



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

**FIOCRUZ**

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Padronização de condições experimentais no cultivo e  
quantificação de *Entamoeba histolytica* que otimizem ensaios de  
compostos potencialmente amebicidas**

**GUSTAVO MIRANDA PIRES SANTOS**

**Salvador – Brasil  
2011**

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

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

**Padronização de condições experimentais no cultivo e  
quantificação de *Entamoeba histolytica* que otimizem ensaios de  
compostos potencialmente amebicidas**

**GUSTAVO MIRANDA PIRES SANTOS**

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS

Co-orientadora: Dra. ADRIANA LANFREDI RANGEL

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

**Salvador – Brasil**  
**2011**



## **Agradecimentos**

Aos meu pais que a todo o tempo estavam ao meu lado;

A minha família que sempre me apoiou;

Aos meus amigos que não me deixaram fraquejar;

A minha grande parceira Indira Trüeb pela ajuda em vários trabalhos;

A Tayane (“Tainha”) pela força, disponibilidade e incentivo.

A Ciro e Rafael amigos e parceiros dos experimentos nos horários mais loucos;

A Aninha e nossas impressões;

A Karla, Mara e a Lorena pelas dicussões dos trabalhos;

A Songon;

A aqueles que eu gostaria que ainda estivessem aqui;

Aos meus colegas de trabalho;

Ao CNPq;

A FIOCRUZ;

A Dra. Adriana Lanfred;

Ao Dr. Marcos Vannier.

**Um cientista não pode descansar enquanto o conhecimento que pode reduzir o sofrimento humano permanece sobre uma prateleira.**

*Albert Sabin*

PIRES-SANTOS, G. M. Padronização de condições experimentais no cultivo e quantificação de *Entamoeba histolytica* que otimizem ensaios de compostos potencialmente amebicidas. 73 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2011.

## Resumo

O protozoário, *Entamoeba histolytica*, constitui a etiologia de milhares de óbitos anuais e, em muitos casos, a falta de saneamento, o grau de instrução e a falta de higiene da população podem favorecer a transmissão e a manutenção desses patógenos em uma comunidade. Por causar tantas mortes e problemas na saúde pública trabalhos que facilitem o estudo deste parasito fazem-se importantes. Uma vez que a padronização de cultivo de *E. histolytica* em placas de poços vai Existem indicações que mostram que este parasito pode se tornar resistente ao medicamento utilizado no tratamento desta protozoose, por isso, a busca por novas substâncias que possam atuar como tratamento alternativo é de suma importância. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi otimizar e padronizar o cultivo e a contagem deste parasito *in vitro*, além de identificar substâncias com potencial amebicida, que possam ser utilizadas no futuro como fármacos no tratamento da amebíase, sugerindo também uma via possível de ação das substâncias que apresentaram os melhores efeitos. Para tanto, os trofozoítos foram cultivados em placas de 24 poços sobre diferentes condições, quatro métodos de contagem de células foram comparados e 74 (setenta e quatro) substâncias foram testadas. Destas 13 (treze) apresentaram uma inibição na proliferação axênica dos trofozoítos de cerca de 70%. Destas, três compostos foram estudados em mais detalhes, os mesoiônicos derivados da piperina (as MII, MVI e MIX). Estas substâncias pertencem ao grupo dos compostos mesoiônicos, substâncias formadas por um anel heteroatômico composto por nitrogênio, carbono e enxofre, capazes de atravessar membranas e interagir com biomoléculas. Além disso, alguns mesoiônicos são doadores de radicais NO e tais grupamentos são capazes de induzir uma morte celular semelhante à apoptose em *E. histolytica*, como sugerido pela expressão de fosfatidil-serina revelada por anexina-V. Confirmando os resultados descritos na literatura, estas substâncias foram capazes de induzir uma morte programada, porém observações da ultra-estrutura, tais como figuras de mielina, das células tratadas apontaram para autofagia que também foi evidenciada por testes com MDC gerando apoptose tipo II, que pode ser iniciada pela presença de ROS, que neste caso foram por DCFDA.

**Palavras-chave:** *Entamoeba histolytica*, Quimioterapia, Mesoiônicos.

PIRES-SANTOS, G. M. Standardization of experimental conditions and quantification in cultivation of *Entamoeba histolytica* that optimize test compounds potentially amebicides. 73 f. il. Thesis (Master) - Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Institute, Salvador, 2011.

### Summary

The protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, is the etiology of thousands of deaths annually and in many cases lack of sanitation, education level and poor hygiene of the population may facilitate the transmission and maintenance of these pathogens in a community. There are indications showing that this parasite may become resistant to the drug used in treatment of protozoal disease, so the search for new substances that can act as an alternative treatment is of paramount importance. Therefore, the aim of this study was to optimize and standardize the cultivation and enumeration of this parasite in vitro, and identify substances with potential amebicidal, which can be used in future as drugs for the treatment of amoebiasis, suggesting a possible route of action of the compounds that showed the greatest effects. For this purpose, trophozoites were cultured in 24-well plates under different conditions, four methods of cell count were compared and 74 (seventy four) substances were tested. Of these thirteen (13) showed an inhibition in the proliferation of axenic trophozoites of about 70%. Of these, three compounds were studied in more detail, the mesoionic derivatives of piperine (the MII, MVI and MIX). These substances belong to the group of mesoionic compounds, formed by a heteroatomic ring composed of nitrogen, carbon and sulfur, able to traverse membranes and interact with biomolecules. Moreover, some donors are mesoionic radicals NO and such groups are able to induce a cell death similar to apoptosis in *E. histolytica*, as suggested by the expression of phosphatidyl-serine revealed by annexin-V. Confirming the results described in the literature, these substances were capable to inducing a programmed death, but observations of the ultra-structure, such as myelin figures, treated cells pointed out that autophagy was also evidenced by tests with MDC generating apoptosis type II can be initiated by the presence of ROS, which in this case were by DCFDA.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, Chemotherapy, mesoionic.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Cisto de *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba díspar*. A seta mostra o corpo cromatóide.....17
- Figura 2: ciclo de vida da *E. histolytica*.(1) cisto e trofozoítos presentes nas fezes. (2) cistos maduros responsáveis pela infecção quando levados a boca. Os trofozoítos quando ingeridos chegam ao intestino e desencistam (3) formando novos trofozoítos (4), que ao se dividir podem formar nos cistos (5). (i) estágio infectante. (d) estágio diagnóstico. (A) colonização não invasiva. (B) amebíase intestinal. (C) amebíase extra-intestinal.....18
- Figura 3: placa de 24 poços contendo meio de cultura. Seta vermelha indicando poço sem óleo. Seta preta indicando a camada de óleo mineral.....35
- Figura 4: micrografias de poços, sem (a, c, e e g) e com (b, d, f e h) óleo mineral, incubados por 24 (a,b), 48 (c,d), 72 (e,f) e 96 horas (g,h).....35
- Figura 5: curvas de proliferação dos trofozoítos de *E. histolytica* na presença (azul) e ausência (vermelho) de óleo mineral. Sendo, o resultado estatisticamente significativo em 72 e 96 horas, pelo método ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,0001$ ).....35
- Figura 6: Micrografias de culturas de trofozoitos de *E. histolytica* na presença e ausência de óleo mineral, no aumento de 20x, com 72 horas de incubação. A) Micrografia, em campo claro, da cultura sem óleo mineral. B) Micrografia, em fluorescência, da cultura sem óleo mineral evidenciando a presença de ROS pela sonda DHE. C) Micrografia, em campo claro, da cultura com óleo mineral. D) Micrografia, em fluorescência, da cultura com óleo mineral evidenciando a ausência de ROS.....36
- Figura 7: Curva de crescimento de trofozoítos de *E. histolytica* na presença e ausência de óleo mineral. Na condição com óleo pode-se observar um aumento da proliferação deste parasito com baixo percentual de células marcadas pelo azul trypan. Contudo, nos poços sem o óleo mineral não há proliferação e a concentração de trofozoítos ao longo do tempo reduz.....36
- Figura 8: Gráfico de correlação linear entre absorbância a 655  $\eta\text{m}$  e número de trofozoítos de *E. histolytica* demonstrando que o aumento da concentração de trofozoítos no poço é proporcional ao aumento da leitura da absorbância a 655  $\eta\text{m}$ .....37
- Figura 9: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* expostos ao metronidazol por 72 horas, utilizando o método colorimétrico com azul de metileno.....38
- Figura 10: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M II por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma  $IC_{50}$  20 $\mu\text{M}$ .....41
- Figura 11: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M VI por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma  $IC_{50}$  29,9 $\mu\text{M}$ .....41
- Figura 12: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M IX por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma  $IC_{50}$  16,6  $\mu\text{M}$ .....42

Figura 13: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a solasodina, nas concentrações de 5 e 10 µM por 24 horas, a 37°C.....	42
Figura 14: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 19, nas concentrações de 5 e 10 µM por 24 horas, a 37°C.....	43
Figura 15: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 27, nas concentrações de 25 e 50 µM por 24 horas, a 37°C.....	43
Figura 16: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 33, nas concentrações de 25 e 50 µM por 24 horas, a 37°C.....	43
Figura 17: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem as M II, M VI e MIX nas concentrações de 250 e 500 µM por 24 horas, a 37°C.....	43
Figura 18: Micrografias Eletrônicas de Varredura de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> incubados com M II (D), M VI (E) e M IX (F), em suas respectivas IC <sub>50</sub> , e controle (sem qualquer composto potencialmente amebicida, em A-C) por 72 horas, a 37°C. Micrografias evidenciam o pleomorfismo dos trofozoítos, com emissão de pseudópodos em diferentes direções, além da irregularidade da superfície da membrana plasmática.....	45
Figura 19: Detalhe da micrografia 28E mostrando trofozoítos de <i>E. histolytica</i> incubados com MVI, na IC <sub>50</sub> (30µM) durante 72 horas, a 37°C. À direita aparece trofozoíto sem alteração e à esquerda célula com muitas protrusões ou 'blebs', semelhante a corpos apoptóticos (setas)...	46
Figura 20: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando numerosas vesículas (V), presença de grânulos de glicogênio e formação do pseudópodo (P).....	47
Figura 21: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando numerosas vesículas (V), presença de grânulos de glicogênio (setas).....	47
Figura 22: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando o núcleo e conformação da cromatina, com regiões hiperdensas na periferia e zona central do núcleo.....	48
Figura 23: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> incubados com composto M VI, na concentração de 29,9µM, por 72 horas a 37°C, evidenciando fusão de vesículas e material intra-vesicular aparentemente degradado.....	48
Figura 24: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> incubados com composto M VI, na concentração de 29,9µM, por 72 horas a 37°C, evidenciando figura de mielina, vesículas apresentando extensas áreas membranosas.....	49
Figura 25: Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de <i>E. histolytica</i> incubados com composto M VI, na concentração de 29,9µM, por 72 horas a 37°C, evidenciando o núcleo e a cromatina, apresentando configuração distinta do controle, apresentando concreções de cromatina densa (setas).....	49

Figura 26: Micrografia de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas, a 37°C na presença ou ausência de compostos, e posteriormente incubados com a sonda MDC, por 10 minutos. Observam-se células negativas para a marcação com a sonda MDC no controle (A e B). Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20µM de M II, observa-se marcação difusa (C e D) nas células tratadas para a sonda MDC. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9µM de M VI, observa-se marcação difusa nas células tratadas para a sonda MDC. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6µM de M IX, observa-se marcação difusa nas células tratadas para sonda MDC. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....51

Figura 27: Micrografia de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 72 horas, a 37°C na presença ou ausência de compostos, e posteriormente incubados com a sonda MDC, por 10 minutos. Observam-se células negativas para a marcação com a sonda MDC no controle (A e B). Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20µM de M II, observa-se marcação intensa (C e D) nas células tratadas para a sonda MDC. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9µM de M VI, observa-se marcação intensa nas células tratadas para a sonda MDC. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6µM de M IX, observa-se marcação difusa nas células tratadas para sonda MDC. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....52

Figura 28: Micrografia de trofozoítos de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas na presença e ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda DAPI. Observa-se ausência de fluorescência nas células incubadas com DAPI tanto no controle quanto, respectivamente, nos tratamentos com 20µM de M II (C e D), 29,9µM de M VI (E e F) e 16,6µM de M IX (G e H). (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....54

Figura 29: Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas na presença e ausência de compostos, a 37°C e posteriormente fixadas com metanol e incubados, com a sonda DAPI. (A e B) Observa-se fluorescência dos núcleos das células do controle incubadas com DAPI, onde cada célula apresenta um núcleo. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubados com 20µM de M II, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9µM de M VI, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6µM de M IX, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....56

Figura 30: Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 10x, incubado por 1 hora na presença ou ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A e B) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20µM de M II, observa-se fluorescência de fundo. (E e F) Em de trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9µM de M VI, observa-se fluorescência positiva. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6µM de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....58

Figura 31: Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 10x, incubado por 3 hora na presença ou ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A e B) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20µM de M II, observa-se fluorescência de fundo. (E e F) Em de trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9µM de M VI, observa-se fluorescência positiva. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*,

incubados com 16,6 $\mu$ M de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.....59

Figura 32: Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 40x., por 9 horas na presença e ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (B) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20 $\mu$ M de M II, observa-se fluorescência de fundo. (C) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6 $\mu$ M de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, B e C) Overlay.....60

Figura 33: Citometria de fluxo de trofozoítos de *E. histolytica* mostrando marcação de anexina V. (A) Células do controle. (B) Células tratadas com 29,9  $\mu$ M de M VI.....61

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA I Inibição determinada relação aos controles com até 0,06% de DMSO, após 72 horas de cultivo com 50 $\mu$ M de cada composto.....	39
--	----

## LISTA DE ABREVIACOES

<b>ATP</b>	<b>Adenosina trifosfato</b>
<b>CPqGM</b>	<b>Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz</b>
<b>DAPI</b>	<b>4,6-diamino-2-fenilindol</b>
<b>DCFDA</b>	<b>Diclorodihidrofluorescina diacetato</b>
<b>DHE</b>	<b>Dihidroetidina</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimetilsulfxido</b>
<b>DMEN</b>	<b>Meio Dulbecco's Eagle's modificado</b>
<b>DNA</b>	<b>cido desoxirribonuclico</b>
<b>D.O.</b>	<b>Densidade ptica</b>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<b>FIOCRUZ</b>	<b>Fundação Oswaldo Cruz</b>
<b>H<sub>2</sub>DCFDA</b>	<b>Ver DCFDA</b>
<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Concentração inibitria de 50%</b>
<b>MDC</b>	<b>Monodancilcadasverina</b>
<b>MET</b>	<b>Microscopia eletrnica de transmissão</b>
<b>MEV</b>	<b>Microscopia eletrnica de varredura</b>
<b>MTT</b>	<b>Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazlio]</b>
<b>P.A.</b>	<b>Para Anlise</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampo salino de fosfato</b>
<b>PCD</b>	<b>Morte celular programada</b>
<b>PI</b>	<b>Iodeto de propdeo</b>
<b>RNA</b>	<b>cido ribonuclico</b>
<b>ROS</b>	<b>Espcies reativas oxidativas</b>
<b>SOD</b>	<b>Superxido dismutase</b>
<b>UV</b>	<b>Luz ultravioleta</b>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Referencial teórico.....</b>	<b>15</b>
1.1	Enteroparasitoses .....	15
1.2	Entamoeba / amebíase .....	16
1.3	Cultivo de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	18
1.4	Tratamento da amebíase .....	19
1.5	Resistência ao metronidazol .....	20
1.6	Plantas medicinais .....	21
1.6.1	Piperina .....	21
1.6.2	Compostos mesoiônico .....	22
1.7	Autofagia .....	23
1.8	Morte celular .....	23
1.8.1	Apoptose .....	24
1.8.2	Mortes celulares programadas não apoptóticas .....	25
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>26</b>
<b>3</b>	<b>Métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Considerações finais .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## 1 Referencial teórico

### 1.1 Enteroparasitoses

A relação entre os humanos e os parasitos é muito antiga e, provavelmente, outros humanóides também tiveram parasitos. Sendo assim, não é difícil aceitar que existam documentos, anotações hebraicas e egípcias com mais de três mil e quinhentos anos que já relatem uma relação entre homens e parasitos como o *Schistosoma* sp. (GIELLESPIE & PEARSON, 2001).

Apesar das enteroparasitoses acometerem pessoas em todo o globo, são equivocadamente chamadas de 'doenças tropicais', como se estas fossem estritamente encontradas nos países tropicais. Parasitos como *Ascaris lumbricoides* e *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), que infectam hoje cerca de um bilhão e meio bilhão de pessoas, respectivamente, têm prevalência cosmopolita. Este último parasito foi descrito por um pesquisador na Rússia, o que demonstra que esta doença acomete indivíduos em regiões de clima frio (FREITAS, 2007).

As enteroparasitoses também não são doenças de incidência restrita às populações de baixa renda, turistas de países desenvolvidos e outros viajantes são hospedeiros eventuais destes parasitos. Contudo, as populações economicamente desfavorecidas as quais habitam locais onde o sistema de saneamento básico é precário ou inexistente, têm baixo grau de instrução, sobrevivem com condições nutricionais precárias podem ser, consideravelmente, mais infectadas por parasitos (ASSIS *et al.*, 2007).

A ausência de vacinas contra doenças parasitárias impossibilita a proteção contínua contra estas doenças. Os medicamentos apresentam ação limitada uma vez que sua eficiência não é total e o risco de recidivas de diversas parasitoses é alto. Além disso, há ainda a re-infecção de pessoas já devidamente diagnosticadas e tratadas devido a não erradicação dos focos de contaminação com relação aos protozoários cavitários. Os ovos e cistos dos parasitos podem permanecer viáveis, no ambiente, por meses, ou mesmo anos. (NAPPI & VASS, 2002).

Outro fator que contribui para a prevalência alta de parasitoses está associada ao uso indiscriminado de medicamentos e/ou aos efeitos colaterais que podem reduzir a adesão ou mesmo levar ao abandono do tratamento, o que por sua vez, pode selecionar patógenos resistentes. Desta forma, mesmo em enfermidades cujo tratamento é relativamente simples, o cuidado com o uso de medicamentos deve existir, bem como sua administração só deve ser realizada tendo em vista sua necessidade e autorização médica adequada (CLARK, 2000).

## **1.2 *Entamoeba* / amebíase**

O protozoário causador da amebíase, a *E. histolytica*, tem um ciclo de vida monoxênico, onde os cistos são liberados através das fezes de indivíduos parasitados, contaminando a água e os alimentos. A porta de entrada do parasito ao organismo é a boca, para onde estes cistos são levados mecanicamente e ingeridos (NEVES *et al.*, 2001).

O gênero *Entamoeba* agrupa vários tipos de amebas, tais como *E. coli*, *E. histolytica*, *E. dispar*, dentre outras que vivem na luz intestinal. Constitui o agente etiológico da segunda maior causa de mortalidade entre as protozooses, chegando a atingir até 110.000 óbitos por ano e é considerada um problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (ESPINOSA-CANTELLANO, M. & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). A *E. histolytica* possui duas formas evolutivas sem seu ciclo biológico: cisto e trofozoíto. O primeiro contamina o ambiente através dispersão no solo, na água e nos alimentos e o segundo é comumente encontrado na luz intestinal onde precisa permanecer aderido para sobreviver. Algumas vezes, pode ser observado nas fezes, particularmente quando diarréicas (REY, 2001; MEZA *et al.*, 2006).

O cisto é considerado a forma vegetativa e infectante deste parasito o qual é eliminado pelas fezes (CLARK, 2000; NEVES *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Cisto de *Entamoeba histolytica*/ *Entamoeba díspar*. A seta mostra o corpo cromatóide.  
Fonte: adaptado de CDC. [http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/a-f/amebiasis/body\\_amebiasis\\_il1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/imagelibrary/a-f/amebiasis/body_amebiasis_il1.htm).

