

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO DE FARMÁCIA

PAULO ROBERT SILVEIRA NASCIMENTO

**Avaliação da atividade antiamebiana de compostos presentes no Covid-Box[®]
contra trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii***

Florianópolis – SC

2021

PAULO ROBERT SILVEIRA NASCIMENTO

**Avaliação da atividade antiamebiana de compostos presentes no Covid-Box®
contra trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii***

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências em Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de bacharel Farmácia

Orientadora: Profª Drª. Karin Silva Caumo
Coorientadora: Jaqueline da Silveira

Florianópolis

2021

Dedico esse trabalho aos meus familiares e amigos que me apoiaram durante a jornada acadêmica e aos colegas do grupo do Laboratório de Protozoários Emergentes e Oportunistas que ajudaram na execução desse Trabalho de Conclusão de Curso

AGRADECIMENTOS

A batalha às vezes pode ser dura e por mais difícil que pareça, mas com muita determinação, foco e superação você pode chegar aonde quiser.

Eu agradeço primeiramente à minha família que esteve do meu lado nos momentos mais difíceis, só vocês sabem por tudo que passei. Mas quando eu mais precisei, mesmo nos momentos de dores e sofrimento estavam do lado me incentivando.

Agradeço aos profissionais de saúde que ajudaram na minha recuperação e pude estar aqui hoje terminando esse trabalho.

À minha orientadora professora Dr.^a Karin Silva Caumo, por todo conhecimento que pude adquirir e conquistar ao seu lado. Obrigado por acreditar em mim. Por todo incentivo e dedicação na orientação desse trabalho.

À minha coorientadora Jaqueline da Silveira, por todo ensinamento compartilhado durante a realização desse trabalho e paciência durante esse período. Como sempre digo: “O que seria de mim sem você Jaque?”

Agradeço aos professores, pela paciência e ajuda durante todo o processo de recuperação.

Aos membros da banca por todas sugestões e contribuições

À equipe do Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO) que tornaram meus dias melhores em todo momento, seja com compartilhamento de ideias e sugestões ou as risadas durante o café.

Aos meus amigos que me incentivaram ou até mesmo escutaram todo desabafo de estresse do TCC.

Ao LAMEB por auxiliar em todas as leituras que pude fazer no espaço laboratorial.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA pelo conhecimento e formação.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“A ciência atua na fronteira entre o conhecimento e a ignorância sem medo de admitir que não sabemos. Não há nenhuma vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas”.

(Neil deGrasse Tyson)

RESUMO

Amebas de vida livre são protozoários ubiqüitários que podem ser isoladas de vários nichos ambientais, como solo, água e vegetação. O gênero *Acanthamoeba* spp. tem como característica ser amebas anfizoicas, podendo se comportar na forma livre e parasitária. *Acanthamoeba* spp. apresenta dois estágios no seu ciclo de vida, o trofozoíto, caracterizado como a forma metabolicamente ativa e cisto, sua forma ativa. O reposicionamento de fármacos é uma das estratégias para o tratamento de infecções emergentes, como as ocasionadas pela ameba de vida livre do gênero *Acanthamoeba*. Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos presentes no Covid-Box[®] na busca de novas opções terapêuticas para a ceratite amebiana e infecções disseminadas. Os testes de atividade amebicida foram realizados utilizando a cepa de *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492). Para a realização da atividade amebicida, os trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. foram expostos na concentração de 10 µM de cada composto presente no Covid-Box[®]. Além disso, os compostos que apresentaram melhor atividade amebicida foram avaliados nas concentrações de 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM e 2,5 µM para determinar a IC50. Para determinar a viabilidade dos trofozoítos, foi utilizado o indicador de viabilidade alamarBlue[®]. Também, foi realizado o ensaio de citotoxicidade frente a células SIRC dos compostos selecionados. A ciclosonida e a prometazina foram capazes de diminuir consideravelmente os números de trofozoítos de *A. castellanii*, com diminuição da viabilidade de 35,01 ± 5,088% e 34,66 ± 5,165% respectivamente. Tanto ciclosonida, quanto prometazina apresentaram menor toxicidade ocular que o fármaco padrão ouro utilizado no tratamento da ceratite amebiana. Os resultados permitiram identificar dois compostos ativos frente a trofozoítos de *A. castellanii* e com baixo potencial citotóxico, que poderão servir como protótipo no estudo de novas moléculas ativas, estudos de sinergia, visando melhorar a terapêutica das infecções por *Acanthamoeba* spp.

Palavras-chave: *Acanthamoeba* spp; reposicionamento de fármacos; ceratite amebiana; encefalite amebiana granulomatosa; Covid-Box[®].

ABSTRACT

Free-living amoebas are ubiquitous protozoa that can be isolated from various environmental niches, such as soil, water and vegetation. The genus *Acanthamoeba* spp. has the characteristic of being amphizoic amoebas, being able to behave in the free and parasitic form. *Acanthamoeba* spp. it has two stages in its life cycle, the trophozoite, characterized as the metabolically active form and cyst, its active form. The drug repositioning is one of the strategies for the emergent infection's treatment such as those occurred by the free-living amoeba of the genus *Acanthamoeba*. In this context, this paper aimed to evaluate the anti-*Acanthamoeba* activity of the compounds present in the Covid-Box[®] in order to search for new therapeutical options for the amoebic keratitis and disseminated infections. The tests of the amoebicidal activity were performed using the strain of the *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 50492). In order to carry out the amoebicidal activity, the *Acanthamoeba* spp's trophozoite were exposed in the concentration of the 10 µM of each compound present in the Covid-Box[®]. Moreover, the compounds that showed better amoebicidal activity were evaluated in the concentrations of 20 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM and 2,5 µM to determine the IC₅₀. Furthermore, to determine the trophozoites' viability, it was used the viability indicator alamarBlue[®]. Also, the cytotoxicity assay against the SIRC of selected cells was performed. Ciclosenide and promethazine were able to considerably decrease the number of the *A. castellanii*'s trophozoites such as a viability decrease of the 35,01 ± 5,088% and 34,66 ± 5,165% respectively. Both ciclosenide and promethazine had lower ocular toxicity than the gold standard drug used in the amoebic keratitis treatment. The results allowed to identify two active compounds against the *A. castellanii*'s trophozoites with low cytotoxic potential which could be used as a study prototype of new active molecules, synergy studies, aiming to improve the treatments of the infections caused by *Acanthamoeba* spp.

Keywords: *Acanthamoeba* spp, drug repositioning, amoebic keratitis, granulomatous amoebic encephalitis, Covid-Box[®]

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas de <i>Acanthamoeba</i> spp.	18
Figura 2- Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp.	19
Figura 3 - Lista das espécies e genótipos de <i>Acanthamoeba</i> spp.	22
Figura 4 -Ceratite amebiana por <i>Acanthamoeba</i> spp.	26
Figura 5 - Potenciais alvos de ação na <i>Acanthamoeba</i> spp.	28
Figura 6 - Estrutura química da ciclesonida e prometazina.	36
Figura 7- Viabilidade de trofozoítos dos primeiros 40 compostos da placa A (A2 a H6).	38
Figura 8 - Viabilidade de trofozoítos dos 40 compostos restantes da placa A (A7 a H11).	39
Figura 9 - Viabilidade de trofozoítos dos primeiros 40 compostos da placa B (A2 a H6).	39
Figura 10 - Viabilidade de trofozoítos dos 40 compostos restantes da placa A (A7 a H11).	40
Figura 11 - Avaliação da atividade anti- <i>Acanthamoeba</i> da ciclesonida, prometazina e clorexidina.	43
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade em células SIRC	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos compostos presentes no Covid-Box®.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVL	Amebas de vida livre
CA	Ceratite amebiana
CaM	Calmodulina
CI50	Concentração inibitória média
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAG	Encefalite amebiana granulomatosa
LAPEO	Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PYG	Meio proteose peptona, extrato de levedura e glicose
RPMI	Gibco Roswell Park Memorial Institute
SIRC	<i>Statens Seruminstitut Rabbit Cornea</i>
µm	Micrômetro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO <i>Acanthamoeba</i> spp.....	20
2.3 INFECÇÕES ASSOCIADAS <i>Acanthamoeba</i> spp.	22
2.4 BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS.....	29
2.5 COVID-BOX®	30
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 METODOLOGIA	33
5.1 PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS FORNECIDOS NO COVID-BOX®	33
5.2 TRIAGEM DOS COMPOSTOS DA COVID-BOX® E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM TROFOZOÍTOS DE <i>ACANTHAMOEBA</i>	33
5.3 AVALIAÇÃO DA CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA	35
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS FRENTE CÉLULAS SIRC.....	35
5.5 PROMETAZINA E CICLESONIDA.....	36
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TROFOZOITICA DE COMPOSTOS PRESENTES NA COVID-BOX®.	38
6.2 Avaliação da atividade anti- <i>acanthamoeba</i> da ciclesonida e prometazina	42
6.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células SIRC	44
7 CONCLUSÕES	48
8 PERSPECTIVAS	49

1 INTRODUÇÃO

As amebas de vida livre são protozoários ubiqüitários que completam todo seu ciclo de vida na natureza, não necessitando de um hospedeiro para realizar esse processo (FARRA; BEKONDI; TRICOU; MBECKO *et al.*, 2017). Existem mais de 200 tipos de amebas de vida livre, elas podem ser encontradas em água doce, água do mar e solo. Essas amebas utilizam bactérias e outros microrganismos como fontes de nutrientes. Há cerca de 50 anos foi relatado o primeiro caso de infecção humana envolvendo ameba de vida livre, a partir desse momento algumas delas são conhecidas como amebas anfizoicas, ou seja, possuem a capacidade de viver na forma livre, como também na forma parasitária causando infecções em humanos e animais (HARA; YAGITA; SUGITA, 2019).

Dentre uma ampla variedade de amebas de vida livre distribuídas na natureza, apenas quatro apresentam associação com infecções em humanos e animais: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e *Sappinia pedata*. Essas amebas são protistas eucariontes, apresentam mitocôndrias e são aeróbicas. As amebas mencionadas causam infecções no sistema nervoso central (SNC). Enquanto a *Naegleria fowleri* é responsável por causar a meningoencefalite aguda, as *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia mandrillaris* causam a encefalite amebiana granulomatosa (EAG), principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, tanto *Acanthamoeba* spp. quanto a *Balamuthia mandrillaris* também causam infecções na pele e pulmões em humanos. Já *Acanthamoeba* spp. pode acometer a córnea e causar ceratite amebiana (CA). (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007).

