastructural disorganization, centripetal displacement of peripheral vesicles (\*), and flagellar internalization (arrowhead) as well as numerous cytoplasmic axonemes (arrows). (C) Trophozoites incubated for 48 h in the presence of 0.51  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole-N3 displaying peripheral vesicle dilatation and interdigitation (black arrow), as well as concave regions of adhesion disk engulfment areas (arrowheads) and disassembly of its cytoskeleton components (white arrow). (D) Trophozoites incubated for 48 h in the presence of 0.51  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole-N3 displaying the formation of extensive concentric arrays of endoplasmic reticulum cisternae (arrowhead) circumscribing the nuclei (N). (E) Cells incubated for 48 h in the presence of 0.48  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole-MS showed marked disorganization of the cellular architecture of trophozoites and internalization of the flagella (black arrow), adhesive disk (arrowhead), and its components' disassembly (white arrow). (F) We also observed a lower cytoplasmic electron density and the absence of glycogen granules. (G) and (H) *G. lamblia* trophozoites treated with 0.32  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole-Br for 48 h. We observed internalization and disgregation of adhesive disk cytoskeleton components (G, arrow), heterogeneous cytoplasmic granularity, and electron density properties as many parasites displayed remarkable cytoplasmic extraction (H), resulting in altered cell architecture. (I) and (J) *G. lamblia* trophozoites treated with 0.26  $\mu\text{mol/L}$  of metronidazole-I displayed remarkably swollen vesicles (I, \*), which may be involved in the internalization of the flagella (arrow). Morphometry of the peripheral vesicles revealed that the average area in the 0.26  $\mu\text{mol/L}$  metronidazole-I-treated images was significantly (\*\*\*) enhanced (I, inset). Several cells presented autophagic process (J), characterized by concentric membranes (arrowhead) surrounding the cytoplasmic material presumably in degradation.

Parasites incubated with MTZ-N<sub>3</sub> displayed large areas of adhesive disk internalization and peripheral vesicle interdigitation (Fig. 1C). Several cells presented multilayered membranes stacked in the perinuclear area (Fig. 1D).

Altered parasite cell architecture and adhesive disk internalization were also found in trophozoites incubated with MTZ-MS (Fig. 1E). Lower cytoplasmic electron density and absence of

glycogen granules were also observed (Fig. 1F). Heterogeneous cytoplasmic granularity and electron density properties were observed in *Giardia* trophozoites treated with 0.32  $\mu\text{mol/L}$  metronidazole-Br for 48 h (Fig. 1G), as well as internalization of adhesive disk cytoskeleton components (arrowhead). Many parasites displayed remarkable cytoplasmic extraction (Fig. 1H), resulting in altered cell architecture.

Parasites grown in the presence of MTZ-I presented remarkably large vesicles, which may be involved in the internalization of the flagella (Fig. 11). Morphometric analysis of 0.26  $\mu\text{mol/L}$  of MTZ-I-treated parasites revealed 3-fold ( $P < 0.001$ ) enlargement of sectioned peripheral vesicle areas as compared to controls (Fig. 1, insert). Autophagic vacuole formation surrounding the cytoplasmic material presumably in degradation was also observed (Fig. 1J).

#### 4. Discussion

Despite its significant morbidity causing considerable socio-economic impact, especially in underdeveloped countries, giardiasis is largely overlooked.

Besides sanitation, disease control could be accomplished by vaccination (Olson et al., 2000) and with new drugs to avoid the resistance phenomenon (Argüello-García et al., 2009; Leitsch et al., 2011). MTZ analogues are efficient giardicidal compounds and could become an alternative for the treatment of giardiasis (Upcroft et al., 2006; Busatti et al., 2007). Thus, we evaluated the giardicidal activity of some MTZ analogues in experimentally infected gerbils and its effects on the morphology and ultrastructural organization of *Giardia*.

All analogues tested displayed higher anti-*Giardia* activity than the MTZ. The analogues were able to significantly reduce the parasite load of gerbils infected with *G. lamblia*. In an electrochemical study, these analogues showed greater reduction potential for MTZ-Br followed by MTZ-I and MTZ (Cavalcanti et al., 2004). These results highlight the reduction potential as a chemical giardicidal property relevant to the activity of these compounds. Reduction leads to the formation of toxic nitro radicals, which are responsible for the destabilization of DNA and the production of other toxic radicals that react with essential cellular components, interfering with cellular metabolism (Edwards, 1993; Leitsch et al., 2011).

The transmission electron microscopy revealed that trophozoites of *G. lamblia* treated with MTZ and its analogues showed a marked change in cellular architecture with evident ultrastructural disorganization. Trophozoites treated with the analogues showed changes similar to those observed in parasites treated with MTZ, such as centripetal displacement of the peripheral vesicles, internalization of the flagella and cytoskeletal components of the adhesive disk, vacuolization, and dilation and extraction of peripheral cytoplasmic vesicles, indicating that the mechanisms of action of these compounds caused similar metabolic changes in the parasite.