Cada cisto possui cerca de 8 a 20  $\mu\text{m}$ , forma esférica podendo conter até quatro núcleos e corpos cromatóides (figura 1) (REY, 2001). Contaminando por dispersão água, alimentos e o solo, estes podem ser ingeridos, sofrendo a ação da acidez estomacal, que age como sinalizador para o desencistamento, processo o qual se finaliza com a liberação de quatro trofozoítos. Estes se duplicam rapidamente por bipartição, única forma de reprodução deste parasito no intestino grosso. Os cistos são formados a partir de outros trofozoítos ao tempo em que, as fezes vão se constituindo (figura 2) (REY, 2001). Os trofozoítos pleomórficos, por sua vez, se movimentam por meio de pseudópodos, não apresentando uma forma definida, com variação de tamanho entre 20 a 40  $\mu\text{m}$ . Eles podem ser mantidos proliferando-se em cultivo *in vitro*.

A *E. histolytica* (do latim *histo* = tecido; *lytica* = lise, quebra) é assim nomeada pois é a única ameba capaz de lisar células intestinais e hemácias, alimentando-se das mesmas. Deste modo a *E. histolytica* causa úlceras intestinais provocando diarréia sanguinolenta, principal característica da amebíase.

A amebíase por *E. histolytica* é uma enfermidade que acomete cerca de 10% das pessoas infectadas com parasitos do gênero *Entamoeba*. Sua patologia ainda não está completamente elucidada, mas sabe-se que alguns

trofozoítos atacam e invadem a mucosa do intestino grosso podendo migrar para outros órgãos, como fígado, pulmão e cérebro, causando amebíase extra-intestinal. Este quadro potencialmente letal da doença é menos prevalente, ocorrendo em menos de 2% dos casos de amebíase.

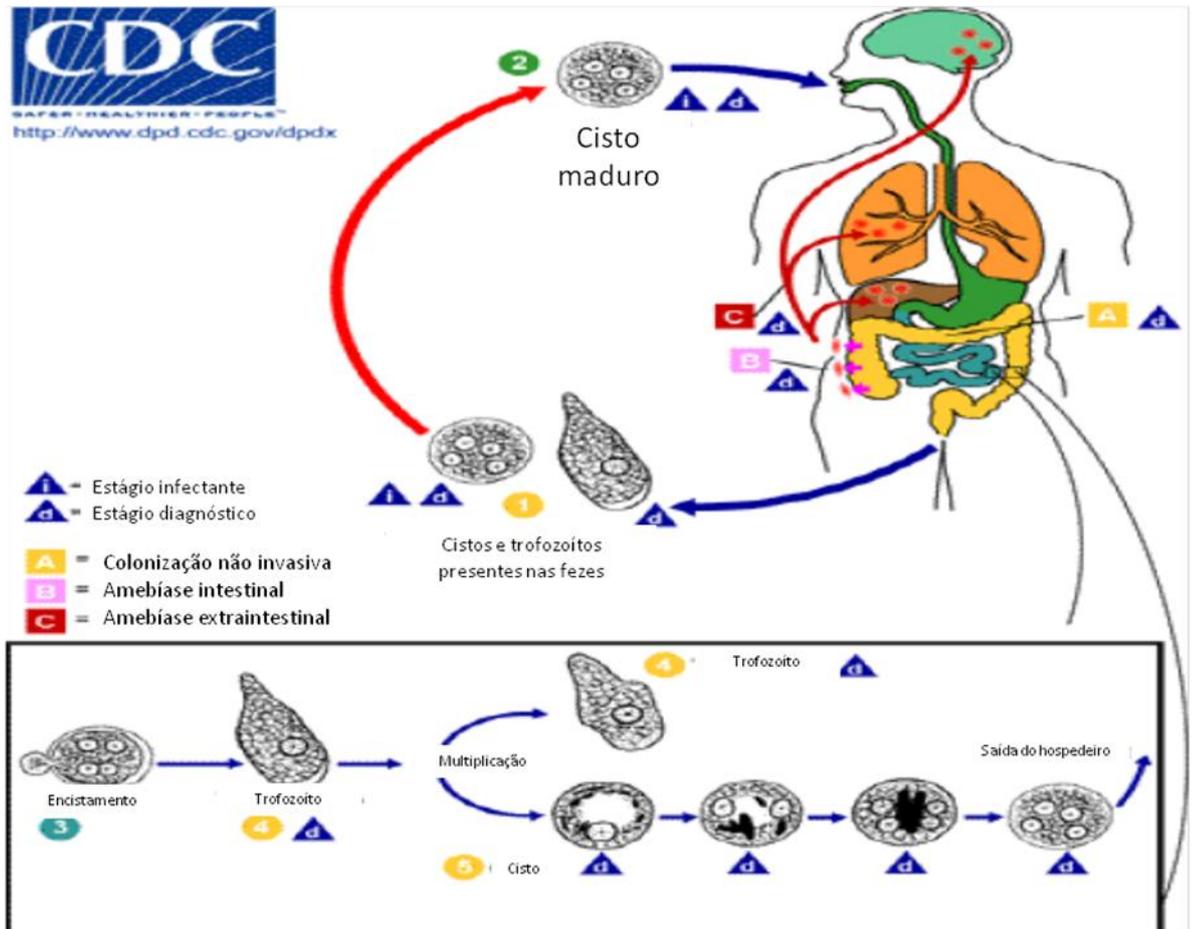


Figura 2: ciclo de vida da *E. histolytica*. (1) cisto e trofozoítos presentes nas fezes. (2) cistos maduros responsáveis pela infecção quando levados à boca. Os trofozoítos quando ingeridos chegam ao intestino e desencistam (3) formando novos trofozoítos (4), que ao se dividir podem formar nos cistos (5). (i) estágio infectante. (d) estágio diagnóstico. (A) colonização não invasiva. (B) amebíase intestinal. (C) amebíase extra-intestinal.

Fonte: Adaptado [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)

### 1.3 Cultivo *in vitro* de *Entamoeba histolytica*

A *E. histolytica* é um parasito muito sensível a muitos fatores e isso dificulta o seu cultivo. Ao longo da história do estudo da amebíase foram realizadas muitas mudanças e adaptações nos meios e condições de cultivo deste parasito. Contudo, alguns parâmetros descritos influenciam a morfologia dos trofozoítos, tais como: o efeito do pH, a temperatura, a osmolaridade e o potencial redox (RAVDIN, 2000). Sendo que substâncias redutoras, como ácido

ascórbico e cisteína, só começaram a ser associadas positivamente à proliferação de *E. histolytica* a partir do final dos anos 70 (BAND *et al.*, 1979). Além disso, altas concentrações de O<sub>2</sub> são tóxicas para a *E. histolytica* (RAMOS-MARTINEZ *et al.*, 2009).

#### 1.4 Tratamento da amebíase

As pesquisas para o tratamento quimioterápico da amebíase começaram há cerca de 100 anos. O metronidazol teve seu efeito amebicida demonstrado em meados dos anos 60 (revisto em UPCROFT & UPCROFT, 2001) e permanece como droga de escolha, para o tratamento. Contudo existem outros compostos que hoje são utilizados no tratamento desta doença com ação na luz intestinal, como os derivados de quinoleína, os que apresentam ação tissular, como a emetina (substância testada em 1912) e os compostos de ação mista, como os compostos imidazólicos (NEVES *et al.*, 2001; UPCROFT & UPCROFT, 2001).

*E. histolytica* tem um metabolismo diferente das vias metabólicas humanas, por isso que se buscam substâncias que podem interferir em tais vias, interagindo com metabólitos e/ou proteínas específicas do protozoário (SAAVEDRA-LIRA & PEREZ-MONTFROT, 1996). Este fato pode ser comprovado pela ausência de mitocôndrias nas *E. histolytica*, o que altera completamente metabólitos e aceptores finais de elétrons das vias de aquisição de energia (MARR *et al.*, 2003). Portanto, tais moléculas podem ser alvos potenciais de fármacos, sendo mais seletivas, por sua vez poderão ser mais eficazes e causar menores efeitos adversos (SAAVEDRA-LIRA & PEREZ-MONTFROT, 1996).

É recomendado que o metronidazol seja utilizado apenas nos casos de infecção por *E. histolytica*, enquanto que nos casos em que apareçam outras espécies morfológicamente semelhantes, como *E. dispar*, é indicado um tratamento com medicamentos de ação na luz intestinal ('luminal'). Todavia, esta recomendação usualmente não é seguida e o metronidazol é administrado sempre em que cistos com quatro núcleos aparecem nas fezes de um indivíduo. Na bula desta medicação não há nenhum efeito adverso grave listado, sendo relacionados apenas efeitos como: boca seca; vômitos; náusea;

estomatites; diarreia; vertigem; tontei ras gosto metálico na boca. Existem estudos que relatam a existência de efeitos adversos importantes ao hospedeiro, tais como genotoxicidade e atividades carcinogênicas e mutagênicas (BEDENSKY *et al.*, 2002; ABREVAYA *et al.*, 2007).

O metronidazol, além de ser um composto de ação mista, é de baixo custo e pode ser administrado por via oral, o que facilita o tratamento (SAMPAIO *et al.*, 2009). A absorção deste fármaco é relativamente rápida e eficiente, sendo distribuído pelos tecidos em concentrações praticamente equivalentes à sérica. Este composto, após ingerido, pode ser encontrado em secreções vaginais e no leite, podendo, também, atravessar a barreira placentária. Com uma meia-vida de cerca de 10 horas, boa parte do medicamento é metabolizado no fígado em dois compostos ativos com ação bactericida, capaz de agir sobre microorganismos outros anaeróbicos, incluindo protozoários, e eliminado através da urina.

### **1.5 Resistência do parasito ao metronidazol**

Há evidências sobre a resistência de *E. histolytica* ao metronidazol *in vitro* (WASSMANN *et al.*, 1999; UPCROFT & UPCROFT, 2001; LEITSCH *et al.*, 2007). Na Índia, Bansal e colaboradores, em 2004, observaram que o IC<sub>50</sub> (concentração inibitória de 50% da população) das drogas utilizadas no tratamento da amebíase está maior em cepas isoladas de pacientes que o da cepa referencia, a cepa HM1:IMSS, sugerindo que, mesmo *in vivo*, a resistência aos medicamentos pode ocorrer.

A citotoxicidade deste medicamento ocorre devido a sua metabolização em compostos reativos, radicais nitro livres e superóxidos. Estes metabolitos secundários e/ou intermediários do metronidazol interagem com as moléculas de DNA do parasito (SAAVEDRA-LIRA & PEREZ-MONTFROT, 1996) e, além disso, tais radicais podem induzir apoptose nos trofozoítos de *E. histolytica* (RAMOS *et al.*, 2007).

A ativação do metronidazol ocorre, no citoplasma, pela ação da enzima piruvato:ferredoxina oxidoreductase, que metaboliza a substância em seu composto ativo. Portanto, esta é uma enzima importante na eficácia do medicamento, mas não é a única envolvida nos mecanismos de resistência do

protozoário (SAMARAWICKREMA *et al.*, 1997). O aumento da expressão de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a peroxiredoxina, participaram ou na redução de tóxicos e/ou detoxificação de radicais livres. Em contrapartida, a redução da expressão de flavina redutase e ferredoxina podem contribuir nos mecanismos de resistência da *E. histolytica* (SAMARAWICKREMA *et al.*, 1997; WASSMANN *et al.*, 1999).

## **1.6 Plantas medicinais**

Os vegetais, dotados de notáveis maquinarias biossintéticas, são capazes de produzir numerosas substâncias de complexa estrutura molecular, cujas atividades e efeitos podem ser úteis em sistemas biológicos distintos.

Especiarias são de origem vegetal apresentando óleos essenciais que apresentam sabor e aroma marcantes, tais como: pimenta do reino; orégano; cravo e canela. Tais plantas foram utilizadas para a conservação de alimentos e, segundo relatos, tal conservação utilizando vegetais é realizada há mais de 4000 anos. Além disso, por algum tempo os vegetais que apresentam atividades antimicrobianas foram usados, inclusive, como moeda corrente (KRONDL, 2007). A pimenta, por exemplo, chegou a ter custos superiores ao do ouro.

Atualmente existe uma busca por possíveis fármacos que sejam extraídos ou mesmo derivados de compostos naturais. O Brasil é um país onde se localiza uma grande extensão da floresta e uma das maiores, se não a maior, biodiversidade do planeta, portanto, apresenta um alto potencial como produtor de biofármacos, sendo o Brasil alvo de biopirataria (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

O uso de vegetais para fins terapêuticos não é uma prática restrita aos humanos. São muitas as espécies de animais que também o fazem, como os cães, gatos e macacos, sendo a evidência da efetividade do uso dos vegetais o controle das infecções gastrointestinais. Portanto, o estudo sobre a atividade de substâncias naturais e seus derivados faz-se importante.

### 1.6.1 Piperina

A piperina é o composto mais abundante e principal substância produzida pela pimenteira (*Piper nigrum*). Este alcalóide é encontrado em sementes desta e de outras espécies pertencentes ao gênero *Piper*. Existem relatos na literatura sobre a atividade biológica desta substância e suas diferentes aplicações (CARDOSO *et al.*, 2005), incluindo ação antiparasitária.

Esta substância foi testada, por Ghoshal e colaboradores, em 1996, contra trofozoítos de *E. histolytica* apresentando efeito amebicida em alguns extratos estudados. Contudo, neste trabalho nenhum tipo de análise ultraestrutural ou molecular foi utilizada para evidenciar os efeitos destes extratos sobre as células testadas.

Apesar de ser um protozoário completamente diferente de *E. histolytica*, o *T. cruzi* também teve sua viabilidade reduzida e sofreu alterações na presença da piperina, tais como: divisões truncadas, vacuolizações, aumento do volume de organelas como a mitocôndria (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008). Além disso, há estudos que demonstram que mesmo sem apresentar efeitos inibitórios *per se*, a piperina é capaz de promover a atividade de um segundo composto quando em combinação (BALAKRISHNAN *et al.*, 2001).

### 1.6.2 Compostos mesoiônicos

Compostos mesoiônicos pertencem a um grupo de betaínas planas estudadas há muito tempo, mas apenas nos anos 50 do século passado foram devidamente classificados. Este grupo de substâncias apresenta muitas atividades biológicas, incluindo atividades parasitocidas. Seus componentes apresentam múltiplos anéis heteroatômicos que, com regiões dipolo, são capazes de atravessar as membranas e interagir com biomoléculas, pois mesmo apresentando regiões carregadas, estas são moléculas neutras (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2008).

Alguns mesoiônicos são considerados doadores de radicais NO e estão ligados à indução de apoptose em alguns tipos celulares (SENFF-RIBEIRO *et al.*, 2004), sendo que a atividade biológica e a eficácia destes compostos, como

agentes microbicidas, podem variar de acordo com os grupamentos associados e suas respectivas posições no anel heteroatômico (OLIVEIRA, 2009).

Este grupo de substâncias mostrou-se efetivo contra insetos e protozoários como o *T. cruzi*, onde observou-se eficácia semelhante à ação do benzonidazol (FERREIRA *et al.*, 2008).

### **1.7 Autofagia**

A autofagia, que deriva do grego *auto* = próprio, a si mesmo, e *fagos* = digestão, é a capacidade da célula digerir seus próprios componentes, é um processo fisiológico, que ocorre em taxas basais em diferentes tipos celulares, sendo mediado pelo produto de um conjunto de genes, como os genes *Atg*, bem caracterizados em leveduras. Este processo pode estar presente em diferentes momentos e com finalidades distintas, tais como o desenvolvimento celular, contenção de processos invasivos e manutenção de organelas, dentre outras (PICAZARRI *et al.*, 2008). Entretanto, este mecanismo também pode estar ligado à processos imunitários e até mesmo à morte programada da célula, sendo chamada de apoptose tipo II (XIE & KLIONSKY, 2007). Durante o processo autofágico, vesículas caracterizadas por 2 (duas) unidades de membranas são formadas no citoplasma celular, envolvendo o conteúdo citoplasmático, incluindo organelas e formando o autofagossomo. Tal evento é caracterizado pela fusão, por exemplo, do vacúolo autofágico com o lisossomo, criando assim um autofagolisossomo.

Este processo pode também ser encontrado em células onde estejam ocorrendo desequilíbrios metabólicos, onde, através deste recurso procura-se preservar a viabilidade celular, reciclando nutrientes intracelulares. Em eucariotos, a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) pode induzir autofagia na tentativa de reparar danos ocasionados pelo estresse oxidativo que pode levar a célula à morte (SCHERZ-SHOUVAL & ELAZAR, 2007).

### **1.8 Morte celular**

Existem fatores que podem levar uma célula à morte, tais como: desnutrição; toxinas; fármacos e sinais extracelulares. Desta forma, existem muitos tipos de morte celular, sendo os mais bem descritos a necrose e a

apoptose. Estes dois processos são distintos e possuem características morfológicas e bioquímicas específicas. O primeiro destes processos ainda pode ser subdividido em apoptose clássica, via intrínseca e extrínseca, e apoptose independente de caspases, apoptose tipo I, apoptose tipo II (apoptose autofágica) e apoptose tipo III. Enquanto a apoptose é um mecanismo dependente de ATP, condensação da cromatina (picnose), fragmentação do DNA e subdivisão do citoplasma em corpos apoptóticos, a necrose é um mecanismo onde há uma deformação nuclear, ruptura da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo intracelular (NANJI & HILLER-STURMHÖFEL, 1997).

### 1.8.1 Apoptose

Em organismos complexos a morte celular é um fator importante e rigorosamente regulado, que facilita a homeostase destes ou mesmo auxilia no combate às infecções virais, bacterianas ou parasitos, durante o qual algumas células entram em um processo de autodestruição. Este mecanismo de morte programada da célula é conhecido como apoptose, podendo ser clássico ou não.

Tal processo possui algumas características que o diferenciam. Duas vias de indução de apoptose ativadas são por caspases: a via intrínseca, que ocorre quando o sinal de apoptose é gerado dentro da própria célula, e a via extrínseca, que se inicia a partir de um sinal externo. Existem também mecanismos independentes de caspases, tais como alterações no material genético, com fragmentação do DNA que também podem ativar a proteína *Tp53*, um dos responsáveis pela regulação da apoptose (ALBERTS *et al.*, 2004).

A apoptose foi descrita para inúmeros tipos celulares, sendo conhecida em parasitos como *Leishmania* sp. e *Trypanosoma* sp. Em parasitos anaeróbicos, como *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, existem trabalhos que também demonstram este processo. Neste último parasito o óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) podem induzir apoptose independente de caspase, supõe-se que, assim como nos humanos, altas

concentrações de NO podem interagir com o DNA, inibindo a polimerase e ativando a síntese de uma proteína semelhante à p53, proteína que 'regula' a morte celular, sendo considerada em humanos uma proto-oncoproteína (RAMOS *et al.*, 2007).

Acredita-se também que a emetina, uma das substâncias utilizadas no tratamento da amebíase, e o peróxido de hidrogênio também sejam capazes de induzir apoptose em trofozoítos de *E. histolytica* (NANDI *et al.*, 2010), uma vez que, na presença destas substâncias, o parasito apresenta uma morfologia semelhante a de células em apoptose (VILLALBA-MAGDALENO *et al.*, 2007; GHOSH *et al.*, 2010) devido ao estresse oxidativo, respectivamente.

### 1.8.2 Mortes celulares programadas não apoptóticas

Necrose e apoptose são termos que hoje representam, respectivamente, morte não programada e morte programada da célula. Contudo, o termo apoptose divide-se em quatro subtipos: 'clássica', tipo I (semelhante à apoptose clássica e caracterizada por condensação de cromatina e fragmentação de DNA), tipo II, também conhecida como necrose programada ou morte celular autofágica, caracterizada pela presença de vacúolos autofágicos, e tipo III onde a célula é fragmentada sem a ação de lisossomos e com pouca ou nenhuma condensação citoplasmática (BURSCH *et al.*, 2004).