O gênero *Acanthamoeba* spp. apresenta dois estágios no seu ciclo de vida: trofozoíto e cisto. O trofozoíto consiste na forma ativa, já o cisto é sua forma dormente e resistente. A EAG ocasionada por *Acanthamoeba* spp. atinge principalmente indivíduos imunocomprometidos e ocasiona alta taxa de mortalidade, ficando em torno de 90%, esse índice alto está associado com o diagnóstico tardio e falta de medicamentos eficazes contra as formas amebianas no SNC. Já a ceratite amebiana está relacionada com indivíduos imunocompetentes, a maioria dos casos estão ligados ao mal uso de lente de contato e outros casos com a lesão prévia da córnea

por acidente com madeira, solo entre outros. Os casos de ceratite amebiana, quando não tratados adequadamente, tendem a evoluir para perda da acuidade visual, transplante de córnea e cegueira (RICE; COLON; CHEN; HULL *et al.*, 2020; SHARMA; KALRA; TEJAN; GHOSHAL, 2020).

O manejo terapêutico das infecções causadas por *Acanthamoeba* spp. é dependente de um diagnóstico precoce. Além disso, a maioria dos medicamentos utilizados no tratamento de infecções acanthamebianas são efetivos contra trofozoítos, mas pouco ativos contra cistos. Do mesmo modo, medicamentos usados contra a encefalite amebiana granulomatosa são na sua maioria com efeito amebostático, pois não atravessam a barreira hematoencefálica em concentrações suficientes para atingir a ação terapêutica adequada (KALRA; SHARMA; SHYAM; TEJAN *et al.*, 2020; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015).

Como estratégia para a busca de novas opções terapêuticas para doenças emergentes e negligenciadas, estudos de reposicionamento de fármacos tornaram-se essenciais, melhorando significativamente o tempo da descoberta dos medicamentos e reduzindo a quantidade de recursos utilizados (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020; RICE; COLON; CHEN; HULL *et al.*, 2020). Com isso, fármacos já existentes e que podem apresentar atividade frente à *Acanthamoeba* spp. podem progredir para ensaios clínicos randomizados e conseqüentemente serem utilizados no tratamento de infecções causadas por essa ameba (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

A entidade *Medicines for Malaria Venture* desenvolveu o Pathogen Box[®] e outras plataformas como Covid-Box[®], com o objetivo de disponibilizar para a comunidade científica compostos que servem de triagem frente a diversos agentes infecciosos (VENTURE, 2020) Neste contexto, o presente trabalho visou o estudo de reposicionamento de fármacos a partir da avaliação da atividade amebicida de compostos presentes no Covid-Box[®] que possam ser utilizados como boa opção terapêutica frente às infecções pelo gênero *Acanthamoeba* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. é uma ameba de vida livre de caráter anfizóico, ou seja, apresenta a capacidade de viver tanto na forma livre, como na parasitária. A primeira descrição ocorreu em 1930 pelo pesquisador Castellani, que isolou a ameba como contaminante na cultura de leveduras. Contudo, apenas na década de 1960 foi relatado o primeiro caso de doença em humanos, sendo assim, o gênero *Acanthamoeba* foi descrito como um agente causador da encefalite amebiana granulomatosa. Logo depois, na década de 1970, foi relatado o primeiro caso de ceratite amebiana (CA) por *Acanthamoeba* spp. (FOWLER; CARTER, 1965; NAGINTON; WATSON; PLAYFAIR; MCGILL *et al.*, 1974; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

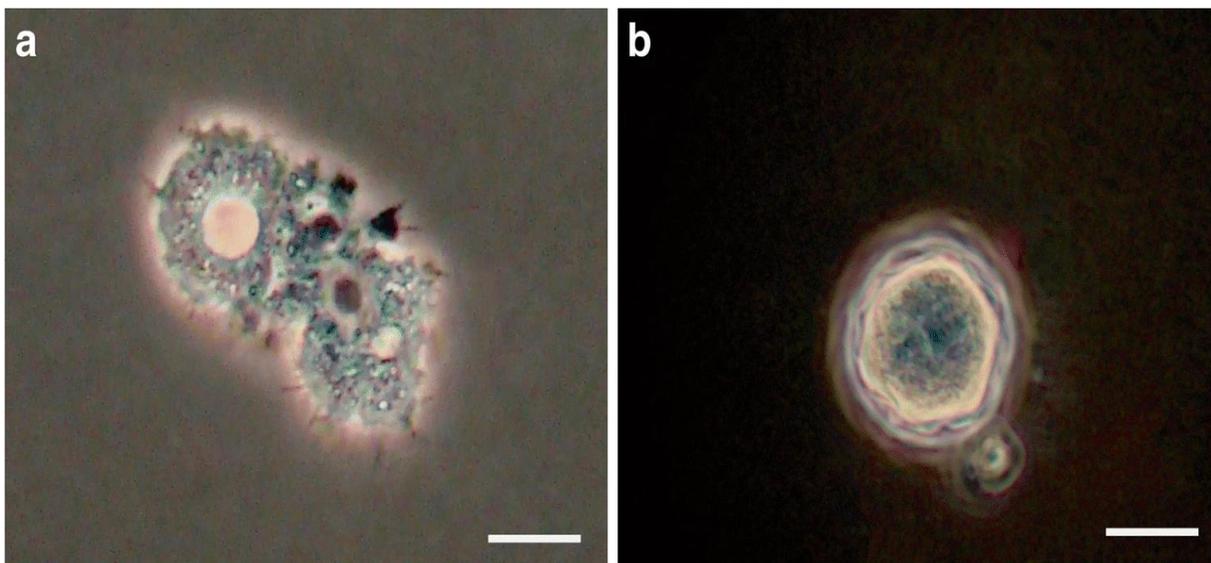
O gênero *Acanthamoeba* é um protozoário ubiquitário, que pode ser encontrado em várias fontes como: água, solo e vegetação. São caracterizados como amebas de vida livre (AVL) que se alimentam principalmente de bactérias, algas e leveduras, atuando como predador microbiano em solos e águas (CORSARO; KÖHSLER; MONTALBANO DI FILIPPO; VENDITTI *et al.*, 2017). Elas apresentam dois papéis ecológicos importantes: influenciar na estrutura/controlar a população microbiana e aumentar a ciclagem de nutrientes. As duas atividades estão associadas a protistas do solo que se alimentam de bactérias, sendo assim, ela ajuda na regulação das populações bacterianas no solo (DE LACERDA; LIRA, 2020). Porém, as amebas podem se comportar como patógenos oportunistas e causar infecções em humanos e animais (CORSARO, 2020).

Acanthamoeba spp. podem ser isolada de diversas fontes como solo (KARAMATI; NIYYATI; LORENZO-MORALES; LASJERDI, 2016), poeira (NIYYATI *et al.*, 2009), água da torneira e do mar (LEAL; SOUZA; CAUMO; FONGARO *et al.*, 2018; LORENZO-MORALES *et al.*, 2005; YOUSUF; SIDDIQUI; SUBHANI; KHAN, 2013), lagos e rios (LORENZO-MORALES *et al.*, 2006) e hospitais (LASJERDI *et al.*, 2011; WOPEREIS *et al.*, 2020).

Acanthamoeba spp. se configura como um protozoário dimórfico, apresentando duas formas distintas: trofozoíto e cisto. Os trofozoítos apresentam-se como a forma ativa. Durante este estágio, as amebas se alimentam de partículas

orgânicas e outros microrganismos, além de se dividirem mitoticamente sob condições ideais. Em condições adversas, a ameba se diferencia em cisto de parede dupla, esse estágio é caracterizado como a forma resistente (Figura 1) (SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Figura 1 - Formas evolutivas de *Acanthamoeba* spp.

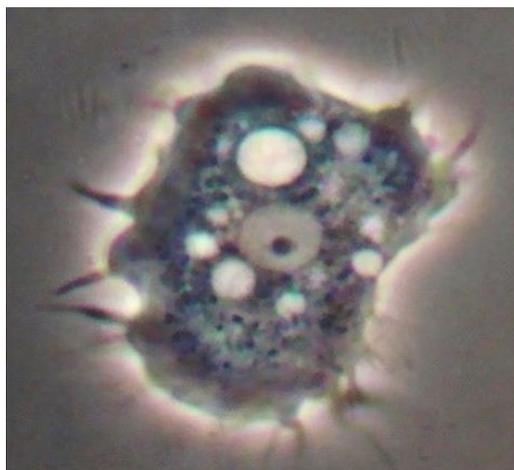


Painel a: Trofozoíto, forma metabolicamente ativa; Painel b: Cisto, forma dormente e resistente.

Fonte: Laboratório de Estudos de Protozoários Emergentes e Oportunistas (LAPEO)

O tamanho do trofozoíto varia de acordo com o genótipo, ficando geralmente entre 15 e 40 μm , apresentando elevado número de mitocôndrias (DE LACERDA; LIRA, 2020; SIDDIQUI; KHAN, 2012). A membrana plasmática é constituída de proteínas, fosfolipídios, esteróis e lipofosfoglicanos (SIDDIQUI; KHAN, 2012). Em sua superfície, apresenta projeções citoplasmáticas denominadas acantopódios, importantes para o movimento celular e sua alimentação (Figura 2). Além disso, a ameba é constituída de vários vacúolos, como os vacúolos contráteis, cuja função é expelir água para a regulação osmótica. Outros vacúolos no citoplasma também podem ser observados, como os digestivos, os lisossomais e, em grande quantidade, os de glicogênio (DE LACERDA; LIRA, 2020; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

Figura 2- Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp.



Acantopódios importantes para a locomoção amebiana e núcleo central bem definido. Fonte: WOPEREIS *et al.*, 2020.

Quando os trofozoítos encontram condições desfavoráveis de pH, temperatura, UV (radiação ultravioleta), contato com produtos químicos, acúmulo de produtos metabólicos e toxinas, mudança da osmolaridade e restrição de nutrientes, eles possuem a capacidade de ficar na forma de cisto, forma de resistência, pelo processo denominado encistamento (DE LACERDA; LIRA, 2020).