Antiparasitic drugs may affect the protozoa endocytic (Bernardes et al., 2000) and/or autophagic pathways (Vannier-Santos et al., 1999; Vannier-Santos and de Castro, 2009). The formation of concentric membranes and myelin figures is indicative of autophagic processes; these changes were particularly observed in trophozoites treated with MTZ-I analogues. The engulfment of digit-form processes between adjacent peripheral vesicles might characterize microautophagy triggering as vacuolar tubular invaginations may be involved in autophagy (Müller et al., 2007). Interestingly, the *Giardia* lysosomal functions may be performed by endoplasmic reticulum-like tubulo-vesicular compartments (Abodeely et al., 2009). The formation of such concentric cisternae in the perinuclear area may be related to the endoplasmic reticulum nature of the nuclear envelop. In this regard, it is noteworthy that herpes simplex virus 1-induced autophagy may be associated with the formation of concentric cisternae from the macrophage nuclear envelope (English et al., 2009). The internalization of the flagella and adhesion disk components is presumably associated with parasite encystment due to the drug-induced stress (Maia et al., 2008).

In previous studies, we observed that the analogues of MTZ were not cytotoxic in vitro to human cells in a concentration range from 0.2 to 6.4  $\mu\text{mol/L}$  (Busatti et al., 2007). These results coupled with the excellent giardicidal activity in vivo and in vitro demonstrate that these nitroimidazole derivatives may be important therapeutic alter-

natives to combat giardiasis. Furthermore, the present results suggest a therapeutic advantage with obtaining synthetic analogues of MTZ for screening of activities against other infectious agents.

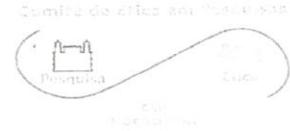
#### References

- Abodeely M, DuBois KN, Hehl A, Stefanic S, Sajid M, et al. A contiguous compartment functions as endoplasmic reticulum and endosome/lysosome in *Giardia lamblia*. Eukaryot Cell 2009;8:1665–76.
- Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. Nat Rev Microbiol 2010;8: 413–22.
- Araújo NS, Mundim MJ, Gomes MA, Amorim RM, Viana JC, et al. *Giardia duodenalis*: pathological alterations in gerbils, *Meriones unguiculatus*, infected with different dosages of trophozoites. Exp Parasitol 2008;118:449–57.
- Argüello-García R, Cruz-Soto M, Romero-Montoya L, Ortega-Pierres G. In vitro resistance to 5-nitroimidazoles and benzimidazoles in *Giardia duodenalis*: variability and variation in gene expression. Infect Genet Evol 2009;9:1057–64.
- Bansal D, Sehgal R, Chawla Y, Malla N, Mahajan RC. Multidrug resistance in amoebiasis patients. Indian J Med Res 2006;124:189–94.
- Barbosa E, Calzada F, Campos R. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus corifolius* Focke in suckling mice CD-1. J Ethnopharmacol 2006;108:395–7.
- Belosevic M, Faubert GM, Maclean JD, Law C. *Giardia lamblia* infections in Mongolian gerbils: an animal model. J Infect Dis 1983;147:222–6.
- Bernardes CF, Meyer-Fernandes JR, Saad-Nehme J, Vannier-Santos MA, Peres-Sampaio CE, et al. Effects of 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid on *Trypanosoma cruzi* proliferation and Ca(2+) homeostasis. Int J Biochem Cell Biol 2000;32:519–27.
- Buret AG. Pathophysiology of enteric infections with *Giardia duodenalis*. Parasite 2008;15:261–5.
- Buret AG, Mitchell K, Muench DG, Scott KG. *Giardia lamblia* disrupts tight junctional ZO-1 and increases permeability in non-transformed human small intestinal epithelial monolayers: effects of epidermal growth factor. Parasitol 2002;125:11–9.
- Busatti HGNO, Santos JFG, Gomes MA. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: Where are we? Biologics: Targets and Therapy 2009;3: 273–87.
- Busatti HGNO, Vieira AE, Viana JC, Silva HE, Souza-Fagundes EM, Martins-Filho O, et al. Effect of metronidazole analogues on *Giardia lamblia* cultures. Parasitol Res 2007;102:145–9.
- Cavalcanti JCM, Abreu FC, Oliveira NV, Moura MABF, Chaves JG, Alves RJ. Effect of the leaving group on the electrochemical reduction mechanism of anti-*Helicobacter pylori* metronidazole derivatives, in aprotic and protic media. Bioelectrochem 2004;63: 353–7.
- Cotton JA, Beatty JK, Buret AG. Host parasite interactions and pathophysiology in *Giardia* infections. Int J Parasitol 2011;41:925–33.
- Edwards DI. Nitroimidazole drugs – Mechanisms of action and resistance mechanisms. J Antimicrob Chemother 1993;31:9–20.
- English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, et al. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. Nat Immunol 2009;10:480–7.
- Farthing MJ, Mata L, Urrutia JJ, Kronmal RA. Natural history of *Giardia* infection of infants and children in rural Guatemala and its impact on physical growth. Am J Clin Nutr 1986;43:395–405.
- Keister DB. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-5-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg 1983;77:487–8.
- Leitsch D, Burgess AG, Dunn LA, Krauer KG, Tan K, et al. Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and thioredoxin reductase are involved in 5-nitroimidazole activation while flavin metabolism is linked to 5-nitroimidazole resistance in *Giardia lamblia*. J Antimicrob Chemother 2011;66:1756–65.
- Maia C, Lanfredi-Rangel A, Santana-Anjos KG, Oliveira MF, DeSouza W, et al. Effects of a putrescine analog on *Giardia lamblia*. Parasitol Res 2008;103:363–70.
- Mirza H, Wu Z, Kidwai F, Tan KS. A metronidazole-resistant isolate of *Blastocystis* spp. is susceptible to nitric oxide and downregulates intestinal epithelial inducible nitric oxide synthase by a novel parasite survival mechanism. Infect Immun 2011;79: 5019–26.
- Müller O, Sattler T, Flötenmeyer M, Schwarz H, Plattner H, et al. Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. Cell Biol 2000;151:519–28.
- Müller J, Sterk M, Hemphill A, Müller N. Characterization of *Giardia lamblia* WB C6 clones resistant to nitazoxanide and to metronidazole. J Antimicrob Chemother 2007;60:280–7.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW. *Giardia* vaccination. Parasitol Today 2000;16:213–7.
- Savioli L, Smith H, Thompson A. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. Trends Parasitol 2006;22:203–8.
- Simsek Z, Zeyrek FY, Kurcer MA. Effect of *Giardia* infection on growth and psychomotor development of children aged 0–5 years. J Trop Pediatr 2004;50:90–3.
- Tejman-Yarden N, Millman M, Lauwaet T, Davids BJ, Gillin FD, et al. Impaired parasite attachment as fitness cost of metronidazole resistance in *Giardia lamblia*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:4643–51.
- Thompson RCA, Reynoldson JA, Mendis AHW. *Giardia* and giardiasis. Adv Parasitol 1993;32:71–160.
- Upcroft JA, Dunn LA, Wright JM, Benakli K, Upcroft P, et al. 5-Nitroimidazole drugs effective against metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:344–7.