Dos tipos de morte programada a morte autofágica (também conhecida como apoptose não clássica a tipo II) é a mais estudada e melhor caracterizada, sendo encontrada em diversos tipos celulares, incluindo protozoários aeróbicos e anaeróbicos. Este é um tipo de morte celular independente de caspases (BENCHIMOL, 2008) e inicia-se com a formação de vacúolos autofágicos, agentes que degradam o conteúdo citoplasmático, com posterior danos nucleares, tais como: condensação da cromatina e fragmentação do DNA, que são padrões apresentados em células em PCD, tendo como eventos finais, quando em um sistema *in vivo*, a fagocitose e degradação completa dentro dos vacúolos autofágicos de células fagocitárias (BURSCH *et al.*, 2004).

A compreensão destes mecanismos de morte celular pode ser de grande valia na elucidação dos modos de ação de compostos antiparasitários.

## **2 Objetivo**

### **2.1 Geral**

Padronizar e testar condições experimentais no cultivo de *E. histolytica* que otimizem ensaios de compostos potencialmente amebicidas

### **2.2 Específicos**

Padronizar as condições experimentais do cultivo *in vitro* de *E. histolytica* em placas de poços;

Avaliar ensaio colorimétrico para quantificação de trofozoítos;

Realizar testes de proliferação *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* na presença e na ausência de substâncias naturais e/ou sintéticas;

Avaliar e investigar possíveis alterações ultraestruturais induzidas pelos compostos testados;

Empregar sondas específicas para observar o(s) mecanismo(s) de morte celular produzido;

Testar atividades anti-amebianas de compostos mesoiônicos derivados de piperina.

### **3 Métodos**

#### **3.1 Compostos avaliados**

74 compostos foram isolados e/ou sintetizados (tabela 1) por instituições colaboradoras: UFRRJ; UFPA; UFF.

#### **3.2 Cultivo**

A cepa HM1-SS de *Entamoeba histolytica* utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Edward Felix Silva e Dra. Maria Aparecida Gomes, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para manutenção dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, da cepa HM1:IMSS, foram axenicamente cultivados em tubos de vidro (aprox. 15 mL), em meio TY-S-33 suplementado com 20% (vol/vol) de soro bovino adulto, à 37°C, por 48 a 72 horas.

#### **3.3 Padronização de cultivo em placas de cultura de 24 poços**

Na padronização do cultivo em placas o crescimento dos trofozoítos foi relacionado ao crescimento do parasito nos tubos. Para tanto, curvas de crescimento foram elaboradas. No cultivo em placas foram utilizados 2 mL de meio de cultura sem e com uma camada, de 700 µL, de óleo mineral. Em todas as condições o inóculo inicial foi de  $2 \times 10^4$  células/mL e pontos de contagem de células foram coletados a cada 24 horas. Contudo foram testadas, também, condições nas quais foram variados o volume de meio, 500µL para mais e para menos, e o volume de óleo mineral 200µL para mais e para menos. O volume de final de liquido no poço foi outro fator analisado, para tanto foi comparado os 700µL de óleo com 700µL de meio de cultura.

Para determinar a eficácia do método de cultivo as células foram avaliadas quanto à viabilidade (com azul trypan, aderência, motilidade e a morfologia), além de curvas padrão serem geradas. O óleo mineral utilizado foi esterilizado por exposição à luz U.V. por 72 horas.

### **3.4 Padronização de teste colorimétrico para quantificação de trofozoítos e aplicação em bioensaios**

O cultivo e as condições experimentais, usualmente empregadas, *in vitro* são semelhantes, ambas utilizando tubos de 15 mL com 12 mL de meio de cultura como volume final, porém nos experimentos o inóculo inicial é determinado,  $2 \times 10^4$  trofozoítos/mL. Em bioensaios, além de culturas incubadas com potenciais fármacos, são usados controles nos quais os trofozoítos são mantidos com e sem o diluente dos compostos. Estas condições foram mantidas nos estudos realizados em placas, contudo com todos os volumes reduzidos.

Para a padronização de um teste colorimétrico capaz de realizar quantificação dos trofozoítos foi testada a relação entre o número de trofozoítos e a absorvância, onde diferentes inóculos de trofozoítos foram incubados, em estufa de CO<sub>2</sub> à 5%, por 30 minutos a 37°C e posteriormente foram processados seguindo métodos que empregam 'alamar blue®' (MIKUS & STEVERDING, 2000); brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT) (CEDILLO-RIVERA, RAMÍREZ & MUÑOZ, 1992) e azul de metileno para posterior avaliação do método mais eficaz em novo modelo (BUSSATI & GOMES, 2007).

Testes na ausência e na presença de diferentes concentrações de metronidazol, droga de escolha para o tratamento da amebíase, foram realizados para também avaliar os métodos colorimétricos.

### **3.5 Triagem de compostos**

Foram testados os efeitos de 74 compostos sobre a viabilidade em trofozoítos de *E. histolytica* (tabela 1). Para isso, inóculos de  $2 \times 10^4$  amebas foram expostos por 72 horas à concentração de 50 µM das substâncias. Concomitantemente, o controle do diluente DMSO e aquele sem substância foram preparados para fins de comparação.

Após as triagens os compostos com taxa de inibição superiores a 70% foram considerados bons candidatos e selecionados. Nesta nova incubação

foram utilizadas para estudos futuros, concentrações crescentes das substâncias para determinação de IC<sub>50</sub>. As substâncias estudadas foram, então, incubadas e amostras foram obtidas nas quais foi avaliada a viabilidade celular através da capacidade adesiva e da motilidade ou fixadas para determinação de densidade celular. Controles sem substância e com a maior concentração do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizado foram testados concomitantemente. Estes testes foram realizados utilizando placas de 24 poços e a quantificação foi realizada por colorimetria. A densidade celular foi determinada por contagem direta em câmara de Neubauer por microscopia de contraste de fase e/ou por densidade colorimétrica *vide supra*.

### **3.6 Citotoxicidade**

Para a realização dos testes de citotoxicidade foram utilizados macrófagos peritoneais murinos avaliados pelo método MTT.

#### **3.6.1 Coleta de macrófagos murinos peritoneais**

A coleta dos macrófagos foi realizada por lavagem peritoneal utilizando PBS a 4°C, pH 7,4. Em seguida, as células foram contadas e inoculadas na presença e na ausência das substâncias que apresentaram os maiores efeitos sobre os trofozoítos de *E. histolytica* (CEUA 023/2009).

#### **3.6.2 Avaliação de citotoxicidade de compostos sobre macrófagos murinos**

A avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos foi realizada através da adição de 30µL de MTT a 5mg/mL em cada poço contendo 300 µL de meio de cultivo Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), pH 7,0, com macrófagos de exsudato peritoneal. Após o período de incubação de 3 horas o DMSO foi adicionado em porção de 1:1. As células foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 minutos a 4000 rpm ou 1400 g. Foi feita a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 570 nm.

### **3.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Para a observação dos trofozoítos e avaliação ultraestrutural experimentos com  $2 \times 10^4$  trofozoítos/mL foram incubados a 37°C por 72 horas, na presença e na ausência dos compostos (tabela 1). Após a incubação as células foram lavadas com PBS a 37°C em pH 7,2 e fixadas em 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 5% sacarose em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, em pH 7,2 por 2 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão e posteriormente, pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio no mesmo tampão, contendo 0,8% de ferricianeto de potássio (0,5 mL por amostra), por 30 minutos. Em seguida as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), repetindo-se a última concentração duas vezes. Posteriormente, as amostras foram infiltradas em resina 'polybed', nas diluições 3:1, 2:1 e, por último, 100% de resina por 24 horas cada uma. As amostras foram incubadas por 72 horas à 60°C para a polimerização da resina. Os blocos foram trimados para a ultramicrotomia e, em seguida, foram adquiridos cortes ultrafinos os quais foram coletados em grades limpas com ácido nítrico e lavadas com água. Posteriormente, contrastadas com citrato de chumbo e uranila 7%. Por último, as amostras foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109.

### **3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Para a observação das células e avaliação da ultraestrutura os experimentos foram realizados como supracitados, porém foram acrescentadas lamínulas redondas no fundo de cada poço. No tempo de 72 horas as células foram lavadas e fixadas em 2,5% glutaraldeído, 4% paraformaldeído, 5% sacarose em tampão de cacodilato de sódio a 0,1M, em pH 7,2 por 1 hora. Após este tempo, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M e pós-fixadas por 40 minutos com tetróxido de ósmio e ferricianeto. Em seguida, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona, de 30% até 100%, por 5 minutos em cada. Posteriormente, as amostras foram levadas ao aparelho de ponto crítico para retirar a acetona da

amostra e, posteriormente, metalizadas com ouro. Por fim, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6522.

### **3.9 Microscopia de fluorescência**

#### **3.9.1 Detecção de autofagia**

O processo autofágico foi detectado pelo uso da sonda fluorescente monodansilcadaverina (MDC), que é um marcador de vacúolos autofágicos. Para a realização deste teste, lamínulas foram colocadas nos poços para que houvesse a adesão dos trofozoítos ( $2 \times 10^4$ ) e, depois de diferentes tempos de interação com as substâncias  $50 \mu\text{M}$  da sonda MDC foram adicionados ao meio de cultura contendo as células na presença e na ausência das substâncias. Após 10 minutos de incubação com o marcador o meio de cultura foi removido e as lamínulas retiradas para a observação dos trofozoítos. Esta observação foi realizada em um microscópio de fluorescência Olympus BX51, onde foram obtidas micrografias com exposição de 0,15ms.

#### **3.9.2 Detecção de alterações nucleares**

Para a visualização de possíveis alterações nucleares a sonda 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) foi utilizada, pois esta é capaz de marcar o material genético. Contudo, para permitir a interação, a célula precisa estar permeabilizada. Portanto, as células foram cultivadas em lamínulas em diferentes tempos e posteriormente fixadas com metanol P.A. por 3 (três) minutos. Posteriormente,  $10 \mu\text{L}$  do marcador foram aplicados sobre as lamínulas, que, finalmente, foram levadas ao microscópio para serem analisadas em diferentes condições de luminosidade em um microscópio de fluorescência Olympus BX51 (com exposição de 0,05ms).

### 3.9.3 Detecção de espécies reativas oxidantes

#### 3.9.3.1 Sonda diclorodihidrofluorescina diacetato ( $H_2DCFDA$ )

Para a detecção de Espécies Reativas Oxidantes (ROS) foi utilizada a sonda diclorodihidrofluorescina diacetato ( $H_2DCFDA$ ). Esta sonda reage com radicais livres de maneira geral e emite fluorescência de cor verde. Para os ensaios, alíquotas de uma solução estoque foram aplicadas nos poços contendo PBS, atingindo a concentração final de  $0,4 \mu M$  e incubadas por 15 minutos a  $37^\circ C$  na ausência da luz. Posteriormente, os trofozoítos foram observados e micrografias foram obtidas num microscópio de fluorescência Olympus BX51 (SEN *et al.*, 2007).

#### 3.9.3.2 Sonda dihidroetidina (DHE)

Para a detecção de Espécies Reativas Oxidantes (ROS) foi utilizada a sonda dihidroetidina (DHE). Esta sonda reage com radicais livres de maneira geral e emite fluorescência de cor vermelha. Para os ensaios, alíquotas de uma solução estoque foram aplicadas nos poços, atingindo a concentração final de  $5 \mu M$  e incubadas por 15 minutos a  $37^\circ C$  na ausência da luz. Posteriormente, os trofozoítos foram observados e micrografias foram obtidas num microscópio de fluorescência Olympus BX51.

### 3.10 Quantificação de apoptose

Para quantificar a apoptose,  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *E. histolytica* foram cultivados em cinco condições: controle negativo; controle do solvente (DMSO); MII; MVI; MIX em concentrações de  $IC_{50}$  incubadas por 72 horas tais concentrações não produziram toxicidade para linfócitos humanos em concentrações mais altas. As células foram incubadas com  $1 \mu L$  iodeto de propídio (IP) e  $2 \mu L$  anexina V-FITC por 10 (dez) minutos. As células foram analisadas pelo 'FACscan' utilizando o 'software Cellquest'. A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de expressão de anexina, após exclusão das células IP positivas.

### **3.11 Método estatístico**

Para a verificação de significância no crescimento celular foi utilizado o teste estatístico 'ANOVA' com pós-teste de comparação múltipla de Tukey, com o auxílio do 'software' "GraphPad Prism 5.0".

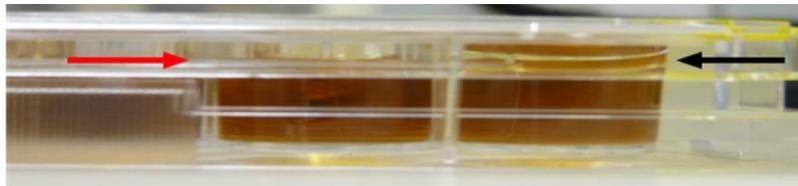
## 4 Resultados

### 4.1 Avaliação dos ensaios em placas de 24 poços

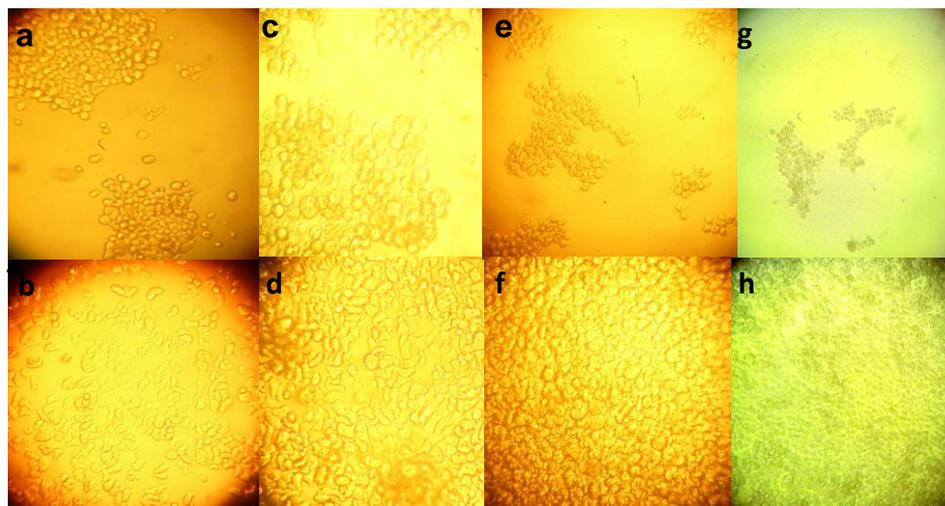
Nos testes de cultivos em placas a presença ou ausência de uma monocamada de óleo mineral (figura 3) foi avaliada indiretamente sendo sua eficácia diretamente proporcional à multiplicação dos trofozoítos. Nestes experimentos, com a monocamada de óleo mineral sobre o meio de cultura foi observado que os trofozoítos de *E. histolytica* se multiplicavam nas placas, enquanto o oposto acontecia sem o óleo mineral ou nas placas onde a camada de óleo não formava uma camada íntegra sobre o meio de cultura, não vedando completamente o poço, como ocorre com volumes de 500µL de óleo mineral ou menores. Além disso, nestes poços foi observada formação de gotículas de água na tampa da placa e concentração de células em 'ilhas' nos tempos iniciais e, posteriormente, que reduziram sua presença para as regiões das bordas dos poços. A morfologia dos trofozoítos, nestas condições, estava alterada, estando estes arredondados e com pouca movimentação (figura 4).

Com a variação do volume do meio de cultura para 1,5mL pode-se observar que os volumes dos inoculos celulares eram diminutos e os parasitos apresentaram redução da velocidade de proliferação. Enquanto que com 2,5mL não foi possível vedar o poço com o óleo mineral e como citado anteriormente este fator, também, se mostrou importante para o crescimento dos parasitos. Em contrapartida nos poços onde os trofozoítos puderam crescer satisfatoriamente foi necessária a aplicação de pelo menos 700 µL de óleo mineral estéril sobre cada poço ou o suficiente para formar uma monocamada. Ainda assim, para comprovar a eficácia do óleo mineral a diferença do volume final dos poços com e sem óleo mineral foi testada, adicionando 700 µL de meio de cultura nos poços sem óleo e os parasitos proliferaram apenas nos poços com o óleo mineral. Nestas condições pode-se alcançar concentrações celulares semelhantes as do cultivo em tubos (figura 5). Foi observado também que os poços onde não havia a monocamada de óleo mineral os trofozoítos apresentaram fluorescência intensa para ROS pela sonda DHE (figura 6), além disso foi possível perceber que a viabilidade destes parasitos também estava

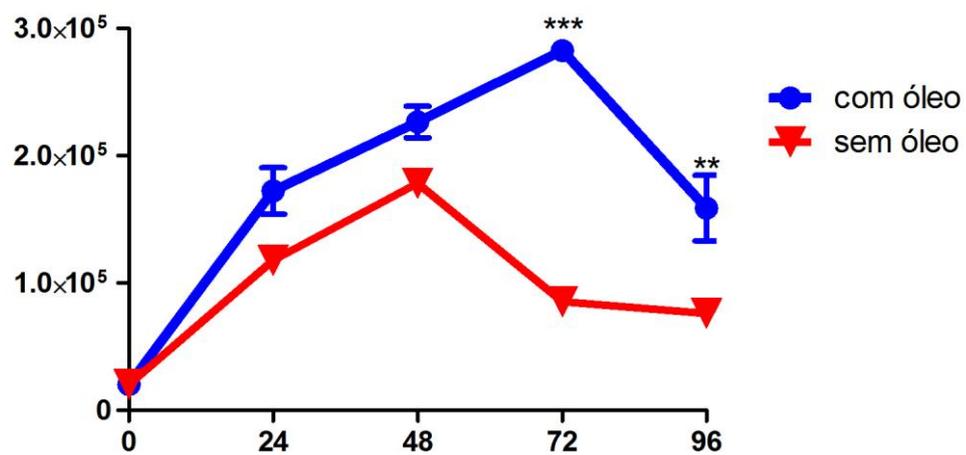
alteradas, com alto percentual de células marcadas com azul trypan e sem aderência (figura 7).



**Figura 3:** placa de 24 poços contendo meio de cultura. Seta vermelha indicando poço sem óleo. Seta preta indicando a camada de óleo mineral.



**Figura 4:** micrografias de poços, sem (a, c, e e g) e com (b, d, f e h) óleo mineral, incubados por 24 (a,b), 48 (c,d), 72 (e,f) e 96 horas (g,h).



**Figura 5:** Curvas de proliferação dos trofozoítos de *E. histolytica* na presença (azul) e ausência (vermelho) de óleo mineral. Sendo, o resultado estatisticamente significativo em 72 e 96 horas, pelo método ANOVA com pós-teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,0001$ ).