O cisto apresenta dupla parede, a parede externa denominada de ectocisto, constituída principalmente de proteínas e polissacarídeos, serve de grande auxílio para que o cisto consiga sobreviver a ambientes hostis. A parede interna é denominada de endocisto, composta principalmente de celulose. O tamanho do cisto pode variar de acordo com o genótipo/espécie de *Acanthamoeba* spp., ficando em torno de 5 – 20 μm de diâmetro. Possui também poros denominados de ostíolos, usados para verificar mudanças ambientais. Quando apresenta um ambiente favorável, os trofozoítos emergem através do opérculo, uma espécie de poro, que fica localizado junto aos ostíolos e são retirados no momento de passagem dos trofozoítos (GARAJOVÁ; MRVA; VAŠKOVICOVÁ; MARTINKA *et al.*, 2019; KHAN, 2006; LORENZO-MORALES; MARTÍN-NAVARRO; LÓPEZ-ARENCIBIA; ARNALICH-MONTIEL *et al.*, 2013). Mesmo armazenados por décadas, os cistos podem permanecer viáveis (DE LACERDA; LIRA, 2020).

2.2 CLASSIFICAÇÃO *Acanthamoeba* spp.

A classificação da *Acanthamoeba* spp. foi inicialmente baseada exclusivamente nas características morfológicas do cisto, pelo fato de que os trofozoítos não apresentam características para a identificação permanente e distinta. Por causa disso, foram estabelecidos três grupos como critério para a classificação. O grupo I é constituído de espécies de cistos com ectocisto liso ou suavemente enrugado e endocisto estrelado e maior que 18 µm. As amebas desse grupo são predominantemente ambientais e não associadas a infecções em humanos e animais. O grupo II apresenta cistos de até 18 µm de diâmetro e com ectocisto enrugado e endocisto estrelado, poligonal, triangular ou oval. Esse grupo abrange a maioria das amebas associadas com infecções humanas, entre elas a ceratite amebiana e a encefalite amebiana granulomatosa. O grupo III engloba cistos de até 18 µm de diâmetro e com ectocisto fino, liso ou levemente enrugado e endocisto oval ou levemente angular. Várias espécies desse grupo também demonstraram ser patogênicas (GARAJOVÁ; MRVA; VAŠKOVICOVÁ; MARTINKA *et al.*, 2019; QVARNSTROM; NERAD; VISVESVARA, 2013).

Atualmente, *Acanthamoeba* spp. são identificadas por meio do sequenciamento do gene SSU rRNA nuclear (18S rDNA), utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). Diferentes tipos de sequências permitem a classificação genotípica, que correspondem a cada espécie distinta. Até o momento, já foram identificados 22 genótipos (T1 a T22) (Figura 3) (KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACKA, 2018); CORSARO, 2020; CORSARO; KÖHSLER; MONTALBANO DI FILIPPO; VENDITTI *et al.*, 2017; CORSARO; VENDITTI, 2010; 2018a; b; CORSARO; WALOCHNIK; KÖHSLER; ROTT, 2015; GAST, 2001; MAGNET; HENRIQUES-GIL; GALVÁN-DIAZ; IZQUIEDO *et al.*, 2014; NUPRASERT; PUTAPORNTIP; PARIYAKANOK; JONGWUTIWES, 2010; RICE; COLON; CHEN; HULL *et al.*, 2020).

As amebas relacionadas aos gêneros T2 a T6 e T10, T11 e T15 já foram relacionados a casos de CA. Ao passo que, os genótipos T1, T2, T4, T5, T10 e T12 estão associados com a encefalite amebiana granulomatosa (EAG). Contudo, os últimos genótipos identificados, T21 e T22, ainda não constam na base de dados (KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACKA, 2018).

Dentre os genótipos classificados, o T4 corresponde à maioria dos isolados de *Acanthamoeba* spp. identificados no meio ambiente e em amostras clínicas. Ela pode ser dividida em sete subtipos principais 18S (T4A, T4B, T4C, T4D, T4E, T4F e T4G). O genótipo T4, comumente isolado de casos de pacientes com CA e EAG, caracteriza-se por apresentar fatores de virulência altamente expressos e redução na sensibilidade a fármacos utilizados no tratamento das infecções acanthamebianas (CORSARO, 2020; KOT; ŁANOCHA-ARENDARCZYK; KOSIK-BOGACKA, 2018).

Figura 3 - Lista das espécies e genótipos de *Acanthamoeba* spp.

	Espécies	MG	GT	Descritor/Referência	Tipo de cepa	Coleção de cultura	Fonte original	Doença associada
	<i>A. astronyxis</i>	1	T7	Ray & Hayes 1954	Ray & Hayes	ATCC 30137	lab water, USA	AK (rare)
	<i>A. comandoni</i>	1	T9	Pussard 1964b	A1P	ATCC 30135	soil, France	AK (rare)
	<i>A. tubiashi</i>	1	T8	Lewis & Sawyer 1979	OC-15C	ATCC 30867	freshwater, USA	
	<i>A. byersi</i>	1	T1	Qvarnstrom et al. 2013	CDC-V621	ATCC PRA-411	GAE, USA	GAE
	unnamed	1	T1	Nuprasert et al. 2010	-	-	freshwater, Thailand	
	<i>A. castellani</i>	2	T4	Douglas 1930	Castellani	ATCC 50374 = 30011	yeast culture, UK	
	<i>A. lugdunensis</i>	2	T4	Pussard & Pons 1977	L3a	ATCC 50240	swimming pool, France	AK, DI
	<i>A. quina</i>	2	T4	Pussard & Pons 1977	VII3	ATCC 50241	swimming pool, France	AK
	<i>A. divionensis</i>	2	T4	Pussard & Pons 1977	AA2	ATCC 50238	soil, France	AK
	<i>A. echinulata</i>	1	D	Pussard & Pons 1977	-	ATCC 50239	compost, France	
	<i>A. mauritaniensis</i>	2	D	Pussard & Pons 1977	1652	ATCC 50253	soil, Morocco	
	<i>A. paradiivionensis</i>	2	T4	Pussard & Pons 1977	AA1	ATCC 50251	soil, France	
	<i>A. rhyodes</i>	2	D	Singh 1952	Singh	ATCC 30973	soil, UK	
	<i>A. royreba</i>	3	T4	Willaert et al. 1978	Oak Ridge	ATCC 30884; CCAP 1501/7	human tissue culture	AK
	<i>A. triangularis</i>	2	F	Pussard & Pons 1977	SH621	ATCC 50254	human feces, France	AK
	<i>A. polyphaga</i>	2	E	(Puschikarew) Page 1967	Page-23	CCAP1501/3a; ATCC 30871	freshwater, USA	AK
	<i>A. terricola</i>	2	G	Pussard 1964a	-	ATCC 30134	soil, France	
	<i>A. gigantea</i>	2	-	Schmoller 1964	25-349-MX	ATCC 50670	sea water	
	<i>A. sohi</i>	3	-	Im & Shin 2003	YM-4	-	freshwater fish, South Korea	
	<i>A. griffini</i>	2	T3	Sawyer 1971	S-7	ATCC 30731	beach bottom, USA	AK
	<i>A. pearcei</i>	2	T1	Nerad et al. 1995	205-1	ATCC 50435	sewage dump, Atlantic Ocean	AK
	<i>A. hatchetti</i>	2	T1	Sawyer et al. 1977	BH-2	ATCC 30730	brackish water, USA	AK
	<i>A. stevensoni</i>	2	T1	Sawyer et al. 1993	RB-F-1	ATCC 50388	shellfish beds, USA	
	<i>A. palestinensis</i>	3	T2	Reich 1935	Reich AC-014	CCAP 1547/1; ATCC 30870	soil, Israel	
	<i>A. pustulosa</i>	3	T2	Pussards & Pons 1977	Ge3a	ATCC 50252	swimming pool, France	
	unnamed	2 & 3	T6	Stothard et al. 1998	2802	ATCC 50708	swimming pool, France	AK
	<i>A. jacobsi</i>	3	T1	Sawyer et al. 1992; Hewett et al. 2003	31-B	ATCC 30732	marine sediment, USA	AK
	unnamed	nd	T2	present study	unknown	unknown	unknown	
	<i>A. micheli</i>	2	T1	Corsaro et al. 2015	BRO2	-	bromelia leaf, Brazil	
	unnamed	2	T1	Horn et al. 1999; Hewett et al. 2003	UWC9	ATCC PRA-3	human corneal scraping, USA	AK
	unnamed	2	T1	Corsaro & Venditti 2010	cvX	-	freshwater, Italy	AK (rare)
	<i>A. culbertsoni</i>	3	T1	Singh & Das 1970	Lilly A1	ATCC 30171	human cell culture	GAE, AK
	<i>A. healyi</i>	3	T1	Moura et al. 1992	CDC-1283.V 013	ATCC 30866	GAE, USA	GAE
	unnamed	3	T1	Gast 2001	-	-	stool, Pakistan	
	unnamed	2	T1	Gast et al. 1996	CDC-0981.V 006	ATCC 50494	GAE, USA	GAE, DI
	unnamed	2	T2	Fuerst et al. 2015; Corsaro et al. 2015	CDC-V459	-	liver, toucan	DI
	<i>A. lenticulata</i>	3	T5	Molet & Ermolief-Braun 1976	PD2S	ATCC 30841	swimming pool, France	AK, DI, GAE
	<i>A. pyriformis</i>	2	T2	Tise et al. 2016; Corsaro et al. 2017	CR15	CCAP1501/19	leaf litter, Costa Rica	

GT: Genótipo; MG: Grupo morfológico. Fonte: CORSARO, 2020.

2.3 INFECÇÕES ASSOCIADAS *Acanthamoeba* spp.

O gênero *Acanthamoeba* é conhecido por causar algumas doenças em humanos, incluindo EAG, lesões cutâneas e sinusites em pacientes imunocomprometidos e CA em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes,

principalmente usuários de lentes de contato (FANSELOW; SIRAJUDDIN; YIN; HUANG *et al.*, 2021; MARCIANO-CABRAL; CABRAL, 2003).