- Upcroft P, Upcroft JA. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:150–64.
- Vannier-Santos MA, de Castro SL. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Curr Drug Targets* 2009;10:246–60.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, Lins U, Urbina JA, Borges VM, et al. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium and calcium accumulation in *Leishmania acidocalcisomes*. *Microbiol* 1999;145:3213–20.
- Wensaas KA, Langeland N, Rortveit G. Post-infectious gastrointestinal symptoms after acute giardiasis. A 1-year follow-up in general practice. *Fam Pract* 2010;27:255–9.
- Wright JM, Dunn LA, Upcroft P, Upcroft JA. Efficacy of anti-giardial drugs. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2:529–41.
- Yason JA, Rivera WL. Genotyping of *Giardia duodenalis* isolates among residents of slum area in Manila, Philippines. *Parasitol Res* 2007;101:681–7.



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Comitê de Ética em Pesquisas – CPqGM/FIOCRUZ

## PARECER Nº 173/2008

**Protocolo: 271**

**Projeto de Pesquisa:** "Mecanismos de sinalização na interface *Entamoeba histolytica* - célula do hospedeiro".

**Pesquisador Responsável:** Dr. Marcos André Vannier dos Santos

**Instituição ou Departamento:** LBP – CPqGM/FIOCRUZ

### Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

**Vigência:** 15/09/2008 a 15/08/2012.

**Envio dos Relatórios Semestrais em:** 15/03/2009 – 15/09/2009 – 15/03/2010 – 15/09/2010 – 15/03/2011 – 15/09/2011 – 15/03/2012.

**Relatório Final:** 15/10/2012.

*The present study, entitled "Mecanismos de sinalização na interface *Entamoeba histolytica* - célula do hospedeiro" (protocol number 271) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG0002090 / IRB000026120) in August 28<sup>th</sup> 2008 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. In the present version, this project is licensed and valid until September 15<sup>th</sup> 2012.*

Salvador, 15 de setembro de 2008.

**Drª Maria Fernanda Rios Grassi**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
 CPqGM/FIOCRUZ  
 IORG-0002090 / IRB-00002612