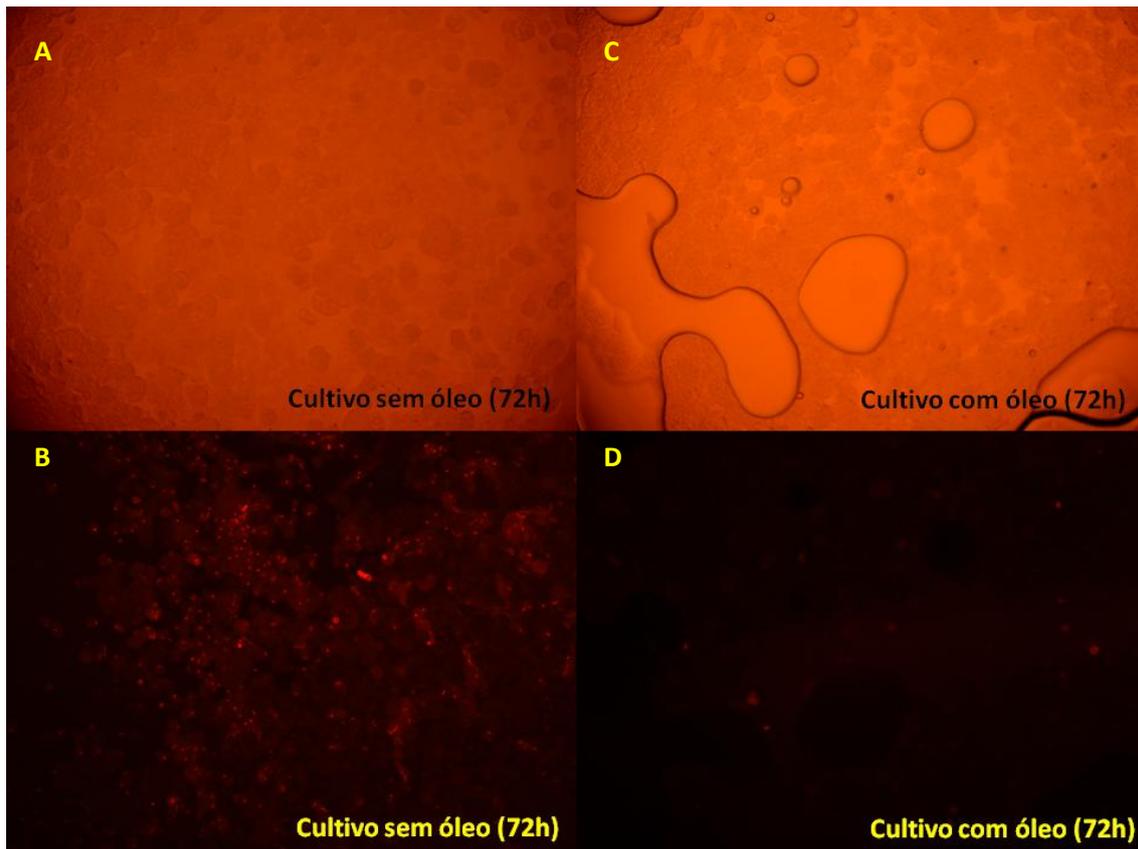


Figura 6: Micrografias de culturas de trofozoítos de *E. histolytica* na presença e ausência de óleo mineral, no aumento de 20x, com 72 horas de incubação. A) Micrografia, em campo claro, da cultura sem óleo mineral. B) Micrografia, em fluorescência, da cultura sem óleo mineral evidenciando a presença de ROS pela sonda DHE. C) Micrografia, em campo claro, da cultura com óleo mineral. D) Micrografia, em fluorescência, da cultura com óleo mineral evidenciando a ausência de ROS.

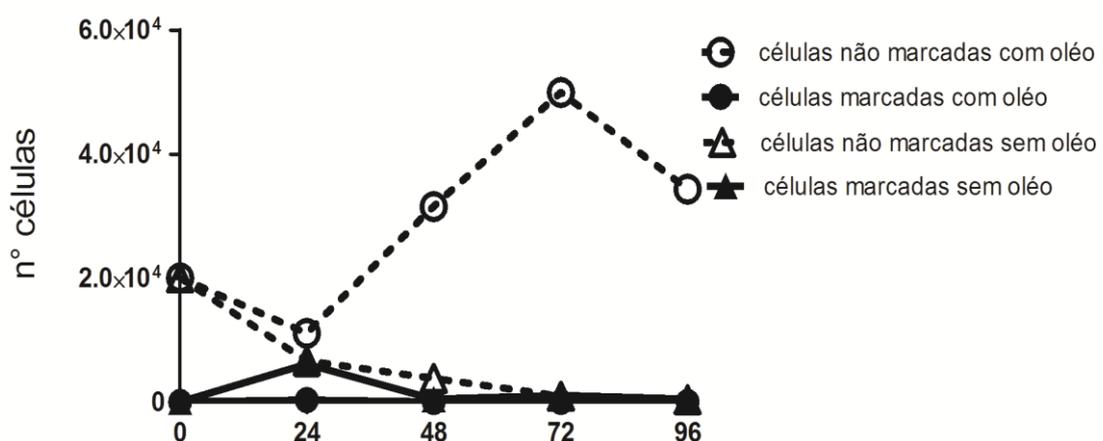
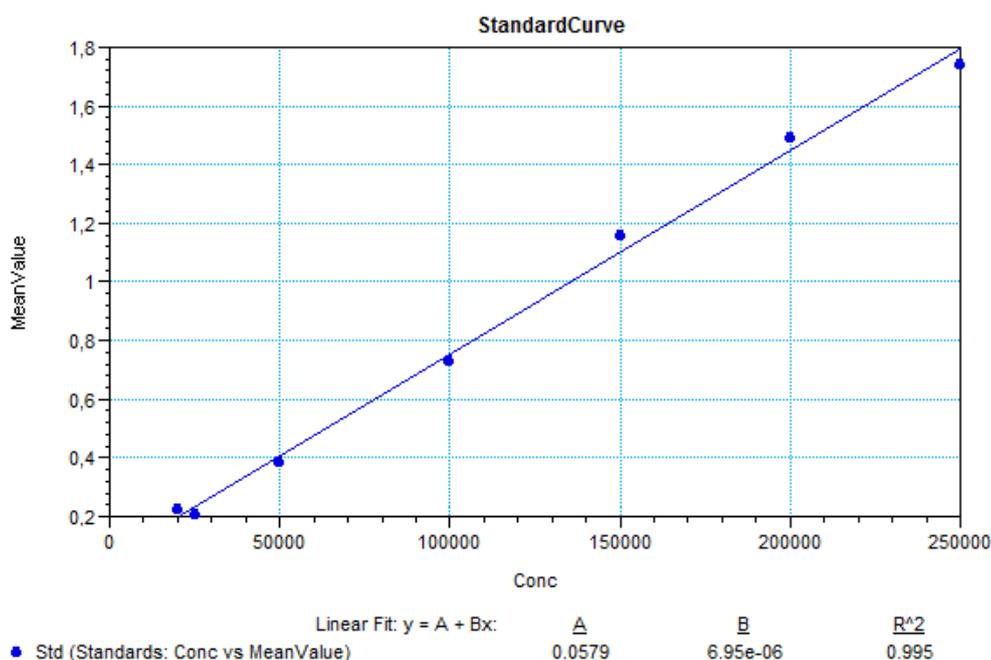


Figura 7: Curva de crescimento de trofozoítos de *E. histolytica* na presença e ausência de óleo mineral. Na condição com óleo pode-se observar um aumento da proliferação deste parasito com baixo percentual de células marcadas pelo azul trypan. Contudo, nos poços sem o óleo mineral não há proliferação e a concentração de trofozoítos ao longo do tempo reduz.

## 4.2 Padronização do teste colorimétrico

Ao final dos testes seguindo três metodologias apenas uma delas apresentou um resultado positivo e satisfatório. A técnica com o alamar blue® foi insatisfatória, pois além de exigir 6 horas de incubação a utilização de tampões para lavar o meio YI prejudicou a obtenção dos resultados. Por sua vez o método de oxirredução do MTT também se apresentou insatisfatório uma vez que seu produto, o formazam, demonstrou afinidade pelo óleo o que também dificultou a leitura, alterando os resultados.

O ensaio com azul de metileno se mostrou rápido, fácil e confiável para vários tipos celulares apresentando, também, alta de correlação nos testes linearidade (figura 8) e no teste de inibição com o metronidazol (figura 9) esta metodologia apresentou-se aplicável.



**Figura 8:** Gráfico de correlação linear entre absorvância a 655 nm e número de trofozoítos de *E. histolytica* demonstrando que o aumento da concentração de trofozoítos no poço é proporcional ao aumento da leitura da absorvância a 655 nm.

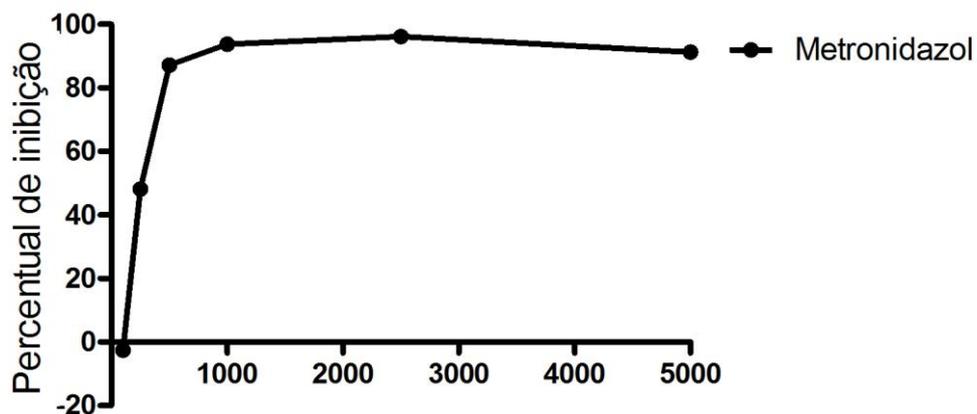
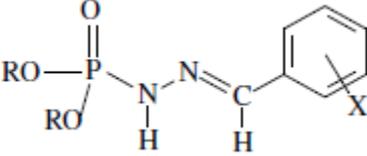
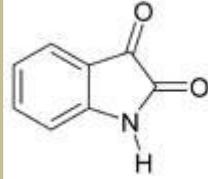
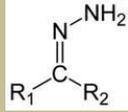
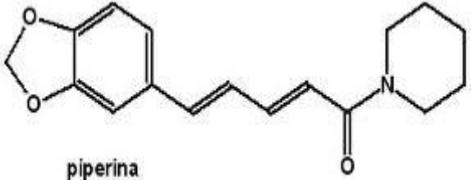


Figura 9: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* expostos ao metronidazol por 72 horas, utilizando o método colorimétrico com azul de metileno.

### 4.3 Triagem das substâncias

Das 74 substâncias testadas inicialmente 13 apresentaram atividade amebicida superior a 70% (tabela I). Entre estas estão as TPBs (19, 27 e 33), a ANBLAPSULF, a NOR-BT, as Ms (2, 6 e 9), BT-OX, piperina, solasodina, curcumina e a  $\alpha$ -lapachona apresentam efeitos inibitórios da proliferação/sobrevivência de *E. histolytica*, com inibição satisfatória em relação aos controles (tabela 1).

Tabela I: Inibição determinada em relação aos controles com até 0,06% de DMSO, após 72 horas de cultivo com 50 µM de cada composto.

	GRUPOS	SUBSTÂNCIAS	ESTRUTURAS *	INIBIÇÃO (%)
SUBSTÂNCIAS NATURAIS		SOLASODINA		94,40
		CURCUMINA		80,80
		α-lapachona		95,37
		β-lapachona		-2,36
		PIPERINA		78,40
SUBSTÂNCIAS SEMI-SINTÉTICAS	derivados de diisobutil-fosforilidrazonas	AN28		-53,11
		AN29		34,28
		AN31		17,36
		AN35		26,01
		AN40		19,11
		AN43		15,22
	derivados de isatina	L1		3,20
		L3		-1,63
		L5		13,99
		L6		-5,65
		L27		0,08
		L28		0,32
		L40		69,19
		L60		-64,48
	derivados de fosforamidatos	R54		-5,69
		R46		-1,00
		R39		-6,03
		R43		-4,68
		R58		-7,06
		R88		5,85
	Hidrazona	ANDIETMNO		-5,50
	mesoiônicos derivados de piperina	MI	 <p>piperina</p>	6.87
		MII		93.32
		MIII		-1.09
		MIV		-4.30
		MV		-5.06
		MVI		87.30
MVII		-4.07		
MVIII		-3.80		
MIX		86.40		

	Amidas	RAC14		44,68
		RAC15		29,74
		RAC16		61,70
	derivados de lapachol	TPB27		98,29
		TPB33		100,00
		TPB19		100,00
		ANACILIDRAZ		6,70
		ANDIETPNO		31,80
		ANDIETPCX		21,50
		ANPHZCF		12,70
		ANDIETBZ		26,20
		ANDIETBLAP		18,06
		ANLAPMET		41,70
		ANBLAPSULF		83,30
		ANISOBB		44,20
		DDMBL		45,60
		BT-OX		72,70
		BLA		48,80
		BLDT		16,20
		BLB		46,20
		BT-IMD		42,40
		BPR		24,10
		NOR-BT	94,23	
		AF-OX	13,41	
		ALIN	3,52	
		AF-BZ	2,80	
		OL-BZ	1,41	
		MT-DN	-0,86	
		M-EST	-0,81	
OL-SCZ	-7,42			
M-AC-L2	0,83			
SUBTÂNCIAS SINTÉTICAS	Heterocíclicos	503		0,94
		504		-3,21
		507		-0,83
		601		-2,42
		606		-3,83
		607		10,31
		Ditil-SC		-25,95

\*ESTRUTURAS DAS CLASSES

#### 4.4 Determinação de IC<sub>50</sub> das substâncias selecionadas

Das 13 candidatas apenas três, as M II, M VI e M IX, tiveram suas respectivas IC<sub>50</sub> determinadas, para tal determinação o ‘software’ “GraphPad Prism 5” foi utilizado. Os valores de IC<sub>50</sub> foram de 20,0, 39,9 e 16,6 μM para a M II (figura 10), M VI (figura 11) e M IX (figura 12), respectivamente. As demais substâncias testadas ainda não tiveram seus valores de IC<sub>50</sub> determinados, uma vez que estes estudos ainda estão em andamento.

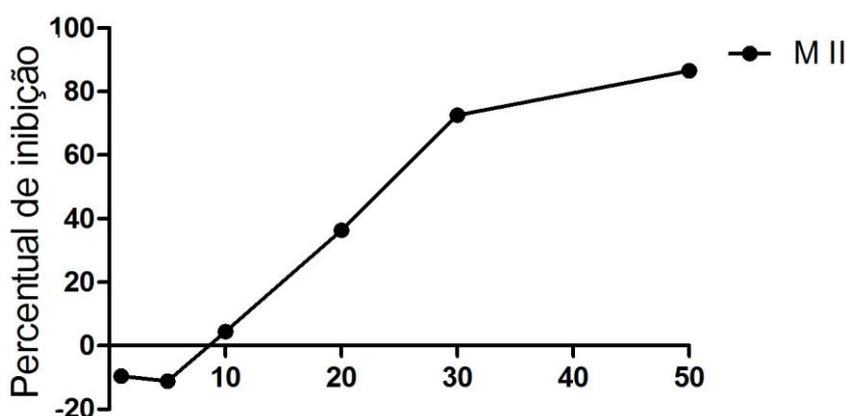


Figura 10: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M II por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma IC<sub>50</sub> 20μM.

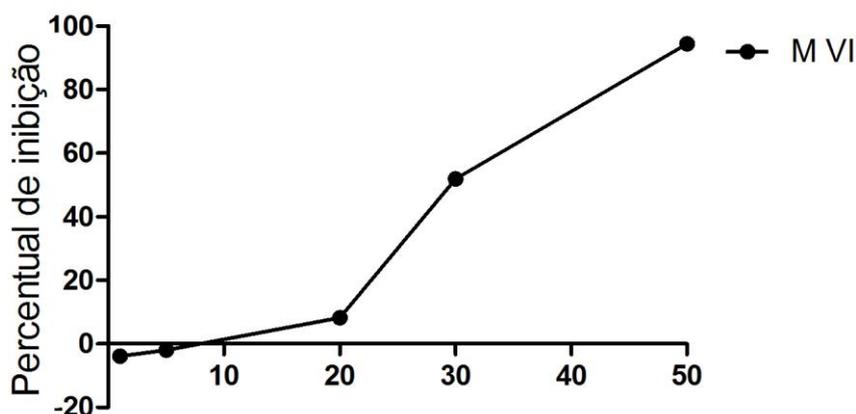


Figura 11: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M VI por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma IC<sub>50</sub> 29,9μM.

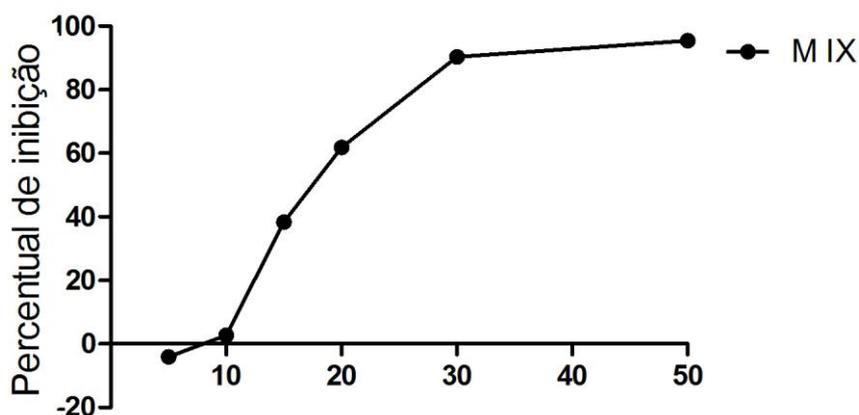


Figura 12: Percentual de inibição da proliferação de trofozoítos de *E. histolytica* exposta à M IX por 72 horas utilizando o método colorimétrico com azul de metileno. Onde a M II apresentou uma  $IC_{50}$  16,6  $\mu$ M.

#### 4.5 Avaliação da citotoxicidade em células murina

A mensuração da função mitocondrial acessada pela atividade desidrogenase foi realizada no intuito de avaliar a citotoxicidade, em macrófagos peritoneais de camundongos, das substâncias que apresentaram-se amebicidas. Para tanto, foram utilizadas a solasodina, nas concentrações de 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, das 'TPB's (19, 27 e 33), nas concentrações de 25 $\mu$ M e 50 $\mu$ M, e das 'M's (MII, MVI e MIX), nas concentrações de 250 $\mu$ M e 500 $\mu$ M (figuras 13, 14, 15 e 16). Os resultados demonstraram que não há citotoxicidade nas concentrações testadas.

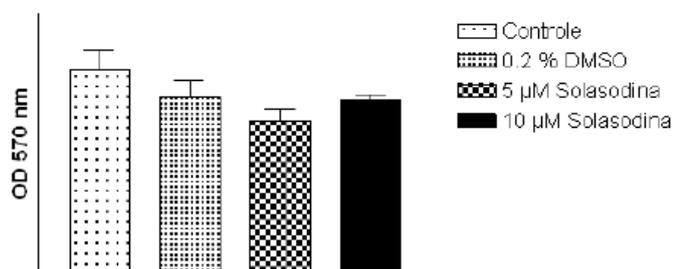
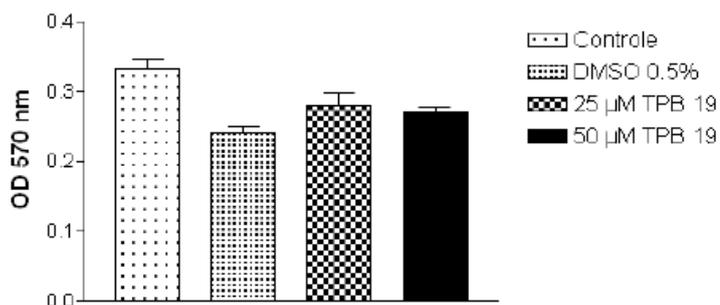
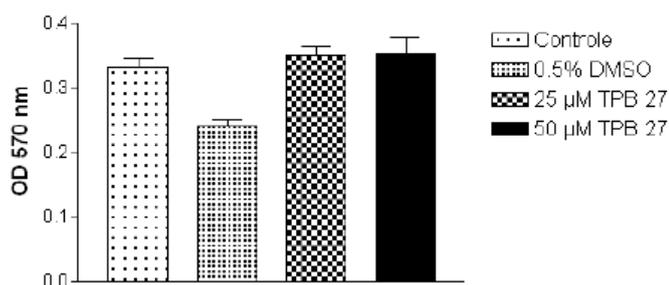


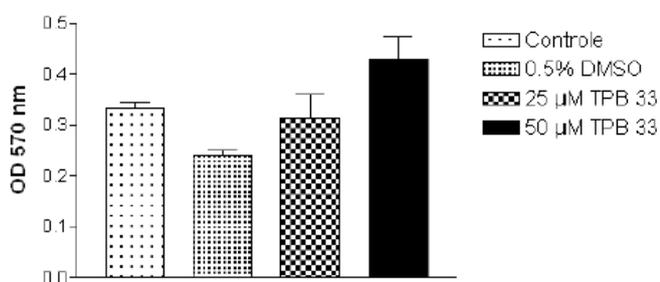
Figura 13: Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a solasodina, nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ M por 24 horas, a 37°C.