2.3.1 Lesões cutâneas e infecções nasofaríngeas

As lesões cutâneas e infecções nasofaríngeas são geralmente manifestações iniciais de infecção por *Acanthamoeba* spp. em pacientes imunocomprometidos e prenúncio de disseminação desse protozoário. A infecção nasofaríngea ocorre após a entrada da ameba pela cavidade nasal. Em contrapartida, a lesão cutânea se manifesta como nódulo subcutâneo violáceo e adjacente a uma lesão cutânea ulcerativa precoce. Em estágio avançado de infecção, esses nódulos progridem para úlceras que não cicatrizam (DUARTE; SATTAR; GRANWEHR; ARONSON *et al.*, 2006; KRÓL-TURMIŃSKA; OLENDER, 2017).

2.3.2 Encefalite amebiana granulomatosa (EAG)

A EAG é uma doença progressiva rara do sistema nervoso central (SNC), muitas vezes fatal. Acomete principalmente pacientes imunocomprometidos, como pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), pessoas transplantadas, com diabetes, com lúpus eritematoso sistêmico e aquelas fazendo tratamento de câncer (KALRA; SHARMA; SHYAM; TEJAN *et al.*, 2020). Todavia, a EAG também já foi relatada em pessoas imunocompetentes (SÜTÇÜ; AKTÜRK; GÜLÜMSER-ŞIŞKO; ACAR *et al.*, 2018). Mais recentemente, foi observado caso de EAG em paciente imunocompetente após infecção por SARS-CoV -2 (SIRIPURAPU; SAMAD; FATIMA; WIG *et al.*, 2021).

Sugere-se que a via de infecção ocorre após a entrada por lesão cutânea ou trato respiratório, levando a invasão das amebas pelos vasos sanguíneos alveolares, seguido pela disseminação hematogênica. Através da barreira hematoencefálica, acontece a entrada de *Acanthamoeba* spp. para o SNC. Os sintomas de EAG são parecidos com outras doenças do SNC por vírus, bactérias e fungos. Entre as doenças que podem ser semelhantes e trazem confusão no diagnóstico, estão as meningites bacteriana, tuberculosa ou viral, pois os sintomas iniciais são dor de cabeça, náusea, irritabilidade, tontura e febre baixa. Os sintomas durante a infecção podem variar desde cefaleia, febre, alterações comportamentais,

hemiparesia, letargia, rigidez do pescoço, agitação, afasia, ataxia, vômitos, náuseas, paralisia dos nervos cranianos, aumento da pressão intracraniana, até convulsões e coma (KALRA; SHARMA; SHYAM; TEJAN *et al.*, 2020; MARTINEZ; VISVESVARA, 1997; SIDDIQUI; KHAN, 2012).

O diagnóstico é feito a partir de amostras coletadas durante a cirurgia ou *pós-mortem*. Geralmente, compreende lesões de pele da face ou extremidades, biópsia de seio ou pulmão, e biópsia de tecido cerebral. O exame microscópico para achados celulares e exames de imagem do cérebro, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, são opções disponíveis para fazer o diagnóstico. Outras alternativas incluem o cultivo da ameba em meios axênicos e técnicas moleculares como a PCR (KALRA; SHARMA; SHYAM; TEJAN *et al.*, 2020).

2.3.3 Ceratite amebiana (CA)

A CA é uma infecção da córnea rara e grave, causada pela espécie *Acanthamoeba*. Essa infecção é dolorosa, difícil de diagnosticar e tratar, podendo levar à cegueira ou até enucleação. O risco da cegueira está associado com a formação de cicatrizes e ulcerações da córnea, ocasionados por maciça lesão ocular (COPE; COLLIER; SCHEIN; BROWN *et al.*, 2016; DE LACERDA; LIRA, 2020).

A maioria dos casos relatados é de imunocompetentes que fazem uso de lentes de contato (SZENTMÁRY; DAAS; SHI; LAURIK *et al.*, 2019). Contudo, também se manifesta em pacientes não usuários de lentes de contato (JAIN; GARG; MOTUKUPALLY; GEARY, 2015). Essa infecção normalmente afeta apenas um olho, mas já foram relatados casos de ceratite bilateral (COPE; COLLIER; SCHEIN; BROWN *et al.*, 2016; DART; SAW; KILVINGTON, 2009; VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007). A utilização de água da torneira, solução de limpeza para lentes contaminadas e estojo de armazenamento higienizados de forma inadequada são práticas que contribuem para a infecção ocular por *Acanthamoeba* spp. (BUCHELE; WOPEREIS; CASARA; DE MACEDO *et al.*, 2018).

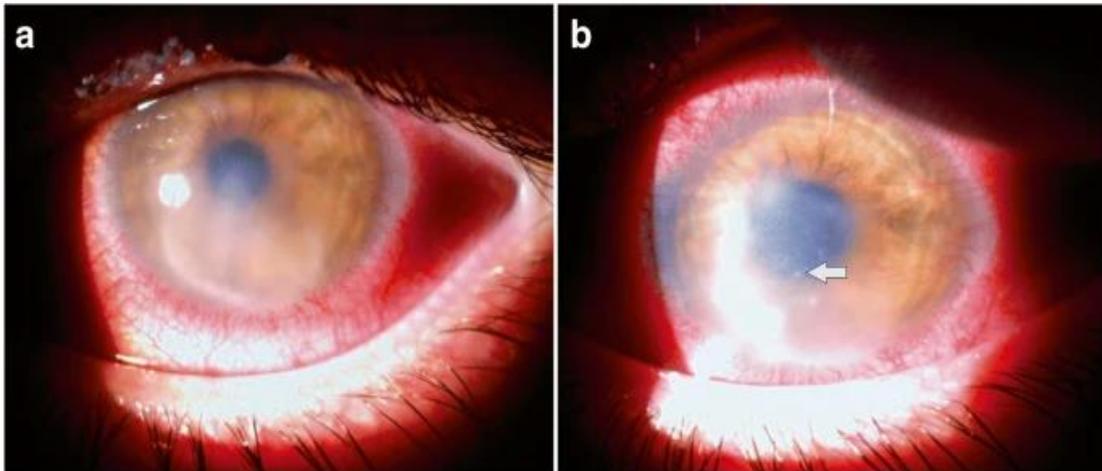
A progressão da CA consiste em duas fases principais: a fase inicial, na qual ocorre a infiltração limitada ao epitélio corneano; e a segunda fase, em que a ameba invade o estroma subjacente. Quando no estroma, ocorre elevado dano na matriz de colágeno, provocando intensa inflamação no local. Sendo assim, o

diagnóstico e o tratamento precoce são importantes, pois apresenta melhor resultado e sucesso terapêutico. Os trofozoítos de *Acanthamoeba* podem sofrer encistamento pela influência de macrófagos, podendo então esses cistos representarem risco de recidiva das lesões dos pacientes tratados anteriormente (FANSELOW; SIRAJUDDIN; YIN; HUANG *et al.*, 2021).

Os sintomas da ceratite amebiana levam dias ou semanas para aparecerem, consistem no desconforto, hiperemia conjuntival, sensação de corpo estranho, edema, lágrima hiperativa, visão turva, diminuição da visão, fotofobia e intensa dor ocular. A dor está diretamente associada ao processo inflamatório e ao grau em que os nervos da córnea estão afetados. O atraso no diagnóstico pode acometer a visão do paciente à medida que a infecção aumenta. O diagnóstico pode ser dificultado pelo fato dos sintomas descritos também serem comuns em outras infecções por fungos, bactérias e vírus. Todavia, os sinais mais comuns da CA são infiltração em forma de anel devido ao processo inflamatório no estroma, erosões epiteliais pontilhadas, opacidade subepitelial e perineural, hiperemia conjuntival e lacrimejamento (Figura 4). À medida que a infecção progride, podem ser observados outros sinais como: neovascularização, cicatrizes, inflamação central causando perda da visão, úlceras e esclerite. A sensibilidade da córnea diminui durante o processo inflamatório, com isso, os trofozoítos invadem os nervos da córnea, ocasionando neurite e necrose. Em alguns casos raros, a CA pode produzir catarata, dacrioadenite e glaucoma (DE LACERDA; LIRA, 2020).

Os fatores de risco mais comuns relacionados com a CA são: uso de lentes de contato e trabalho com agricultura. Nos dois casos, necessita-se de uma lesão prévia da córnea para ocasionar a infecção por *Acanthamoeba* spp. (DE LACERDA; LIRA, 2020).

Figura 4 -Ceratite amebiana por *Acanthamoeba* spp.



Infiltrado neutrofílico ocasionado pela infecção por *Acanthamoeba* spp, Painel a) Mostra início da formação de um anel; Painel b) A seta apresenta pontos de infiltrado denso na lesão da córnea.

Fonte: BUCHELE *et al.*, 2018

O diagnóstico da CA é necessário sempre que haja manifestações clínicas. A suspeita clínica específica e diagnóstico precoce são essenciais para evitar desfechos desfavoráveis à saúde do paciente, evitando a ocorrência de danos sérios à córnea e à visão (FANSELOW; SIRAJUDDIN; YIN; HUANG *et al.*, 2021). Como métodos de diagnóstico, pode-se citar a microscopia confocal *in vivo*, que permite o encontro de cistos e tem sensibilidade de 90% (CHOPRA; MULHOLLAND; HAU, 2020). A PCR é outro método para diagnosticar CA, esse método é feito utilizando-se amostras de raspagem da córnea (epitélio) e de biópsia da córnea, além de estojo de lentes de contato e solução de limpeza. Outros métodos são a cultura *in vitro* e a análise histopatológica da biópsia (SZENTMÁRY; DAAS; SHI; LAURIK *et al.*, 2019).