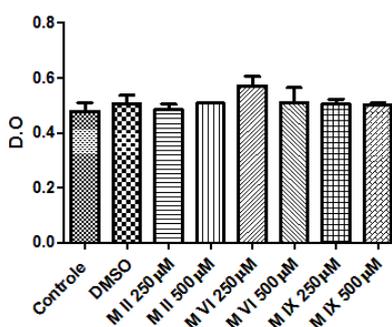
**Figura 14:** Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 19, nas concentrações de 25 e 50 µM por 24 horas, a 37°C.



**Figura 15:** Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 27, nas concentrações de 25 e 50 µM por 24 horas, a 37°C.



**Figura 16:** Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem a TPB 33, nas concentrações de 25 e 50 µM por 24 horas, a 37°C.



**Figura 17:** Teste de citotoxicidade realizado pelo método do MTT com leitura em 570 nm, utilizado macrófagos de camundongo incubados com e sem as M II, M VI e MIX nas concentrações de 250 e 500 µM por 24 horas, a 37°C.

#### **4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Os trofozoítos de *E. histolytica* são altamente pleomórficos, têm um diâmetro que pode variar de 10-60  $\mu\text{m}$ , emitem pseudopodos em diferentes direções e apresentam membrana plasmática rugosa (figura 18). Por apresentarem estas características amorfas e dinâmicas, fisiologicamente, os trofozoítos observados no controle se assemelham aos trofozoítos tratados com as M's (M II, MVI e M IX) (figura 18), contudo, nos trofozoítos tratados com M VI pode-se observar a presença de estruturas semelhantes à corpos apoptóticos (figura 19).

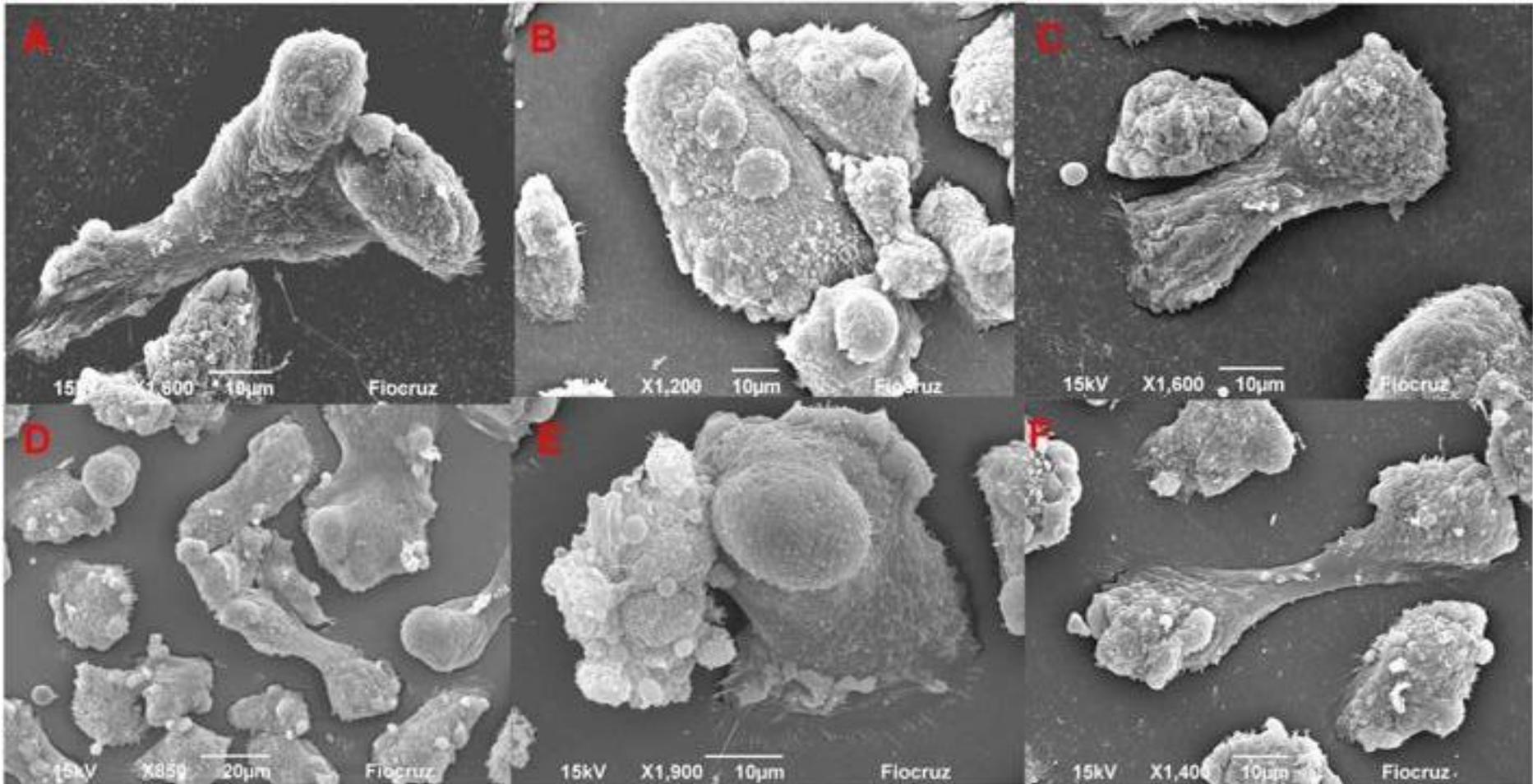
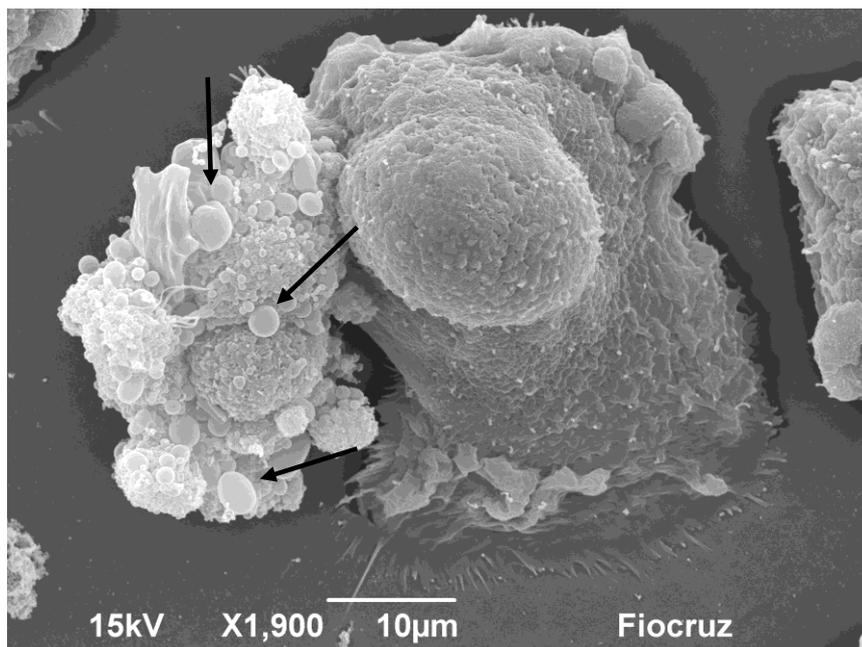


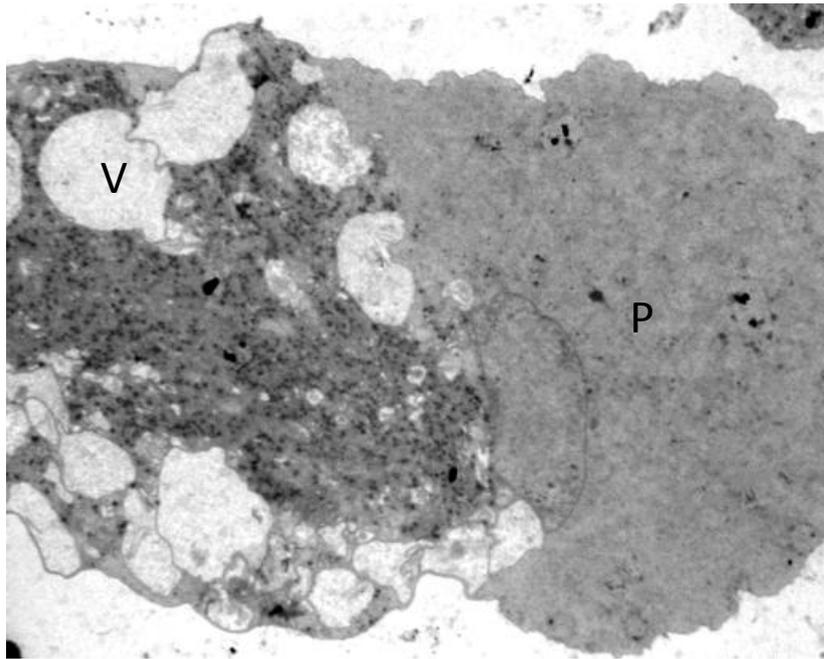
Figura 18: Micrografias Eletrônicas de Varredura de trofozoítos de *E. histolytica* incubados com M II (D), M VI (E) e M IX (F), em suas respectivas  $IC_{50}$ , e controle (sem qualquer composto potencialmente amebicida, em A-C) por 72 horas, a 37°C. Micrografias evidenciam o pleomorfismo dos trofozoítos, com emissão de pseudópodos em diferentes direções, além da irregularidade da superfície da membrana plasmática.



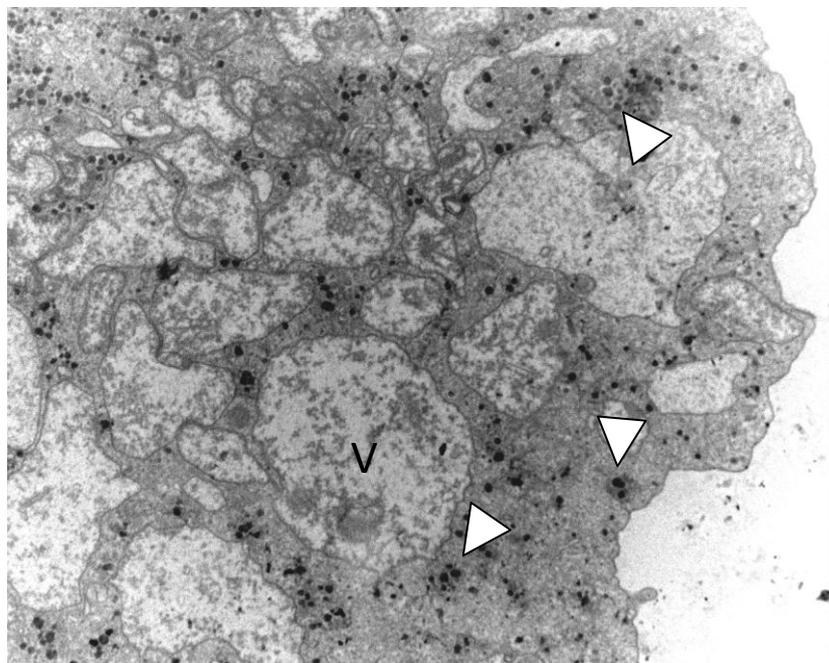
**Figura 19:** Detalhe da micrografia 28E mostrando trofozoítos de *E. histolytica* incubados com MVI, na IC<sub>50</sub> (30µM) durante 72 horas, a 37°C. À direita aparece trofozoíto sem alteração e à esquerda célula com muitas protrusões ou 'blebs', semelhante a corpos apoptóticos (setas).

#### 4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

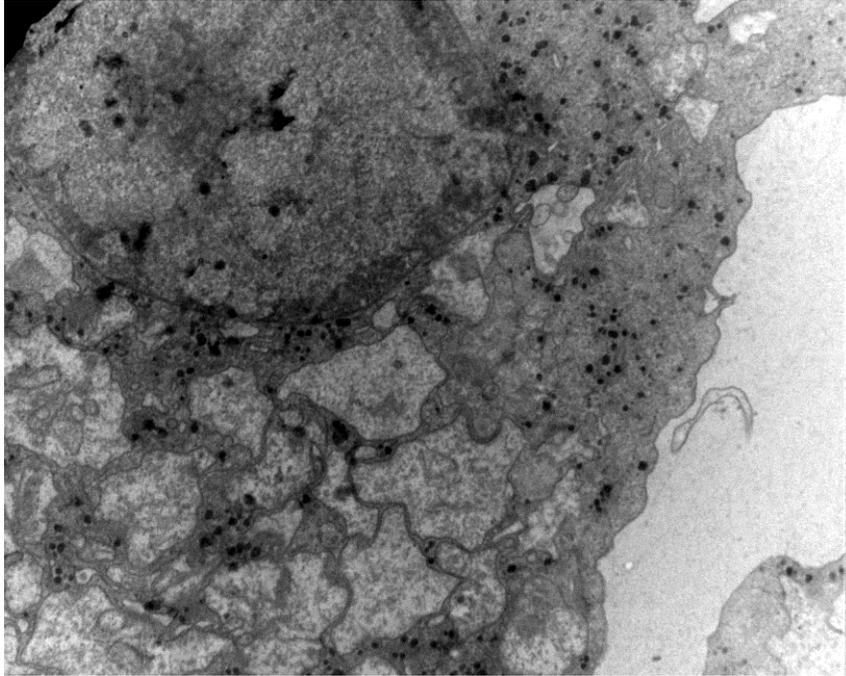
Na microscopia eletrônica de transmissão pode-se observar, nos poços do controle, trofozoítos emitindo pseudópodos (figura 20) com vesículas grandes e numerosas, grânulos de glicogênio (figura 21) e o núcleo apresentando uma condensação da cromatina nas regiões adjacentes ao envelope nuclear e no centro do mesmo, formando uma imagem semelhante a 'roda de uma carroça' (figura 22). Quando os trofozoítos são incubados com a M VI, por 72 horas, na concentração de 29,9 µM, a 37°C, existe uma mudança no padrão ultraestrutural. Neste caso, pode-se observar estruturas que sugerem a fusão de vesículas (figura 23), figuras de mielina (figura 24), além de alterações na estrutura nuclear, com pequenos focos de cromatina hiperdensa e com o restante da mesma hipodensa (figura 25).



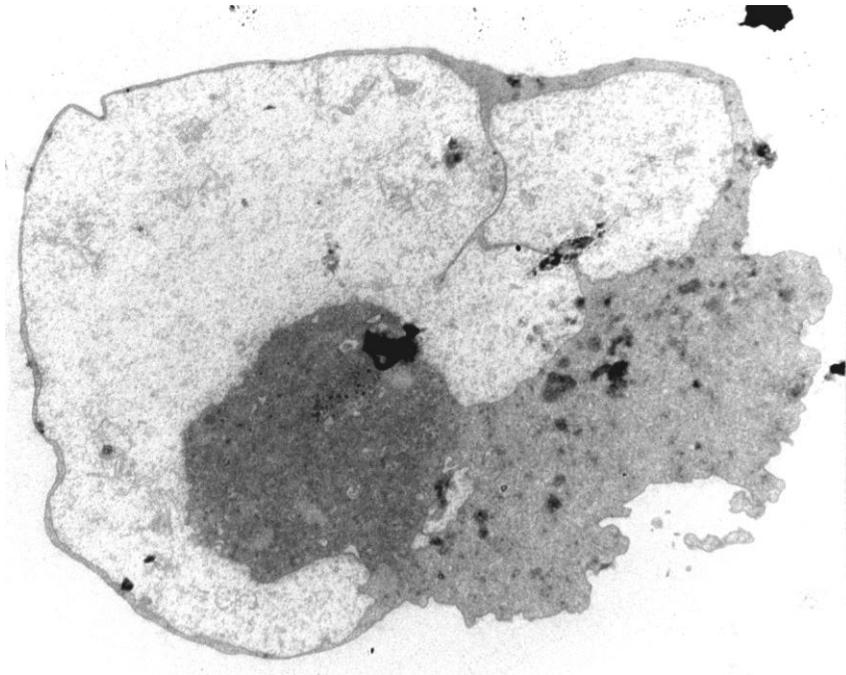
**Figura 20:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando numerosas vesículas (V), presença de grânulos de glicogênio e formação do pseudópodo (P).



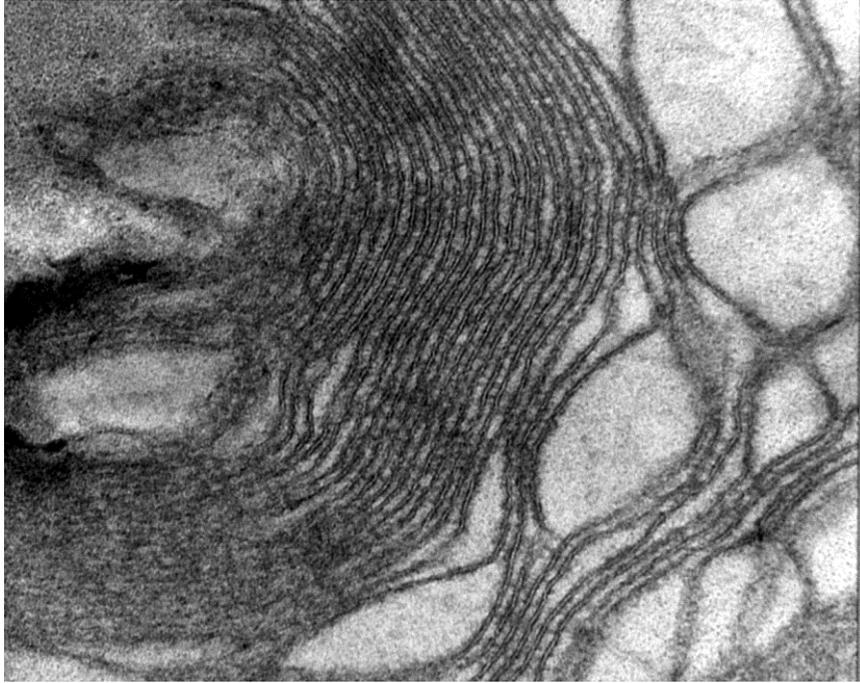
**Figura 21:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando numerosas vesículas (V), presença de grânulos de glicogênio (setas).