2.3.4 Tratamento das infecções por *Acanthamoeba* spp.

A terapêutica atual para as várias infecções por *Acanthamoeba* é inespecífica, na maioria das vezes, são utilizados fármacos em associação com intuito de melhorar o resultado do tratamento pela atuação sinérgica (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020). Com uma taxa de letalidade em torno de 70%, o tratamento em prol de lesões cutâneas tem-se demonstrado melhor com combinações de

anfotericina B, isetionato de pentamidina, gluconato de clorexidina, 5-fluorocitosina, fluconazol, itraconazol, cetoconazol, azitromicina, sulfadiazina e pirimetamina, em caso de sinusite acrescenta-se o desbridamento dos seios da face (RICE; COLON; CHEN; HULL *et al.*, 2020). Por outro lado, a EAG compreende uma taxa de mortalidade em torno de 90%, atualmente, o tratamento compreende a mistura de quimioterápicos combinados, incluindo antifúngicos azólicos (clotrimazol, miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol ou voriconazol) e outros medicamentos como anfotericina B, flucitosina, caspofungina, pentamidina, hidroxistilbamidina, 5 – fluorocitosina, azitromicina, rifampicina, sulfametoxazol-trimetoprim, sulfadiazina, cloranfenicol, paromicina e polimixina, mais recentemente foi incluída a miltefosina (RICE; COLON; CHEN; HULL *et al.*, 2020).

A abordagem terapêutica atual da CA é inespecífica e com alto grau de toxicidade ocular (LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015). O protocolo de tratamento depende da gravidade da doença e do estágio da infecção. A opção de terapia combinada é bem aceita, porém, nem todos os fármacos são efetivos contra ambas as formas, isto é, contra cistos e trofozoítos, como também aos diferentes genótipos de *Acanthamoeba* spp. (DE LACERDA; LIRA, 2020). Comumente, o tratamento envolve o uso de biguanidas (clorexidina 0,02% ou polihexametileno biguanida), diamidinas (isetionato de propamidina 0,1% e hexamidina) e antifúngicos azólicos. As biguanidas agem na membrana plasmática da ameba, causando danos à membrana, lise e morte. Já as diamidinas atuam interrompendo a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

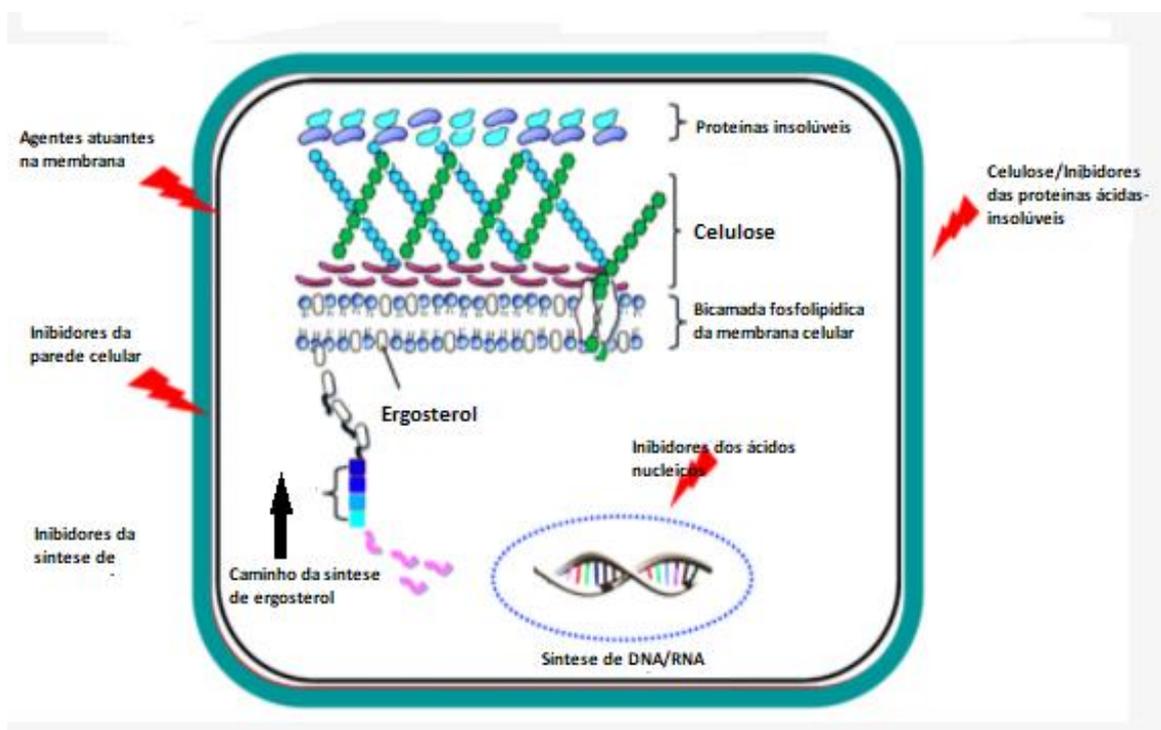
O regime de terapia atual sugere o uso dos medicamentos a cada uma hora durante 48 horas, seguido por interrupção da dosagem noturna por dois dias e concluindo por 3-4 semanas de tratamento a cada duas horas (RICE; TROTH; RUSSELL; KYLE, 2020). Apesar de relatos que mostram a eficácia da clorexidina e da propamidina contra cistos e trofozoítos de *Acanthamoeba* spp., essas opções terapêuticas são responsáveis por alguns efeitos adversos, incluindo a ceratopatia tóxica, aumento da pressão intraocular e o acréscimo da inflamação (DART; SAW; KILVINGTON, 2009; LIM; GOH; BUNCE; XING *et al.*, 2008; LORENZO-MORALES; KHAN; WALOCHNIK, 2015; LORENZO-MORALES; MARTÍN-NAVARRO; LÓPEZ-

ARENCEBIA; ARNALICH-MONTIEL *et al.*, 2013; UEKI; EGUCHI; OOGI; SHIOTA *et al.*, 2009).

As espécies de *Acanthamoeba* apresentam-se resistentes às opções terapêuticas disponíveis, muitos dos fármacos são ativos contra os trofozoítos, mas poucos são ativos contra os cistos, principalmente por sua dupla parede. Sendo assim, faz-se necessária a pesquisa de novas opções terapêuticas mais eficazes contra esse protozoário, principalmente em seu estágio de cisto (ANWAR; KHAN; SIDDIQUI, 2018).

Com base nos desafios associados ao tratamento de infecções acanthamebianas, esforços precisam ser feitos para desenvolver e testar medicamentos que atuam em vários alvos e funções (Figura 5) (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Figura 5 - Potenciais alvos de ação na *Acanthamoeba* spp.



A figura acima mostra os principais alvos que podem sofrer ação de medicamentos utilizados no tratamento de infecções por *Acanthamoeba* spp. Fonte: ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020.

Vários medicamentos e compostos já foram pesquisados e testados contra as infecções por amebas de vida livre. Os anti-sépticos acriflavina e proflavina comprometem a bicamada lipídica e a integridade da membrana agindo após se ligarem às membranas nuclear e celular (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Os análogos de fosfolípidios suprimem a biossíntese de fosfolípidios, rompendo as membranas celulares e gerando uma sinalização intracelular que induz à apoptose (ROBERTS; HENRIQUEZ, 2010). Em contrapartida, a triagem *in vitro* de derivados dos compostos heterocíclicos 1H-benzimidazol e 1H-benzotriazol, e seus análogos N-alquilados contra *A.castellanii* identificou 5,6-dimetil-1H-benzotriazol e 5,6-dibromo-1H-benzotriazol como mais cisticida que a clorexidina (KOPÁŇSKA; NAJDA; ZEBROWSKA; CHOMICZ *et al.*, 2004). A polimixina B e polimixina E atuam na membrana plasmática, possuindo efeitos contra trofozoítos e cistos *in vitro*, mas a limitação ao tratamento acompanha a nefrotoxicidade causada por esses medicamentos (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Os macrolídeos apresentam ação inibindo a tradução de proteínas, sendo que a rokitamicina já apresentou efeitos contra amebas (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020; MATTANA; BIANCU; ALBERTI; ACCARDO *et al.*, 2004). Por outro lado, os antifúngicos azólicos atuam na síntese de ergosterol pela inibição da enzima C-14 α desmetilase dependente de CYP, que auxilia na conversão de lanosterol em ergosterol (THOMSON; RICE; ZHANG; EDRADA-EBEL *et al.*, 2017).

2.4 BUSCA DE NOVOS FÁRMACOS

Apesar dos avanços na descoberta de novos fármacos para outros microrganismos, quando se fala das infecções humanas causadas por amebas de vida livre, poucos estudos são realizados. Contudo, nos últimos anos ocorreu aumento no interesse na busca de novas opções terapêuticas contra as infecções acanthamebianas. Alguns fatores podem ser citados para esse aumento na busca de terapias contra esse protozoário, como o surgimento de cepas resistentes, a dificuldade na eliminação de cistos, a alta taxa de mortalidade em infecções cerebrais, a necessidade de transplantes e perda da visão em casos de ceratite amebiana.

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia promissora para a busca de novos medicamentos eficazes contra trofozoítos e cistos de *Acanthamoeba* spp.,

com maior seletividade para o patógeno sobre o hospedeiro infectado, evitando reincidência de casos, além de diminuir o efeito tóxico e melhorar a qualidade de vida dos pacientes (SHING; SINGH; PODUST; MCKERROW *et al.*, 2020). (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Fármacos já existentes e que podem apresentar atividade em *Acanthamoeba* spp. podem progredir para ensaios clínicos randomizados e, conseqüentemente, serem utilizados no tratamento de infecções causadas por essa ameba (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

Alguns estudos já utilizaram essa abordagem na intenção de descobrir compostos e redirecioná-los para o tratamento de *Acanthamoeba* spp. Na pesquisa feita por Sifaoui e colaboradores (2019), 400 compostos presentes na Pathogen-Box[®] foram triados quanto a sua atividade citotóxica para *A. castellanii* Neff (ATCC30010). No entanto, apenas 16 compostos mostraram efeito amebicida. Já Rice e colaboradores (2020b) utilizaram para a triagem 400 compostos presentes na MMV Pandemic Response Box[®] e as espécies de *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e *A. castellanii*. No trabalho, 14 compostos apresentaram efeito contra a *A. castellanii*. Outro estudo importante de reposicionamento de fármacos foi também realizado por Rice e colaboradores (2020a), 12.000 compostos presentes na biblioteca Calibr ReFRAME foram triados em *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* e *Acanthamoeba castellanii*. Destes, 12 compostos mostraram potencial amebicida.

2.5 COVID-BOX[®]

A Covid-Box[®] é uma ferramenta criada por diversos pesquisadores com a intenção de disponibilizar gratuitamente 160 compostos ou medicamentos, todos eles com atividade prevista ou conhecida contra o vírus SARS-CoV-2.