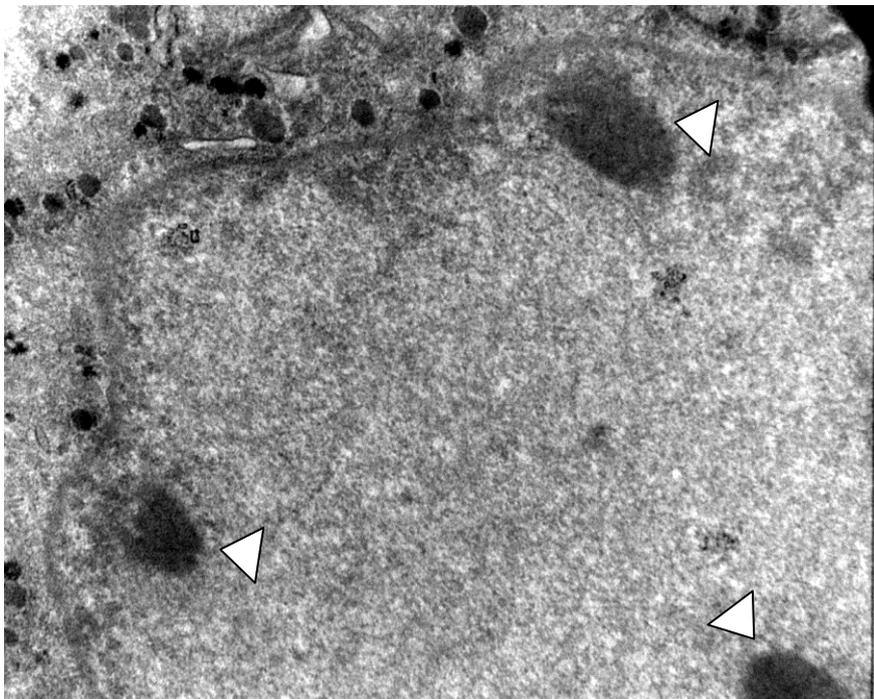
**Figura 22:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* controle incubados por 72 horas a 37°C, evidenciando o núcleo e conformação da cromatina, com regiões hiperdensas na periferia e zona central do núcleo.



**Figura 23:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* incubados com composto M VI, na concentração de 29,9  $\mu\text{M}$ , por 72 horas a 37°C, evidenciando fusão de vesículas e material intra-vesicular aparentemente degradado.



**Figura 24:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* incubados com composto M VI, na concentração de 29,9  $\mu$ M, por 72 horas a 37°C, evidenciando figura de mielina, vesículas apresentando extensas áreas membranosas.

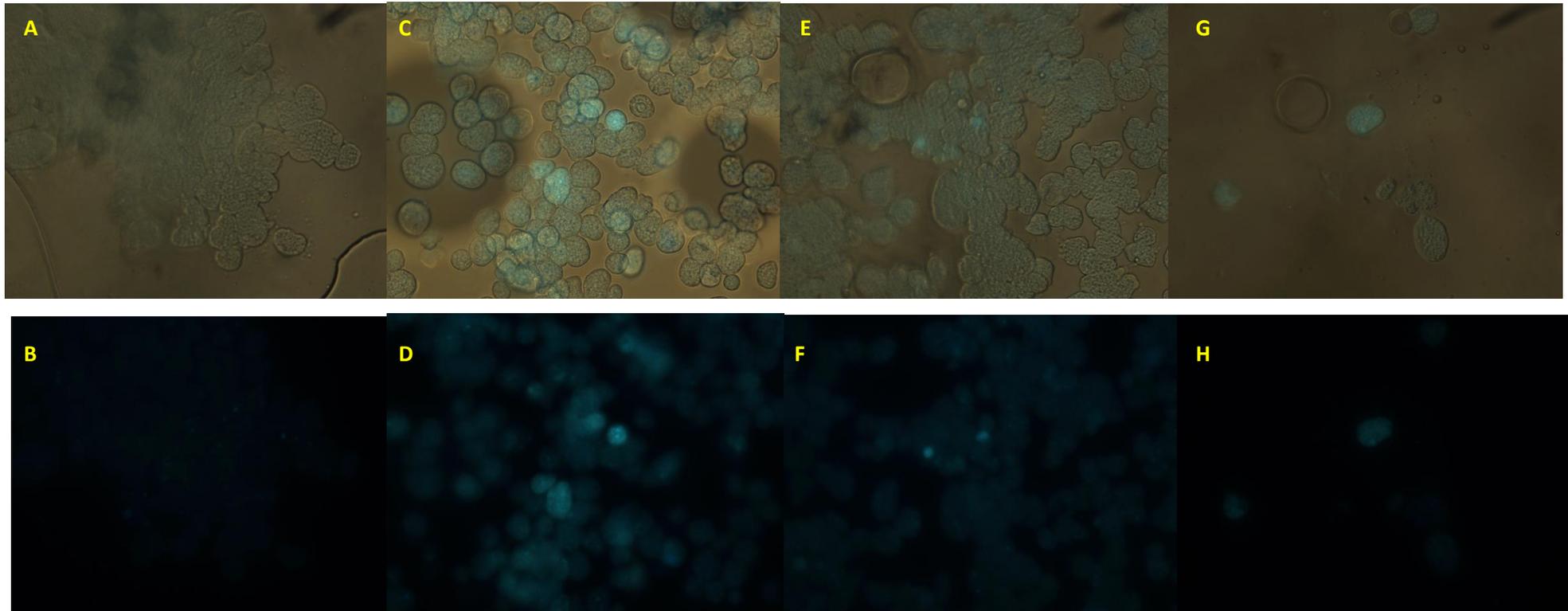


**Figura 25:** Micrografia eletrônica de transmissão de trofozoíto de *E. histolytica* incubados com composto M VI, na concentração de 29,9  $\mu$ M, por 72 horas a 37°C, evidenciando o núcleo e a cromatina, apresentando configuração distinta do controle, apresentando concreções de cromatina densa (setas).

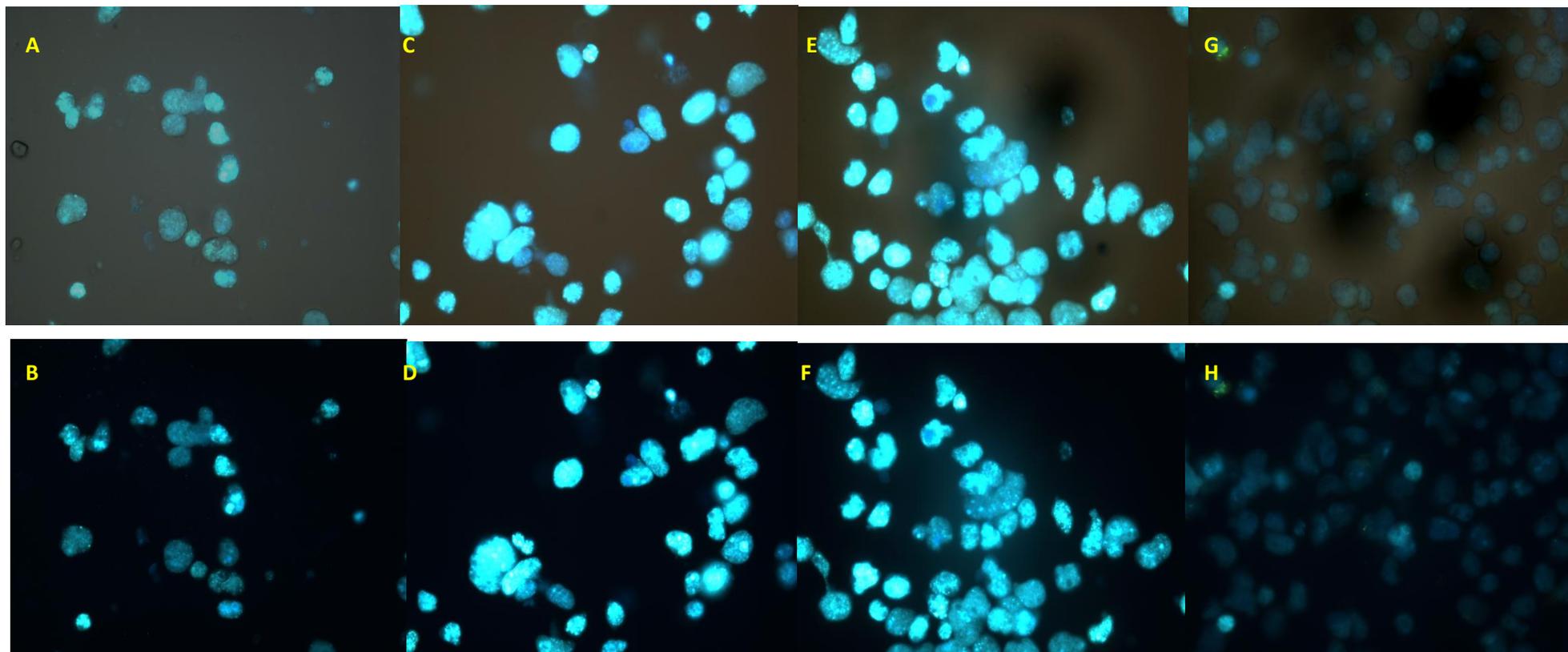
## **4.8 Microscopia de fluorescência**

### **4.8.1 Detecção de autofagia**

Devido à observação de figuras de mielina, sugestiva de vacúolos autofágicos nas células tratadas, um segundo ensaio para verificar a ocorrência de autofagia fez-se necessário. Para tanto, as células foram tratadas nas mesmas condições e foi aplicada a sonda fluorescente monodancilcadaverina (MDC) em cada amostra (VÁZQUEZ & COLOMBO, 2009). A fluorescência foi melhor evidenciada em presença de MII e MVI (figuras 26 e 27). O tempo de incubação com as substâncias selecionadas também foi importante para a marcação e a obtenção da fluorescência de modo que a emissão do marcador foi melhor evidenciada à medida em que a substância permanecia em contato com as células por mais tempo. No entanto, mesmo com um tempo de incubação de 72 horas, a M IX não apresentou marcação significativa em relação ao controle (figuras 27).



**Figura 26:** Micrografia de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas, a 37°C na presença ou ausência de compostos, e posteriormente incubados com a sonda MDC, por 10 minutos. Observam-se células negativas para a marcação com a sonda MDC no controle (A e B). Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20 μM de M II, observa-se marcação difusa (C e D) nas células tratadas para a sonda MDC. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9 μM de M VI, observa-se marcação difusa nas células tratadas para a sonda MDC. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6 μM de M IX, observa-se marcação difusa nas células tratadas para sonda MDC. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.

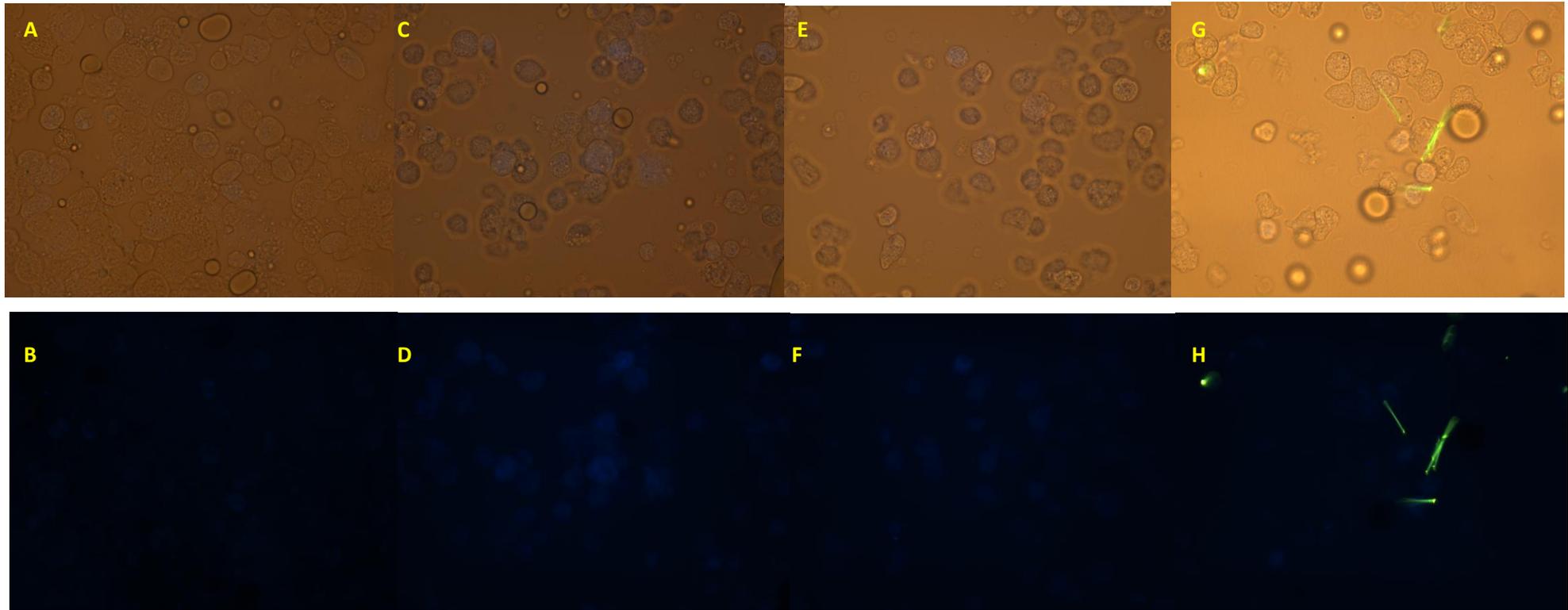


**Figura 27:** Micrografia de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 72 horas, a 37°C na presença ou ausência de compostos, e posteriormente incubados com a sonda MDC, por 10 minutos. Observam-se células negativas para a marcação com a sonda MDC no controle (A e B). Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20 μM de M II, observa-se marcação intensa (C e D) nas células tratadas para a sonda MDC. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9 μM de M VI, observa-se marcação intensa nas células tratadas para a sonda MDC. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6 μM de M IX, observa-se marcação difusa nas células tratadas para sonda MDC. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.

#### 4.8.2 Integridade da membrana

Foi empregada a sonda fluorescente 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), amplamente utilizada na detecção de material genético. Esta sonda liga-se tanto a DNA quanto a RNA, contudo ela não é capaz de ultrapassar membranas íntegras.

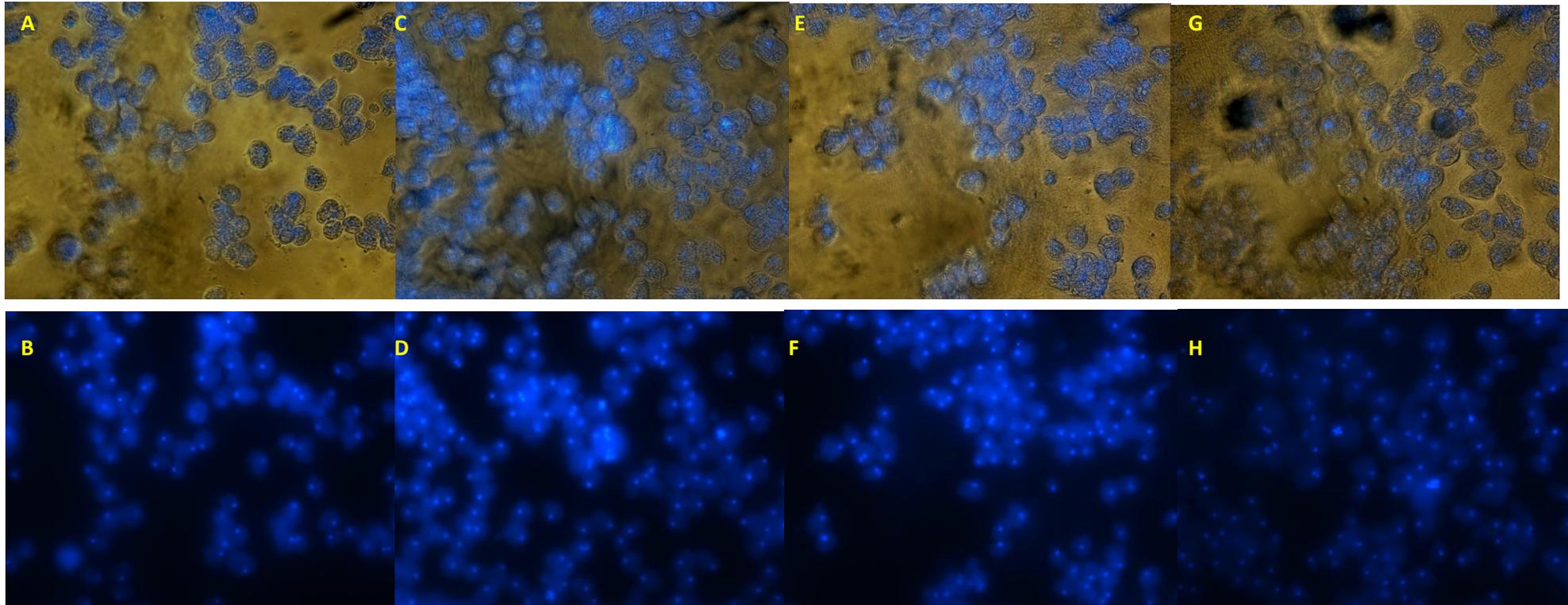
No primeiro experimento utilizando a sonda fluorescente DAPI pôde-se perceber que não houve danos na membrana dos trofozoítos, pois em nenhuma condição houve a marcação do material genético (figuras 28). Mas nenhuma alteração nuclear e/ou no material genético pode ser excluída neste experimento, já que não houve marcação pela sonda. O azul trypan também foi utilizado para verificar a integridade da membrana e o resultado observado foi o mesmo que o anterior.



**Figura 28:** Micrografia de trofozoítos de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas na presença e ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda DAPI. Observa-se ausência de fluorescência nas células incubadas com DAPI tanto no controle quanto, respectivamente, nos tratamentos com 20µM de M II (C e D), 29,9µM de M VI (E e F) e 16,6µM de M IX (G e H). (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.

#### 4.8.3 Detecção de alterações nucleares

Em um segundo grupo de ensaios, tendo em vista os resultados do anterior, as células foram fixadas com metanol P.A. para que suas membranas fossem permeabilizadas e a sonda pudesse marcar cromatina (figura 29). Observando as células marcadas com o DAPI, pode-se notar um aumento na quantidade de núcleos nos trofozoítos tratados (figura 29) em relação aos trofozoítos controle (figura 29A e 29B), sendo encontradas células multinucleadas, algumas com mais de 6 núcleos (figuras 29).

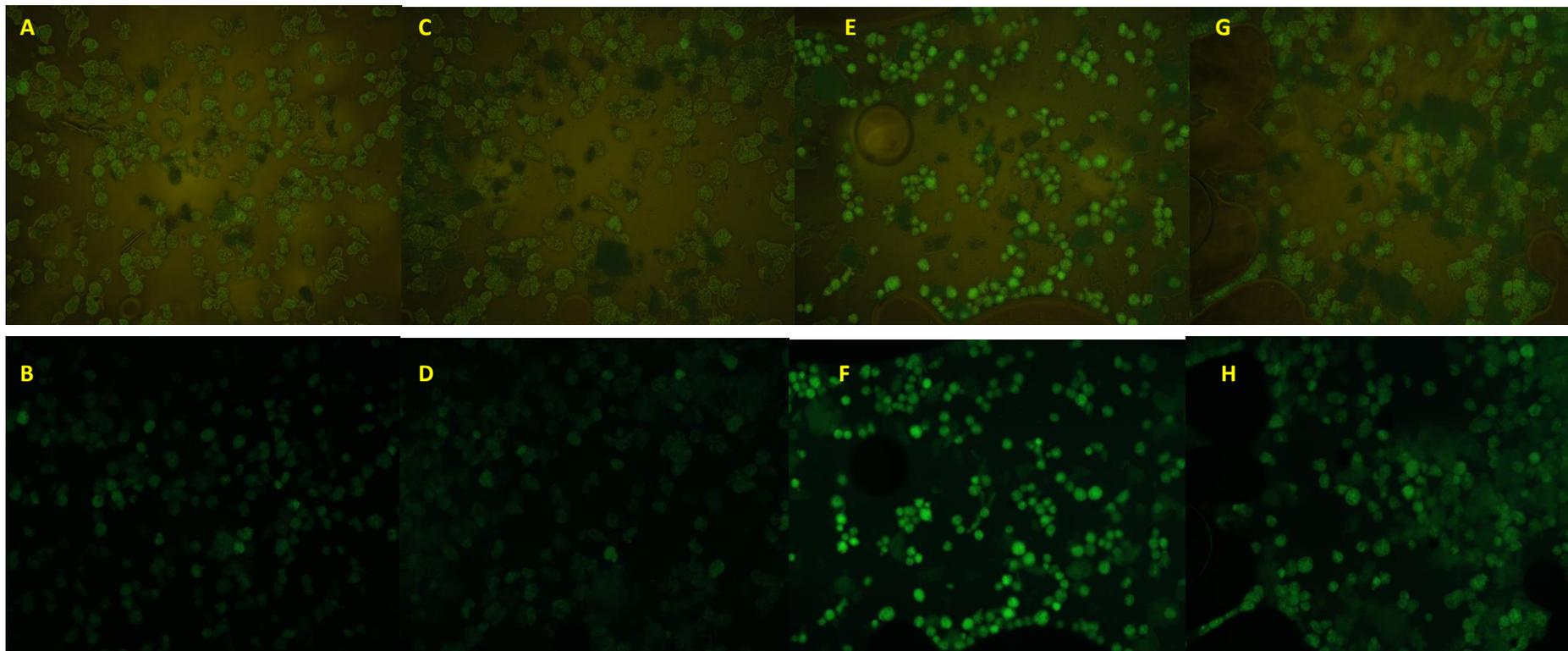


**Figura 29:** Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubado por 24 horas na presença e ausência de compostos, a 37°C e posteriormente fixadas com metanol e incubados, com a sonda DAPI. (A e B) Observa-se fluorescência dos núcleos das células do controle incubadas com DAPI, onde cada célula apresenta um núcleo. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, em um aumento de 20x, incubados com 20μM de M II, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (E e F) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9μM de M VI, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6μM de M IX, observa-se fluorescência dos núcleos das células incubadas com DAPI, onde a relação núcleo/célula apresenta-se alterada. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.

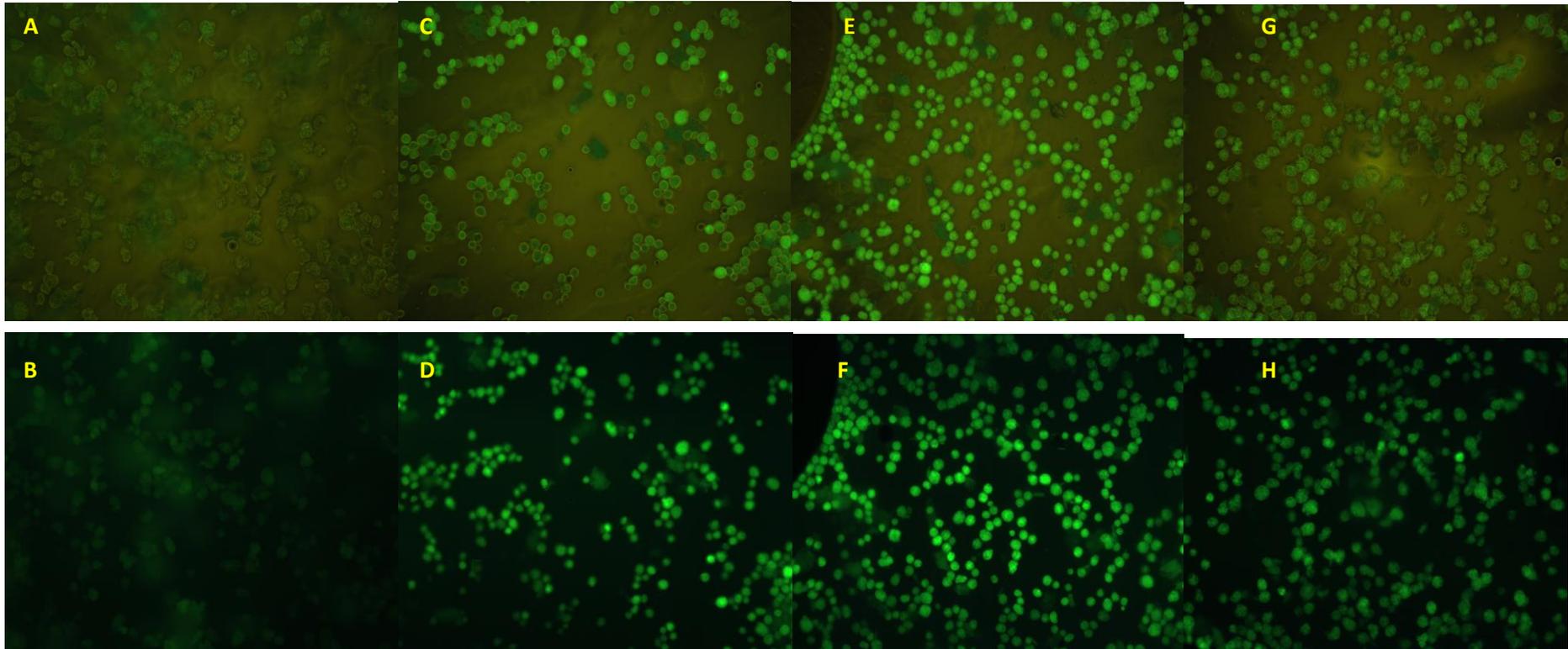
#### 4.8.4 Detecção de espécies reativas oxidativas

A utilização da sonda diclorodihidrofluorescina diacetato ( $H_2DCFDA$ ) apontou um possível aumento na produção de espécies reativas oxidativas (ROS). Como pode ser observado nas micrografias, na medida em que o tempo de incubação com as substâncias aumenta os níveis de ROS observados também se elevam. Todavia, o aumento destas espécies reativas não é equivalente para todas as três substâncias. Sendo assim, no tempo de 60 minutos apenas a MVI e a MIX apresentaram fluorescência superior à fluorescência emitida pelo controle, entretanto apenas a MVI promoveu uma emissão aparentemente significativa com este tempo (figura 30).

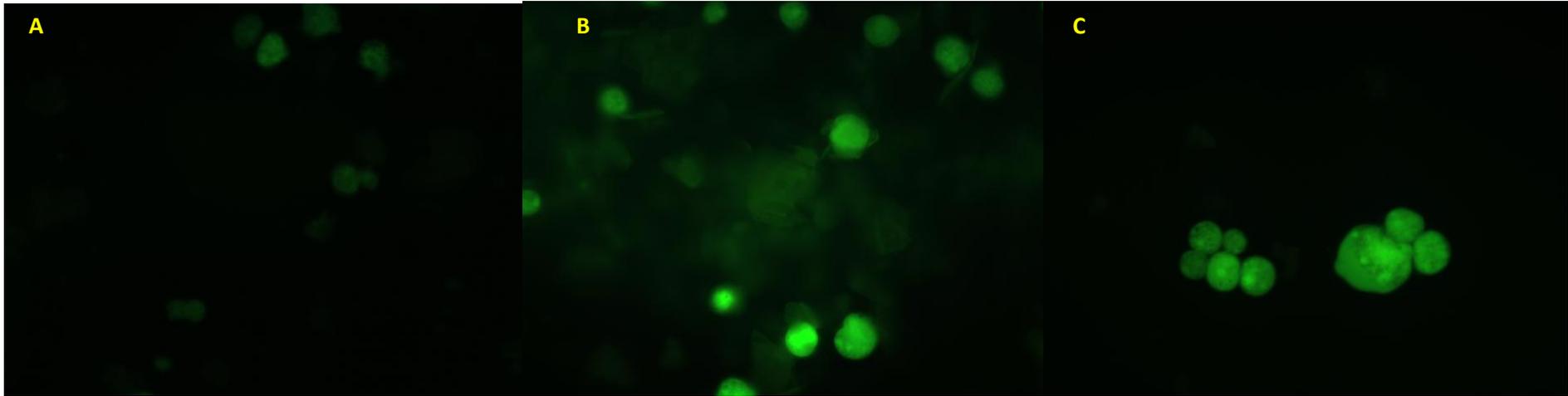
No tempo de 3 horas a emissão de fluorescência foi relativamente maior que a emissão das células controle, bem como das células tratadas, por tempos mais curtos. Este aumento pode evidenciar o avanço/progressão de um possível estresse oxidativo que pode estar associado a um processo autofágico (figura 31). Dados preliminares indicam que com 9 (nove) horas de incubação com as substâncias teste existe marcação para ROS significativamente aumentada.



**Figura30:** Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 10x, incubado por 1 hora na presença ou ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A e B) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20μM de M II, observa-se fluorescência de fundo. (E e F). Em de trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9μM de M VI, observa-se fluorescência positiva. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6μM de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.



**Figura31:** Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 10x, incubado por 3 hora na presença ou ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A e B) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (C e D) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20μM de M II, observa-se fluorescência de fundo. (E e F). Em de trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 29,9μM de M VI, observa-se fluorescência positiva. (G e H) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6μM de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, C, E e G) Overlay. (B, D, F e H) Fluorescência.



**Figura 32:** Micrografia de trofozoítos controle de *E. histolytica*, em um aumento de 40x,, por 9 horas na presença e ausência dos compostos, a 37°C e posteriormente incubados, com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. (A) Observa-se fluorescência pouca intensidade nas células do controle. (B) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 20μM de M II, observa-se fluorescência de fundo. (C) Em trofozoítos de *E. histolytica*, incubados com 16,6μM de M IX, observa-se fluorescência positiva. (A, B e C) Overlay.

#### 4.9 Quantificação de apoptose por citometria de fluxo

A anexina V é um marcador específico de apoptose e é comumente utilizado para a demonstração deste processo, pois liga-se a fosfatidilserina, fosfolípídeo que é expresso na membrana quando a célula está em processo de morte. Contudo, existem outros processos em que este fosfolípídeo é exposto. Com a finalidade de excluir tais processos uma segunda marcação, com PI, foi realizada. Sendo assim, apenas células marcadas com anexina-V (PI-negativas) dentro da população selecionada foram indicadas com células apoptóticas.

Observamos que, ao contrário dos trofozoítos controle, incubados com DMSO (figura 33), os parasitos tratados com MII tiveram aumentada a exposição de fosfatidilserina na superfície celular (figura 33).

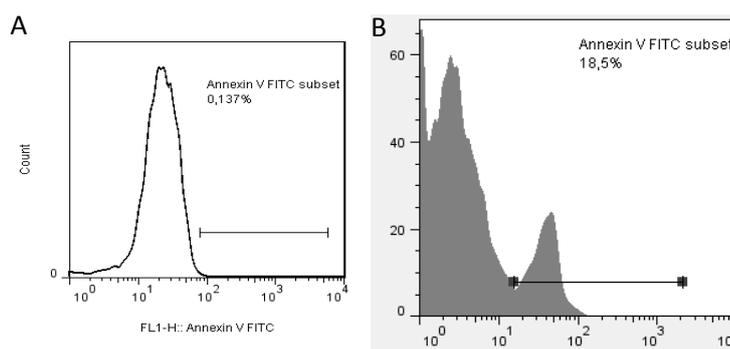


Figura 33: Citometria de fluxo de trofozoítos de *E. histolytica* mostrando marcação de anexina V. (A) Células do controle. (B) Células tratadas com 29,9 μM de M VI.

## 5 Discussão

Na tentativa de otimizar os bioensaios com diferentes compostos, um sistema de cultivo em placas foi sugerido. Contudo, para possibilitar o desenvolvimento dos trofozoítos de *E. histolytica* em placas de cultivo de 24 poços era necessária a redução das taxas de oxigênio no meio de cultura, uma vez que as placas não possuem um sistema hermético.

A *Entamoeba histolytica* é um parasito que habita a luz do intestino grosso e este é um local onde as taxas de O<sub>2</sub> são muito baixas. Portanto, para o inicio dos ensaios em poços era necessário criar um microambiente anaeróbico favorável à proliferação deste parasito. Para atingir este objetivo,

uma camada de óleo mineral foi aplicada acima do meio de cultura a fim de servir como isolante, impedindo a difusão do O<sub>2</sub> para o meio de cultura (figura 3). Mesmo possuindo algumas enzimas capazes de realizar a detoxicação de espécies reativas oxidativas e sendo capaz de sobreviver em ambientes microaerófilos o oxigênio continua apresentando toxicidade contra a *E. histolytica* (RAMOS-MARTINEZ *et al.*, 2009).

Para demonstrar que os trofozoítos poderiam crescer nestas condições duas curvas de crescimento foram construídas: a primeira sem óleo mineral e a segunda com óleo mineral. A cada dia foram obtidas micrografias dos poços e os trofozoítos de cada um dos poços foram contados (figura 4). Nestes ensaios foi possível observar que a camada de óleo mineral foi capaz de gerar um microambiente favorável para a proliferação dos trofozoítos de *E. histolytica* (figura 5), uma vez que pode-se observar o aumento do número de trofozoítos, além de células com movimentação normal, com contínua emissão de pseudópodos, enquanto nos poços sem o óleo mineral as células não se proliferaram e se arredondavam, característica esta de trofozoítos estressados e possivelmente lesados por radicais livres gerados pela presença de oxigênio (figura 6).

Portanto, com as condições de cultivo sendo adequadas à proliferação de *E. histolytica* foi promovida, apenas na presença do óleo mineral e, assim, foi possível realizar um número maior de experimentos no âmbito de teste de drogas tendo em vista que muitas vezes se tratam de produtos naturais, a disponibilidade destas substâncias são escassas. Com o resultado obtido, os ensaios passaram a ser realizados em placas de 24 (vinte e quatro) poços com óleo mineral e não mais em tubos de 15 mL. Desta maneira foi possível reduzir gasto de reagentes utilizados rotineiramente na cultura, bem como das substâncias teste que, em geral, são enviadas em pequenas quantidades.

Com o cultivo nas placas de 24 poços foi possível a aplicação de métodos colorimétricos uma vez que muitos deles utilizam substâncias potencialmente tóxicas que poderiam impregnar o tubo inviabilizando a reutilização do mesmo. Vale à pena ressaltar que a utilização de métodos como este podem minimizar erros de pipetagens e mesmo subjetivos (como os erros no momento da contagem), além de otimizar a leitura dos resultados em relação ao tempo.

Inicialmente foram comparadas três técnicas de colorimetria, sendo duas delas baseadas no princípio da oxirredução (MTT e alamar blue®). Contudo, após a realização de alguns testes os métodos baseados no princípio da oxirredução não se mostraram eficazes devido ao fato do meio de cultivo dos trofozoítos ser redutor, confundindo assim a leitura das reações colorimétricas. Em um segundo momento estes métodos foram repetidos, porém o meio foi retirado e os trofozoítos foram lavados com tampão (solução de Hanks) e, em seguida, incubados com o mesmo tampão e os reagentes dos respectivos métodos colorimétricos. Ainda assim, após as reações haviam erros nos resultados e o tempo despendido para a realização de cada técnica foi cerca de 3 vezes maior para o MTT e alamar blue® quando comparados com a colorimetria do azul de metileno.

Uma segunda comparação foi realizada, entretanto, desta vez apenas entre os métodos de MTT e do azul de metileno. Uma vez que os dois métodos já haviam sido aplicados em cultura de parasitos anaeróbicos, sendo o primeiro deles em *E. histolytica* (CEDILLO-RIVERA, RAMÍREZ & MUÑOZ, 1992). Pode-se observar que o formazam, molécula produzida na reação de MTT, estava interagindo com o óleo mineral, e por isso este teste foi excluído. Após a análise do crescimento dos trofozoítos em placa com o objetivo de realizar os testes com maior confiança, menor taxa de subjetividade e redução de desvio padrão o teste colorimétrico com azul de metileno foi eleito. Tendo em vista que o mesmo já havia sido testado em outros tipos celulares diferentes da *Entamoeba histolytica* (ISHAI-MICHAELI *et al.*, 1990; BUSATTI *et al.*, 2007), este método passou por dois processos de padronização com este parasito: correlação de linearidade e eficácia no teste de substâncias.

Para a verificação de linearidade foram realizados testes utilizando o azul de metileno como corante e as leituras das amostras foram realizadas em um aparelho leitor de ELISA, gerando um gráfico de curva padrão pelo 'software' SoftMaxPro 5.1. Os resultados obtidos nestes ensaios demonstraram que o teste colorimétrico para trofozoítos de *E. histolytica* apresentou-se eficaz e fidedigno, tendo um  $R^2=0.995$  (figura 8). A eficácia deste método para o teste de substâncias foi demonstrada quando o metronidazol, droga de escolha para o tratamento, foi testada, em concentrações crescentes contra trofozoítos de *E.*

*histolytica* (figura 9). Com a linearidade e reprodutibilidade altas o ensaio passou a ser utilizado como método de leitura para experimentos posteriores.

Na quimioterapia antiparasitária o objetivo é encontrar e/ou desenvolver um composto capaz de levar os parasitos à morte com uma concentração mínima e não tóxica desta substância possibilitada pela ação seletiva do composto. Basicamente, existem duas formas de estudar e/ou pesquisar substâncias que apresentem efeitos parasiticidas: o primeiro é a modelagem molecular e o segundo é o empirismo. Enquanto no primeiro modelo os alvos e mecanismos de ação já estão definidos, no segundo pouco se sabe sobre este dois pontos e as substâncias são selecionadas por triagem (BOTROS *et al.*, 2003).

Existem métodos que devem ser seguidos em um estudo do tipo triagem/‘screening’, para que os alvos farmacológicos, mecanismos de ação e citotoxicidade da substância teste sejam conhecidos. As substâncias selecionadas inicialmente nos bioensaios de triagem de compostos são aquelas que apresentam a maior toxidade e letalidade para os patógenos. Sendo assim, estes indivíduos têm, basicamente, dois mecanismos de morte que são, neste caso, necrose e apoptose<sup>1</sup>. A necrose é um tipo de morte celular errático e desorganizado que dissemina restos celulares pelo tecido ou região adjacente<sup>2</sup>. A apoptose, por outro lado, é um tipo de morte organizado e programado, onde existem moléculas específicas que regulam este processo.

Além da presença de moléculas específicas, a apoptose é bem caracterizada em muitos tipos celulares, apresentando os seguintes padrões: fragmentação nuclear, níveis baixos de ATP, expressão de fosfatidilserina, entre outros. Existem muitas formas de se induzir apoptose e dentre elas estão privação de nutrientes, danos no material genético e ativação exógena de receptores de morte (GRIVICICH, REGNER & ROCHA, 2007).

Todas as situações supracitadas são exemplos de eventos que antecedem o processo de apoptose. A autofagia é um mecanismo que em

---

<sup>1</sup>Vale salientar que ambos mecanismos de morte celular apresentam sub-tipos e podem, até mesmo, ser deflagrado simultaneamente (MOQUIN & CHAN, 2010; NANDI *et al.*, 2010).

<sup>2</sup> Já foi demonstrada a morte programada por necrose (MOQUIN & CHAN, 2010).

muitos casos, pode garantir a sobrevivência da célula devido a sua capacidade de gerenciar a biomassa intracelular e reciclar organelas, gerando nutrientes (DERETIC & LEVINE 2009), porém a longo prazo também pode culminar em uma morte programada, conhecida com apoptose autofágica ou morte celular autofágica (BURSCH *et al.*, 2004).