Ainda não foi utilizada a Covid-Box[®] na intenção de descobrir compostos contra *Acanthamoeba*. Contudo, ela já foi empregada por Choi e colaboradores (2021) para avaliar sua atividade sobre a endoribonuclease SARS-CoV-2 nsp15, com intuito de identificar moléculas que pudessem inibir a atividade viral (CHOI; ZHOU; SHEK; WILSON *et al.*, 2021; RICE; TROTH; RUSSELL; KYLE, 2020; SIFAOU; REYES-BATLLE; LÓPEZ-ARENCIBIA; CHIBOUB *et al.*, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

Infecções ocasionadas por *Acanthamoeba* spp. além de se mostrarem fatais, como a encefalite amebiana granulomatosa, variando a taxa de mortalidade em torno de 90%, também pode causar traumas irreversíveis, como no caso da ceratite amebiana. As opções terapêuticas para infecções por *Acanthamoeba* spp. são inespecíficas, e na maioria das vezes utiliza-se medicamentos em combinação. Por outro lado, a resistência cística e os efeitos tóxicos gerados limitam o processo de cura. Neste contexto, a busca por novos fármacos é de grande importância, visando melhorar a terapêutica das infecções por *Acanthamoeba* spp. Neste sentido, o presente estudo realizou a triagem de compostos pelo Covid-Box[®], visando encontrar compostos com boa ação amebicida contra uma cepa de origem clínica (genótipo T4), visando selecionar moléculas com atividade anti-acanthamebiana.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anti-*Acanthamoeba* de compostos presentes no Covid-Box® na busca de novas opções terapêuticas para a ceratite amebiana e infecções disseminadas causadas pelo gênero *Acanthamoeba* spp.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar a triagem da atividade anti-trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* T4 (ATCC 50492) de compostos presentes no Covid-Box®
- ✓ Selecionar compostos ativos e avaliar a curva concentração-resposta.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos compostos selecionados em células de córnea.

5 METODOLOGIA

5.1 PREPARAÇÃO DE COMPOSTOS FORNECIDOS NO COVID-BOX®

Os compostos presentes no Covid-Box® e oriundos da *Medicines Malaria Venture* foram preparados a partir da diluição da placa estoque de 10 mM e diluídos em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO). A concentração final para a realização das triagens após as diluições foi de 10 µM em 0,1% de DMSO.

5.2 TRIAGEM DOS COMPOSTOS DA COVID-BOX® E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA EM TROFOZOÍTOS DE *ACANTHAMOEBA*.

Aproximadamente, 8×10^5 trofozoítos/mL foram incubados em placas de 96 poços com os compostos da Covid Box® na concentração de 10 µM. A lista dos compostos presentes na Covid-Box® e utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1. A avaliação da atividade antiamebiana dos compostos em *Acanthamoeba* spp. foi realizada utilizando o alamarBlue®. O alamarBlue® é um indicador de viabilidade ou morte celular que depende diretamente da mitocôndria celular para agir. Simplificadamente, a resazurina (azul) presente no alamarBlue® é convertida em resorufina (vermelho) pelas mitocôndrias de células viáveis.

Para os experimentos, as placas foram incubadas a 30 °C durante um período de 24 horas e, oito horas antes de finalizar o período de incubação, foi adicionado 10% do volume final do poço de alamarBlue®. Posteriormente, ao término do período de incubação, realizou-se a leitura por fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm de emissão e 615 nm excitação. Como controle negativo, foi utilizado DMSO 0,1% em meio proteose peptona extrato de Levedo e glicose (PYG), e ele foi considerado como 100% de viabilidade.

Tabela 1 - Lista dos compostos presentes no Covid-Box®

Compostos Placa A		Compostos Placa B	
Composto	Composto	Composto	Composto
A2 - Niclosamida	E2 - Hidroxiprogesterona	A2 - Fluspirileno	E2 - Umifenovir
A3 - Lusutrombopag	E3 - Nafamostat	A3 - Tetraciclina	E3 - MRT 68601
A4 - Bemcentinibe	E4 - Amuvatinibe	A4 - Toremifeno	E4 - PD 144418
A5 - ONO 5334	E5 - Doxiciclina	A5 - Doxorubicina	E5 - (RS)-PPCC
A6 - Remdesivir	E6 - Emetina	A6 - Rapamicina	E6 - AZ3451
A7 - N-Desethylamodiaquine	E7 - Triparanol	A7 - Ponatinibe	E7 - ZINC4326719
A8 - Ciclesonida	E8 - Clomipramina	A8 - Migalastat	E8 - Losartana
A9 - Nelfinavir	E9 - Sofosbuvir	A9 - Berbamine	E9 - Nifedipina
A10 - Etaverina	E10 - Camostat	A10 - Metformina	E10 - Anagliptina
A11 - Ritonavir	E11 - SMN-C3	A11 - Fluconazol	E11 - Desmetilferroquina
B2 - Clorprimazina	F2 - Valsartana	B2 - Lumefantrina	F2 - Nebivolol
B3 - Apilimod	F3 - Amiodarona	B3 - Anidulafungina	F3 - Aprepitanto
B4 - Regorafenibe	F4 - Ciclosporina	B4 - Hanfangchin B	F4 - Danusertib
B5 - Pexidartanibe	F5 - Ivermectina	B5 - Entacapona	F5 - Apremilast
B6 - Cetoconazol	F6 - Indometacina	B6 - Tietilperazina	F6 - (-) Anisomicina
B7 - Drotaverina	F7 - Captopril	B7 - Tacrolimus	F7 - Idelalisib
B8 - Verapamil	F8 - Ribavirina	B8 - Dabrafenibe	F8 - Darifenacina
B9 - R 7112	F9 - Sorafenibe	B9 - Dapivirine(a)	F9 - Spectinomocina
B10 - Atazanavir	F10 - ABT 239	B10 - Ácido micofenólico	F10 - Oxatomida
B11 - Ruxolitinibe	F11 - Hidroxicloroquina	B11 - Tenofovir	F11 - Prometazina
C2 - Papaverina	G2 - Benzatropina	C2 - Silmitasertib	G2 - Veliparib
C3 - GSK-369796	G3 - Manidipino	C3 - Oxiclozanida	G3 - Celecoxibe
C4 - Daclatasvir	G4 - Almitrina	C4 - Digitoxina	G4 - Cabozantinib
C5 - Lonafarnibe	G5 - Nitazoxanida	C5 - Clormidazol	G5 - Selumetinibe
C6 - Itraconazol	G6 - MK-2206	C6 - Proscillaridina	G6 - Bortezomibe
C7 - GSK 983	G7 - Terconazol	C7 - Dutacatib	G7 - Pimozida
C8 - Tioguanina	G8 - Midostaurina	C8 - PB 28	G8 - Sertindol
C9 - Tomivosertibe	G9 - Ferroquina	C9 - Baricitinibe	G9 - Boceprevir
C10 - LY 2228820	G10 - SAX-187	C10 - Eszopiclona	G10 - Valdecocibe
C11 - Tigeciclina	G11 - Abemaciclib	C11 - (+) Mefloquina	G11 - Paroxetina
D2 - Digoxina	H2 - Pevonedistate	D2 - Salinomicina	H2 - Darunavir
D3 - Amodiaquina	H3 - Tetrandrina	D3 - JQ 1	H3 - Brequinar
D4 - Astemizol	H4 - Lopinavir	D4 - RVX 208	H4 - Delanzomib
D5 - Halofantrina	H5 - Imatinibe	D5 - Osimertinibe	H5 - Delavirdina
D6 - Ravuconazol	H6 - Flufenazina	D6 - Cloperastina	H6 - Indinavir
D7 - Tizoxanida	H7 - Haloperidol	D7 - Clemastina	H7 - Abacavir
D8 - Ácido Valpróico	H8 - Ozanimod	D8 - Merimepodib	H8 - Clorotiazida
D9 - Simeprevir	H9 - Loratadina	D9 - E 52862	H9 - Apixaban
D10 - Favipiravir	H10 - Posaconazol	D10 - Doravirina	H10 - Naphtoquine
D11 - Vidofludimus	H11 - Pironaridina	D11 -Cicloheximida	H11 - Piperaquina

Estruturas moleculares e outras informações, disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/covid-box/covid-box-supporting-information>. Fonte: Autor.

5.3 AVALIAÇÃO DA CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA

Para estes ensaios, 8×10^5 trofozoítos/mL foram incubados em placas de 96 poços. Os fármacos ciclesonida e a prometazina foram testados nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2,5 μM . A viabilidade dos trofozoítos foi avaliada utilizando o alamarBlue®.

As placas foram incubadas à 30 °C durante um período de 24 horas e, oito horas antes de finalizar o período de incubação, e foi adicionado 10% do volume final do poço de alamarBlue®. Posteriormente, ao término do período de incubação, realizou-se a leitura por fluorescência nos seguintes comprimentos de onda: 530 nm de emissão e 615 nm excitação. Como controle negativo, foi utilizado DMSO 0,1% em meio PYG, e ele foi considerado como 100% de viabilidade.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS SELECIONADOS FRENTE CÉLULAS SIRC

As células de córnea de coelho (SIRC – ATCCC® - CCL 60) foram mantidas em garrafas de 75 cm² em meio de cultivo RPMI suplementado com 2 mM de glutamina, 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), incubadas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂.

Em placas de 96 poços, foram semeadas 5×10^5 células SIRC/poço e incubadas por 24 horas. Após, as culturas foram tratadas na concentração de 10 μM dos compostos selecionados na Covid-Box® e incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI, como controle de viabilidade foi utilizado meio RPMI com DMSO 0,1% e como controle positivo foi utilizado clorexidina a 10 μM .