Neste trabalho, os mesoiônicos testados que apresentaram efeitos inibitórios sobre os trofozoítos foram selecionados para a realização de mais ensaios que pudessem elucidar suas vias de ação e possíveis mecanismos de indução de morte. A presença de figuras de mielina pode ser relacionada à peroxidação lipídica (MIGUET-ALFONSI *et al.*, 2002) e pode ser um dos fatores que caracterizam o processo autofágico. Assim sendo, foram realizados experimentos para identificar compartimentos autofágicos e a produção de ROS. Estes compostos, por serem capazes de atravessar membranas podem promover a liberação de radicais livres dentro da célula, uma vez que foi demonstrado o aumento de espécies oxidativas nos experimentos com a sonda DCFDA, podendo levar esses parasitos à morte, provavelmente por afetar duas vias distintas, mas que acabam no mesmo processo de morte celular, uma morte programada da célula (PCD), que pode ser visualizado de modo discreto nestas células com o tempo de incubação de 24 horas. A suposição deste tipo de morte dar-se devido ao conjunto de evidências que foram confirmadas ao longo dos experimentos realizados, tais como alterações na integridade da membrana, que pode ser visualizada pelo azul de trypan e pelo DAPI (quando utilizado em células vivas). A ausência de marcação por estes compostos em células não fixadas indica que a necrose não teve participação significativa no efeito amebicida destas substâncias, assim como a observação de células negativas para azul trypan corroboram esta hipótese (dado não mostrado). A marcação com anexina V que comprova a presença de fosfatidilserina exposta na face exterior da membrana plasmática e micrografias, revelando estruturas semelhantes a corpos apoptóticos visualizados na MEV. A apoptose em *E. histolytica* ainda é precariamente caracterizada. Experimentos de eletroforese em gel de agarose, considerados até o momento como “padrão ouro” para caracterização do processo de morte programada, serão realizados para analisar a clivagem de DNA neste protozoário em presença dos compostos testados (VILLALBA-MAGDALENO *et al.*, 2007).

Os trofozoítos de *E. histolytica*, assim como de outras amebas, são altamente pleomórficos, dificultando as inferências que poderiam ser realizadas a partir das observações que a MEV pode proporcionar em um estudo de morfologia. Assim, não foram observadas diferenças entre as células tratadas e não tratadas (figura 18), contudo estruturas semelhantes a corpos apoptóticos foram visualizadas (figura 19).

Na MET, por possibilitar a visualização das ultraestruturas celulares, as diferenças entre células na presença ou ausência dos compostos foram bem evidenciadas. A exemplo de alterações encontradas nas células tratadas foram observados os seguintes indícios: autofagia (figuras 26 e 27), caracterizada pelas figuras de mielina, e presumíveis danos no material genético (figura 25), indicados pela presença de núcleos atípicos (figura 29). Alterações no aspecto e ultraestrutural das vesículas também foram observados (figura 23). O aumento acentuado do diâmetro e redução de número das vesículas sugere que a fusão ou confluência destas tenha sido induzida por MVI (figura 23). Este composto também ocasionou a formação de grandes figuras de mielina focalizadas no lúmen de vacúolos citoplasmáticos (figura 24).

Estas observações guiaram o início do estudo com estas substâncias permitindo hipotetizar algumas possíveis vias de ação que poderiam levar os trofozoítos à morte, tais como estresse oxidativo associado ou não à autofagia e à apoptose. Na citometria de fluxo a marcação com IP indica, provavelmente, que existem células que já estavam mortas por necrose após um período de 72 horas e que estas mortes não estão ligadas à apoptose. Enquanto na condição com a presença de MII as células também morrem, porém a marcação para anexina-V sem a presença de PI indica uma morte celular programada. Contudo, células que já passaram pelo rápido processo de morte podem ser marcadas inespecificamente por PI, por isso é importante avaliar o processo de morte em diferentes tempos.

Acredita-se que duas das vias de ação distintas podem estar ocorrendo. A primeira delas seria a ação das substâncias diretamente sobre o material genético, causando os danos originados por moléculas, tais como o NO, já que existem grupamentos NO<sub>2</sub> na estrutura da molécula, que por sua vez podem induzir apoptose em trofozoítos *in vitro* (RAMOS *et al.*, 2007) e uma segunda via indireta que se iniciaria devido a estresse oxidativo no parasito, podendo

desencadear processos autofágicos e *a posteriori* apoptose autofágica (MIGUET-ALFONSI *et al.*, 2002; BURSCH *et al.*, 2004) ou mesmo estas duas vias podem estar sendo ativadas simultaneamente e levando os trofozoítos à morte (NANDI *et al.*, 2010).

Nas células tratadas pôde-se observar por microscopia eletrônica a presença de autofagossomos, sob a forma de figuras de mielina e vesículas com dupla membrana. Posteriormente, houve confirmação deste evento, utilizando uma marcação específica para vacúolos autofágicos, a MDC, evidenciando o processo autofágico. Este, por sua vez, associado às alterações observadas no material genético, tais como o aumento do número de núcleos nos trofozoítos tratados, houveram células que apresentaram mais que 5 núcleos, visualizados quando marcados com DAPI, mas que só puderam ser observadas em células fixadas podem ser indicativos de PCD II (morte autofágica). Este fato pode ser corroborado tendo em vista que o DAPI é incapaz de atravessar membranas íntegras e que, em processos apoptóticos, tal padrão é mantido. Alterações na estrutura do núcleo, tais como hipodensidade com focos hiperdensos, também possivelmente indicativos de apoptose, puderam ser observadas (NANDI *et al.*, 2010).

Assim como os danos causados ao material genético, a autofagia também é capaz de induzir PCD (BURSCH *et al.*, 2004). Além disso, como descrito em processos de morte celular programadas, mais de uma via podem estar em ação em um evento de morte celular. Contudo, mesmo pertencendo ao mesmo grupo, os compostos utilizados neste estudo induzem a PCD, por vias diferentes. Sendo assim, a morte celular induzida por MII é, provavelmente, resultado de um processo autofágico; a ocasionada por MIX, possivelmente, está ligada aos danos no DNA, já que não houve a presença de vacúolos autofágicos ou necrose e a morte gerada pela MVI pode estar ligada aos dois eventos simultaneamente, uma vez que este composto foi capaz de induzir autofagia e, por apresentar um grupamento NO<sub>2</sub> na sua estrutura, que pode atuar no DNA diretamente e induzindo apoptose. Contudo, vale salientar a capacidade da piperina induzir a formação vacúolos (FREIRE-DE-LIMA *et al.*, 2008) e reagir com o maquinaria de replicação e/ou correção do DNA, possivelmente com o DNA polimerase, em outros tipos celulares

(BALAKRISHNAN *et al.*, 2001), pois com a sua estrutura modificada em um sal mesoiônico tais ações poderiam ser mais evidentes.

Essas diferenças no mecanismo de ação dos compostos aqui testados provavelmente se devem à estrutura das moléculas, permitindo a identificação de grupamentos farmacofóricos.

## **6 Considerações finais**

Os mesoiônicos aqui estudados apresentaram uma atividade antiparasitária promissora sobre trofozoítos de *E. histolytica*, sem apresentar toxicidade em concentrações muito superiores à IC<sub>50</sub> em células humanas. Com este estudo, também foi possível evidenciar possíveis vias de ação destes compostos induzindo PCD, contudo as rotas bioquímicas e alvos intracelulares ainda são desconhecidos. Assim sendo, estas substâncias são candidatas a um possível tratamento alternativo, entretanto são necessários mais estudos com estes compostos. Tais estudos podem incluir a corrida eletroforética de DNA em gel de agarose, testes de reverção, além de estudos de inibição da autofagia para demonstrar as possíveis vias de ação dos compostos mesoniônicos derivados de piperina aqui testados.

Tendo em vista que a amebíase é a segunda maior causa de mortalidade entre as protozooses e atinge, principalmente, os países em desenvolvimento, onde o Brasil está classificado, os resultados aqui apresentados indicam que o entendimento dos mecanismos de morte celular produzidos por compostos como os mesoiônicos pode levar à identificação de novos alvos e agentes para a terapia da amebíase.

Mesmo não descrevendo completamente as vias de ação dos compostos mesoiônicos este trabalho foi de suma importância para o estudo da amebíase, pois o mesmo possibilitou a padronização de duas técnicas: uma de cultivo e uma de quantificação de trofozoítos, as quais foram aplicadas com sucesso no teste de mais de 70 compostos.

## 7 Conclusão

O cultivo de *E. histolytica* em placas de cultura de 24 poços com a camada de óleo mineral foi padronizado e mostrou-se eficaz, econômico e com boa reprodutibilidade.

A padronização do ensaio colorimétrico para a contagem de trofozoítos de *E. histolytica* com o azul de metileno também mostrou-se eficiente e simples, resultando em leituras mais precisas e rápidas.

Com estas duas padronizações será possível testar um número razoável de compostos, além de otimizar o tempo de testes de novos compostos em *E. histolytica* com economia e segurança.

Os compostos mesoiônicos selecionados M II, M VI e M IX apresentaram efeitos amebicidas, além de causar alterações celulares, tais como a formação de vacúolos autofágicos, a redução da adesão celular, bem como o aumento da produção de espécies oxidativas. Portanto, estes compostos poderão ser utilizados em testes *in vivo* futuramente objetivando terapias alternativas para a amebíase.

## Referências

- ABREVAYA, X. C., CARBALLO, M. A. and MUDRY, M. D. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*). **Genetics and Molecular Biology**, 30, 4, 1139-1143. 2007.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4º edição. Editor ArtMed. 2004.
- ASSIS, A. M. O.; BARRETO M. L.; SANTOS, N. S.; OLIVEIRA, L. P. M.; SANTOS, S. M. C.; PINHEIRO, S. M. C. Desigualdade, pobreza e condições de saúde e nutrição na infância no Nordeste brasileiro. **Caderno de Saúde Pública**. Volume 23. número 10. Rio de Janeiro. Outubro de 2007.
- BALAKRISHNAN, V., VARMA, S. & CHATTERJI, D. Piperine augments transcription inhibitory activity of rifampicin by severalfold in *Mycobacterium smegmatis*. **CURRENT SCIENCE**, VOL. 80, NO. 10, 25 MAY. 2001.
- BAND, R. N. & CIRRITO, H. Grow response of axenic *Entamoeba histolytica* to hydrogen, carbon dioxide and oxygen. *J. Protozool.*, 26: 282-286, 1979.
- BANSAL, D.; SEHGAL, R.; CHAWLA, Y.; MAHAJAN, R. C. & MALLA, E. In vitro activity of antiamebic drugs against clinical isolates of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 2004.
- BENCHIMOL, M., **PROGRAMMED CELL DEATH IN PROTOZOA**. Cell Death in Trichomonads. Ed. Landes Bioscience and Springer Science. 2008.
- BENDESKY, A.; MENÉNDEZ, D.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Is metronidazole carcinogenic? **Mutation Research**. 511. 2002.
- BIEDERBICK A, KERN HF, ELSÄSSER HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. **Eur J Cell Biol**. Jan;66(1):3-14. 1995.
- BOTROS, S., WILLIAM, S., HAMMAM, O., ZÍDEK, Z. & HOLY, A. Activity of 9-(S)-[3-Hydroxy-2-(Phosphonomethoxy)Propyl]Adenine against *Schistosomiasis mansoni* in Mice. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, p. 3853–3858. Dec. 2003.
- BURSCH, W., ELLINGER, A., GERNER, C. & SCHULTE-HERMANN, R. **When cells die: a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death**. CASPASE-INDEPENDENT AND AUTOPHAGIC PROGRAMMED CELL DEATH. Ed. Wiley-Liss. 2004.
- BUSATTI, H. G. N. O. & GOMES, M. A. A simple colorimetric method to determine anti-giardial activity of drugs. **Parasitol. Res**. 2007.
- CARDOSO, J. F. R.; WARDINI, A. B.; EVANGELISTA, D. W.; VIANA, E. B.; LIMA, M. E. F. de; SOARES, B. A.; BARRETO JUNIOR, C. B.; BRITO, M. de F.; MAZUR, C.; DANELLI, M. das G. M. Avaliação do efeito tóxico da Piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida, Seropédica, RJ: EDUR**, v. 25, n.1, p. 85-91 jan.-jun. 2005.
- 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*. **Archives of medical**. 1992.
- CENTRAL OF DIASES CONTROL. [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx). Acessado em 03/07/2010.

CLARK, C. G. The evolution of *Entamoeba*, a cautionary tale. **Res. Microbiol.** 151, 599–603. 2000.

DERETIC, V. & LEVINE, B. Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptations. **Cell Host & Microbe.** 2009.

DI STASI, L. C. & HIRUMA-LIMA C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2- edição, revista e ampliada Fundação Editora da UNESP (FEU). 2002.

ESPINOSA-CANTELLANO, M. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS.** Apr. 2000.

FERREIRA, W. S.; LIMA, L. F.; SARAIVA, V. B.; SILVA, F. A.; PREVIATO, L. M.; PREVIATO, J. O.; ECHEVARRIA, A.; LIMA, M. E. F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: Chemical and biological studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 16: 2984–2991, 2008.

FREIRE-DE-LIMA, L., RIBEIRO, T. S., ROCHA, G. M., BRANDÃO, B. A., ROMEIRO, A., MENDONÇA-PREVIATO, L., PREVIATO, J. O., LIMA, M. E. F. & CARVALHO, T. M. U., HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitol Res.** 102:1059–1067. 2008.

FREITAS, M. A. R. **CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *Entamoeba histolytica* ISOLADAS DE DIFERENTES CASOS CLÍNICOS NO BRASIL: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES POSSIVELMENTE ENVOLVIDOS COM A PATOGENICIDADE.** Belo Horizonte. 2007.

GIELLESPIE, S. & PEARSON R. D. **Principles and Practice of Clinical Parasitology.** Ed. John Wiley & Sons LTD. 2001.

GHOSH, A. S.; DUTTA, S.; RAHA, S. Hydrogen peroxide-induced apoptosis-like cell death in *Entamoeba histolytica*. **Parasitology International.** 59, 166–172. 2010.

GHOSHAL, S.; KRISHNA PRASAD, B. N.; LAKSHMI, V. Antiamoebic activity of Piper longum fruits against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology.** 50 167-170. 1996.

GRIVICICH, I., REGNER, A. & ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose - *Apoptosis: Programmed Cell Death.* **Revista Brasileira de Cancerologia.** 53(3): 335-34. 2007.

ISHAI-MICHAELI, R.; ELDORT, A. & VLODAVSKY, I. Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils, and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. **CELL REGULATION,** VOI. 1, 833-842, October 1990.

KIM, E.; NA, D.G.; KIM, E.Y.; KIM, J.H.; SON, K.R.; CHANG, K.H. MR. Imaging of Metronidazole-Induced Encephalopathy: Lesion Distribution and Diffusion-Weighted Imaging Findings. **AJNR Am J Neuroradiol.** 28:1652–58. Oct, 2007.

KRONDL, M. **O sabor da conquista: Veneza, Lisboa e Amsterdã na rota das especiarias.** Ed. ROCCO. 2007.

LEITSCH D, KOLARICH D, WILSON IBH, ALTMANN F, DUCHÊNE M. Nitroimidazole action in *Entamoeba histolytica*: A central role for thioredoxin reductase. **PLoS Biol** 5(8): e211. doi:10.1371/journal.pbio.0050211. 2007.

MARR, J. J.; NILSEN, T.W. & KOMUNIECKI, R.W. **Molecular Medical Parasitology.** Elsevier Science Ltd. 2003.

MEZA, I.; TALAMA´S-ROHANA, P.; & VARGAS, M. A. The Cytoskeleton of *Entamoeba histolytica*: Structure, Function, and Regulation by Signaling Pathways. **Archives of Medical Research**. 37, 234–243. 2006.

MIGUET-ALFONSI, C., PRUNET, C., MONIER, S., BESSÈDE, G., LEMAIRE-EWING, S., BERTHIER, A., MÉNÉTRIER, F., NÉEL, D., GAMBERT, P. & LIZARD, G. Analysis of oxidative processes and of myelin figures formation before and after the loss of mitochondrial transmembrane potential during 7 $\beta$ -hidroxycholesterol and 7-ketocholesterol-induced apoptosis: comparison with various pro-apoptotic chemicals. **Biochemical Pharmacology**. 2002.

MIKUS, J. & STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue<sup>®</sup>. **Parasitology International**. 265-269. 2000.

MOQUIN, D. & CHAN, F. KA-MING. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. **Trends in Biochemical Sciences**. 2010.

NANDI, N.; SEN, A.; BANERJEE, R.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; GHOSH, A. N. & DAS, P. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Microbiology** 156, 1926–1941. 2010.

NANJI, A. A. & HILLER-STURMHÖFEL, S. APOPTOSIS AND NECROSIS *Two Types of Cell Death in Alcoholic Liver Disease*. **ALCOHOL HEALTH & RESEARCH WORLD**. VOL. 21, NO. 4, 1997.

NAPPI A. J. & VASS E. **Parasites of Medical Importance**. Ed. Landes Bioscience. 2002.

NEVES, D. P., MELO, A. L., LINARDI, P. M., VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11<sup>o</sup> edição. Ed. Atheneu. 2001.

OLIVEIRA, C. S. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS MESOIÔNICOS**. Paraíba. 2009.

PICAZARRI, K.; NAKADA-TSUKUI, K. & NOZAKI, T. Autophagy during Proliferation and Encystation in the Protozoan Parasite *Entamoeba invadens*. **INFECTION AND IMMUNITY**, p. 278–288. Jan. 2008.

RAMOS, E.; OLIVOS-GARCÍA, A.; NEQUIZ, M.; SAAVEDRA, E.; TELLO, E.; SARALEGUI, A.; MONTFORT, I.; TAMAYO, R. P. *Entamoeba histolytica*: Apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. **Experimental Parasitology**. 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 3<sup>o</sup> edição. Ed. Guanabara Koogan. 2001.

SAAVEDRA-LIRA, E. & PEREZ-MONTFROT, R. Energy production in *Entamoeba histolytica*: New perspectives in rational drug desing. **Archives of Medical Research**. V.27. n<sup>o</sup> 3, pp 257-264. 1996.

SAMPAIO, C. P. P. ; BIONDO-SIMÕES, M. L. P.; TRINDADE, L. C. T.; FARIAS, R. E.; PIERIN, R. J. Alterações inflamatórias provocadas pelo metronidazol em feridas: estudo experimental em ratos. **J Vasc Bras**. 8(3):232-237. 2009.

SAMARAWICKREMA, N. A.; BROWN, D. M.; UPCROFT, J. A.; THAMMAPALERD, N. & UPCROFT, P. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate:ferredoxin oxidoreductase in mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 40, 833–840. 1997.

SCHERZ-SHOUVAL, R. AND ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **TRENDS in Cell Biology**. Vol.17 No.9. 2007.

SEN, A.; CHATTERJEE, N. S.; AKBAR, M. A.; NANDI, N.; DAS, P. The 29-Kilodalton Thiol-Dependent Peroxidase of *Entamoeba histolytica* Is a Factor Involved in Pathogenesis and Survival of the Parasite during Oxidative Stress. *Eucaryotic Cell*. p.664-673. 2007.

SENFF-RIBEIRO, A.; ECHEVARRIA, A.; SILVA, E. F.; FRANCO, C. R. C.; VEIGA, S. S. & OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect of a new 1,3,4-thiadiazolium mesoionic compound (MI-D) on cell lines of human melanoma. **British Journal of Cancer** 91, 297 – 304. 2004.

UPCROFT, P. AND UPCROFT, J. A. Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**. p. 150–164. Jan. 2001.

VÁZQUEZ, C. L. & COLOMBO, M. I. Chapter 6 Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. **Methods Enzymol.**;452:85-95. 2009.

VILLALBA-MAGDALENO, J.D.; ROJAS, R.; GÓMEZ, C. ; SHIBAYAMA, M. ; CARRERO J. C. AND GUILLERMO, D. Emetine produce *Entamoeba histolytica* Death by Inducing a Programmed Cell Death. **American Journal of Infectious Diseases** 3 (2): 110-114, 2007.

WASSMANN, C.; HELLBERG, A.; TANNICH, E.; BRUCHHAUS, I. Metronidazole Resistance in the Protozoan Parasite *Entamoeba histolytica* Is Associated with Increased Expression of Iron-containing Superoxide Dismutase and Peroxiredoxin and Decreased Expression of Ferredoxin 1 and Flavin Reductase. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**. Vol. 274, No. 37, Issue of September 10, pp. 26051–26056, 1999.

XIE, Z. AND KLIONSKY, D. J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. **Nature Cell Biology**. 2007.