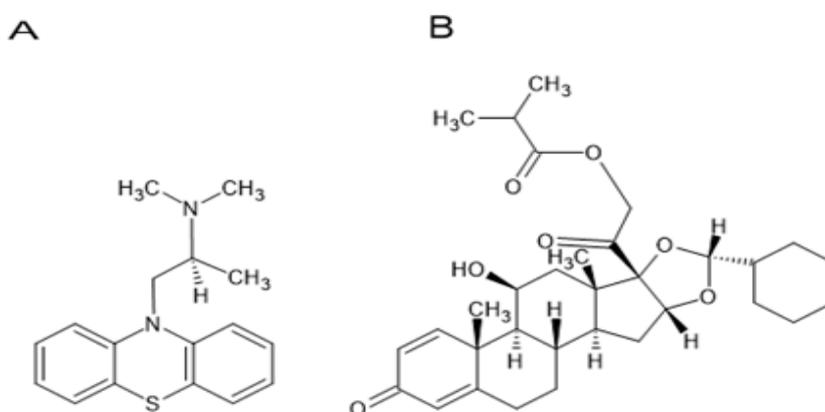
Para avaliação da citotoxicidade foi utilizado o ensaio de MTT 0,5 mg/mL (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio). O MTT auxilia na determinação de células viáveis, após a conversão de MTT solúvel em água em formazan insolúvel, a leitura pode ser realizada após a solubilização do formazan com DMSO. A leitura foi realizada pelo espectrofotômetro em comprimento de onda de

540 nm. Os resultados obtidos foram expressos como porcentagem de células viáveis, média e desvio padrão das triplicatas.

5.5 PROMETAZINA E CICLESONIDA

A ciclesonida é um pró-fármaco inalatório, corticosteroide não halogenado, sintético, com atividades anti-inflamatórias que é convertida por esterases locais em seu metabólito ativo desisobutilil-ciclesonida (PUBCHEM.COM, 2021). A ciclesonida é um pró-fármaco glicocorticoide inalatório, que é ativado em contato com as esterases presentes no pulmão. Ele é um medicamento utilizado no tratamento de rinite alérgica e asma (SCHAFFNER; SKONER, 2009). A prometazina é um composto aromático policíclico que contém um grupo fenotiazina, constituindo de dois anéis de benzeno unidos por um anel para-tiazina (BAIG; KATYARA; RAJABALI; KHALEEQ *et al.*, 2019). Ela age como antagonista da histamina nos receptores H1 e é usado como anti-histamínicos em humanos para várias doenças como urticária, conjuntivite alérgica e rinite alérgica. Adicionalmente, a prometazina atua como agente antimuscarínico, antiserotonérgico, antidopaminérgico, antihistaminérgico e também age como antagonista da calmodulina (CaM) (BAIG; KATYARA; RAJABALI; KHALEEQ *et al.*, 2019). A estrutura da ciclesonida e prometazina estão representadas na Figura 6.

Figura 6 - Estrutura química da ciclesonida e prometazina.



Estrutura química prometazina (Painel A) e ciclesonida (Painel B). Fonte: Autor

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPadPrisma 5.0. Os dados foram apresentados como média e desvio padrão, e foi utilizado o teste de análise de variâncias de uma via (ANOVA de uma via) com pós-teste de Turkey. O nível de significância adotado para os ensaios foi definido como $P \leq 0,05$. A avaliação do perfil de inibição dos compostos foi realizada em comparação ao controle negativo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

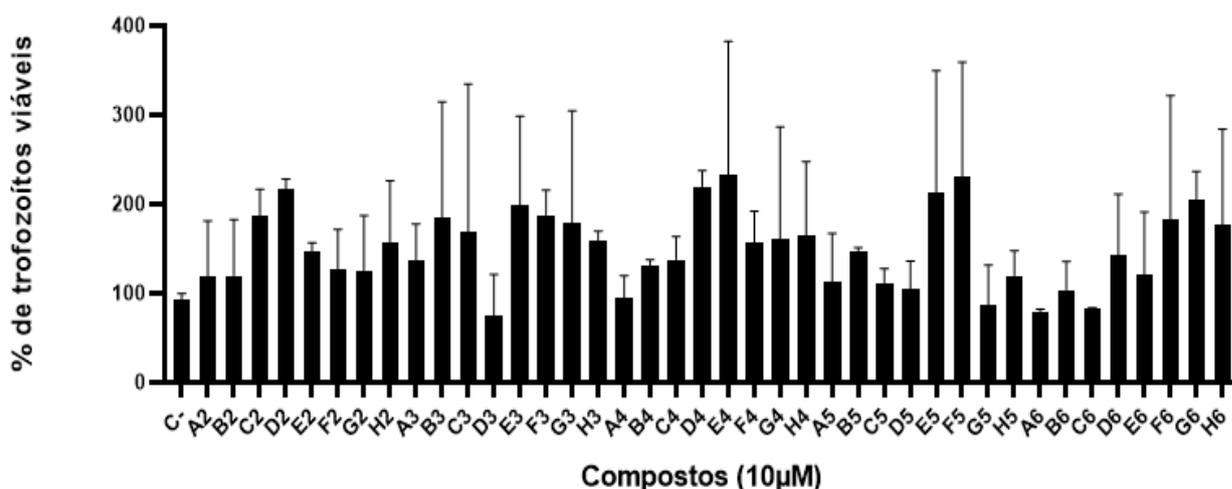
6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TROFOZOITICA DE COMPOSTOS PRESENTES NA COVID-BOX®.

A Covid-Box® é uma ferramenta que foi criada pela *Medicines for Malaria Venture* com o objetivo de encontrar novos fármacos que possam atuar contra o vírus SARS-CoV-2. Para este estudo, os 160 compostos presentes na Covid-Box® foram avaliados em trofozoítos de *A. castellanii* T4 (ATCC 50492) na concentração de 10 µM, após incubação de 24 horas.

Os resultados obtidos são demonstrados nas Figuras de 7 a 10. Nota-se que apenas dois compostos mostraram ter ação significativa em trofozoítos, são eles: A8 (Figura 8) e F11 (Figura 10).

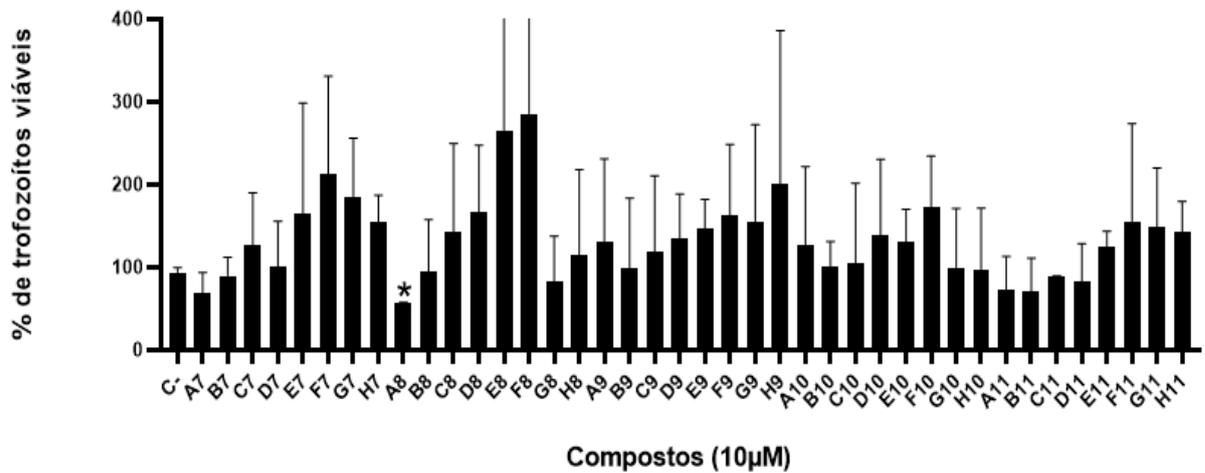
Pode-se perceber que muitos compostos apresentaram desvio padrão muito alto. Isso pode ser explicado pelo fato do congelamento/descongelamento constante da placa pode levar à instabilidade dos compostos (VENTURE, 2020).

Figura 7- Viabilidade de trofozoítos dos primeiros 40 compostos da placa A (A2 a H6).



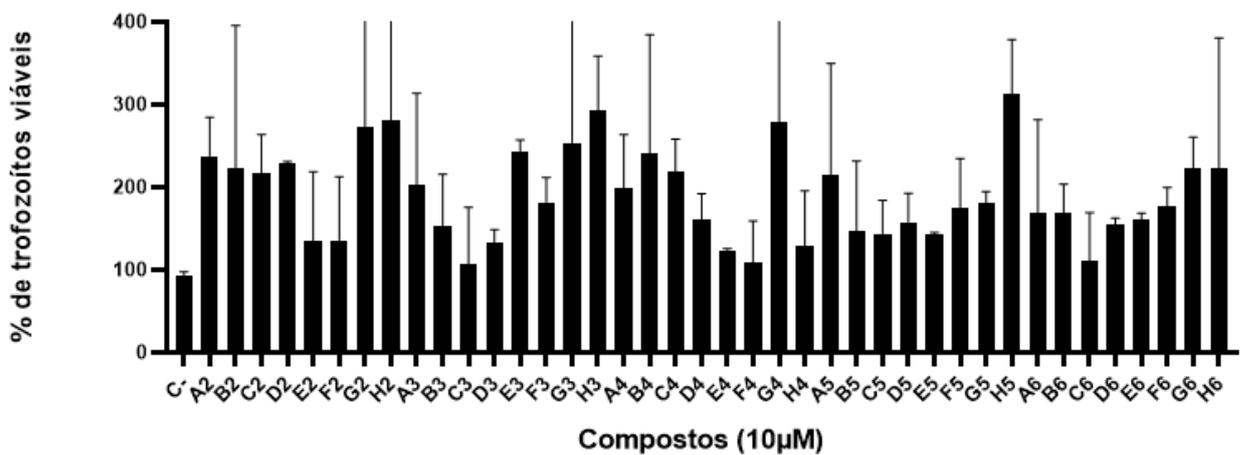
Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 10 µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

Figura 8 - Viabilidade de trofozoítos dos 40 compostos restantes da placa A (A7 a H11).



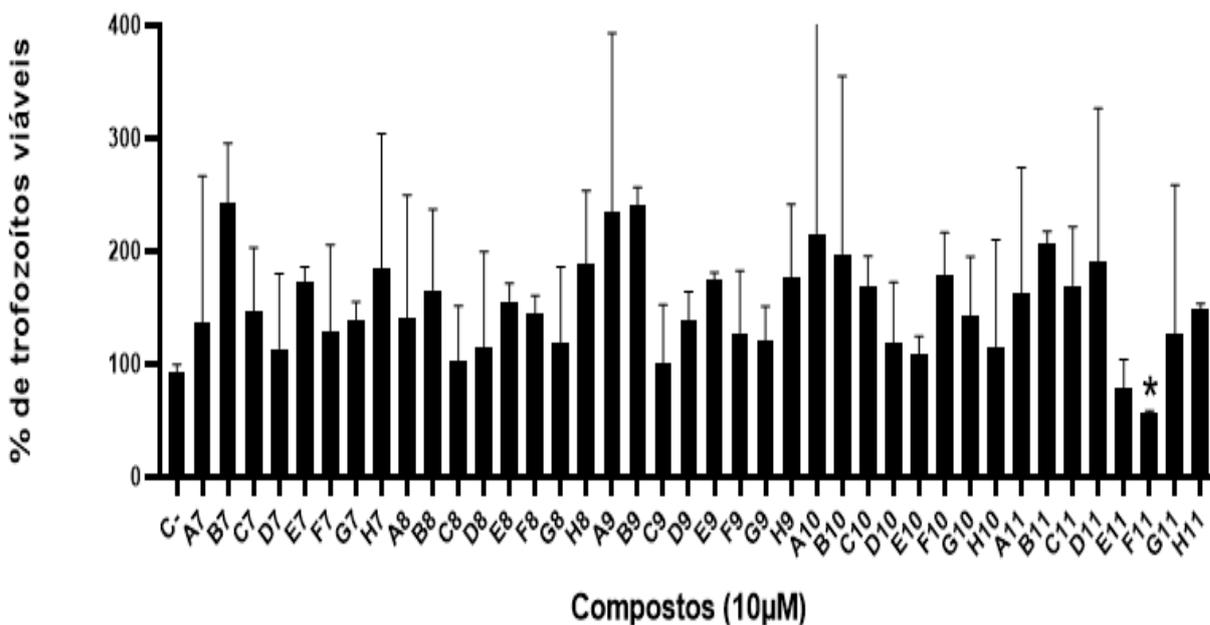
Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 10 µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

Figura 9 - Viabilidade de trofozoítos dos primeiros 40 compostos da placa B (A2 a H6).



Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 10 µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

Figura 10 - Viabilidade de trofozoítos dos 40 compostos restantes da placa A (A7 a H11).



Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 10 µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. C+: clorexidina. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

Os compostos A8 (ciclesonida) e F11 (prometazina) mostraram-se ativos em trofozoítos, com diminuição da viabilidade de $35,01 \pm 5,09 \%$ e $34,66 \pm 5,16 \%$ respectivamente. Na análise microscópica, os poços contendo ciclesonida e prometazina apresentaram diminuição no número de trofozoítos em comparação ao controle negativo, com vacuolizações e com grande emissão de acantopódios. Além de restos celulares e sem indução da formação de cistos.

A ciclesonida é um pró-fármaco inalatório, corticosteroide não halogenado, sintético, com atividades anti-inflamatórias que é convertida por esterases locais em seu metabólito ativo desisobutiril-ciclesonida. A *Acanthamoeba* spp. apresenta expressão de esterases, sendo assim podemos pensar que o mecanismo de atividade do medicamento nesse protozoário está relacionado com o metabólito ativo desisobutiril-ciclesonida, podendo ele agir frente aos trofozoítos. Sendo assim, outros estudos são necessários para avaliar o real efeito sobre as amebas. O papel dos corticocorticoides tópicos é controverso no tratamento das infecções acanthamebianas. O estudo in vivo feito por McClellan e colaboradores (2001) mostrou que os corticosteroides apresentaram maior incidência, gravidade e

cronicidade da ceratite. Em contrapartida, alguns estudos in vitro já foram realizados frente a *Acanthamoeba* spp. Dart e colaboradores (2009) acreditam que eles podem ter papel importante e benéfico no manejo de alguns casos de CA. Por outro lado, um estudo feito por Rahimi e colaboradores (2015) mostrou que o maior uso de corticosteroides está associado com maior duração no tratamento, mas não é um fator significativo em piores resultados visuais. Em contrapartida, Robaei e colaboradores (2014) associaram os corticosteroides a piores desfechos da doença. Um estudo feito por Livingstone e colaboradores (2013) mostrou que a clorexidina pode interagir com a dexametasona e formar um precipitado amorfo, fato que pode ser explicado pela clorexidina ser capaz de formar sais quando em associação com ânions como fosfato, sulfato e carboxilatos.

O presente estudo demonstrou que a ciclesonida apresenta atividade contra trofozoítos. O fato dos efeitos negativos já estudados pelo uso de corticosteróides tópicos em casos de CA pode estar associado ao uso conjunto de clorexidina, formando precipitados, aumentando a toxicidade ocular e os danos na córnea.

Outro composto que apresentou bons resultados na triagem desse trabalho foi a prometazina, esse composto age como antagonista da histamina nos receptores H1 e é usado como anti-histamínicos em humanos para várias doenças, como urticária, conjuntivite alérgica e rinite alérgica. Adicionalmente, a prometazina atua como agente antimuscarínico, antiserotonérgico, antidopaminérgico, antihistaminérgico e também age como antagonista da calmodulina (CaM) (BAIG; KATYARA; RAJABALI; KHALEEQ *et al.*, 2019). O estudo feito por Baig e colaboradores (2019) mostrou que a *Acanthamoeba* spp. apresenta CaM parecida com as dos humanos, caracterizando ser um possível alvo de ação desse fármaco no protozoário, além disso, a prometazina pode exercer possível antagonismo do receptor biogênico da amina.

A prometazina também pode causar efeito contra a *Acanthamoeba* spp. por mecanismos específicos como o antagonismo alostérico dos receptores H1 e M1 muscarínico, dopaminérgico e serotonérgico, que são os alvos conhecidos da prometazina em humanos. Além da mudança de concentração de íons Ca^{2+} e pelo

efeito inibitório da prometazina na CaM (BAIG; KATYARA; RAJABALI; KHALEEQ *et al.*, 2019).

O reposicionamento de fármacos se torna uma opção promissora na busca de novos fármacos para o tratamento de doenças causadas pelo gênero *Acanthamoeba*. Esse protozoário apresenta-se contendo vários alvos disponíveis, que podem sofrer tanto ação de compostos já oferecidos, quanto aqueles que ainda possam vir a ser sintetizados (ELSHEIKHA; SIDDIQUI; KHAN, 2020).

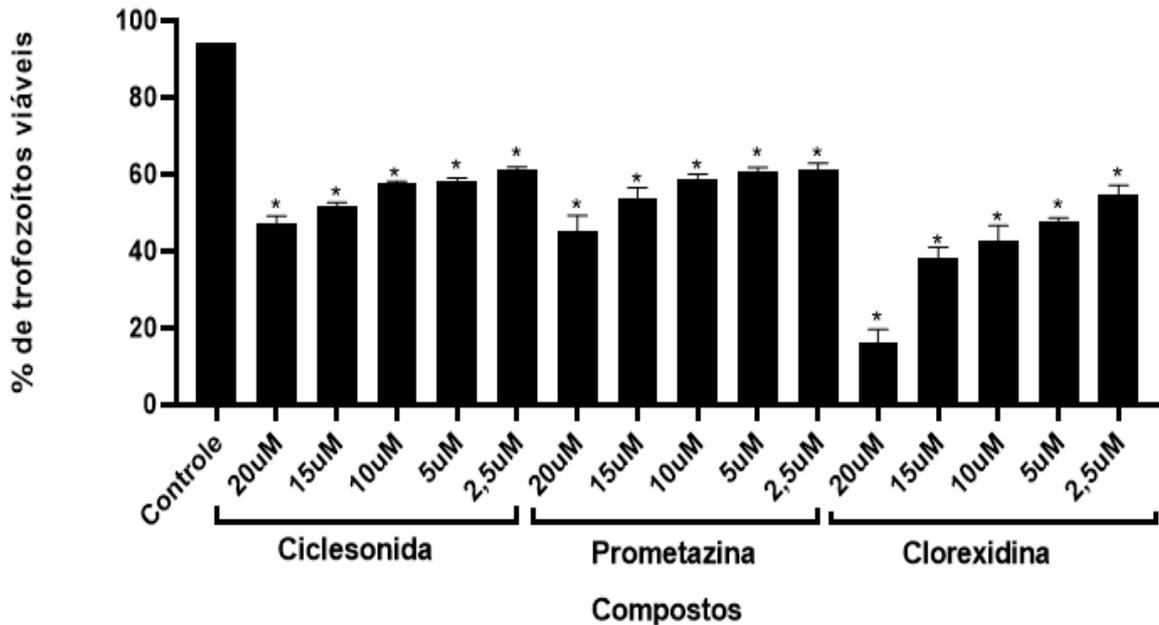
Diante dos resultados obtidos na triagem, a ciclesonida e a prometazina foram selecionados para fazer a avaliação da curva concentração-resposta na intenção de calcular a IC50 e avaliar citotoxicidade dos compostos a células SIRC.

6.2 Avaliação da atividade anti-*acanthamoeba* da ciclesonida e prometazina

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 11, na qual se pode observar que a ciclesonida nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2,5 μM obteve a inibição amebiana de $46,83 \pm 3,7\%$, $41,51 \pm 2,2\%$, $36,17 \pm 0,6\%$, $35,69 \pm 1,2\%$ e $32,92 \pm 1,4\%$, respectivamente. Por outro lado, a prometazina nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2,5 μM apresentou inibição dos trofozoítos de $48,66 \pm 7,1\%$, $40,39 \pm 5,1\%$, $35,45 \pm 2,6\%$, $33,16 \pm 1,7\%$ e $32,99 \pm 3,3\%$, respectivamente.

A clorexidina foi utilizada como controle positivo durante nessa etapa, e apresentou valores inibitórios da frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* nas concentrações de 20, 15, 10, 5 e 2,5 μM foram de $78,03 \pm 5,3\%$, $55,65 \pm 3,9\%$, $51,19 \pm 5,6\%$, $46,27 \pm 1,2\%$ e $39,29 \pm 3,6\%$, respectivamente. Observamos que o valor de IC50 para a clorexidina neste teste está entre 5 e 10 μM .

Figura 11 - Avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* da ciclesonida, prometazina e clorexidina.



Ensaio de viabilidade de cepa SIRC – ATCCC® - CCL 60 após incubação por 24 h com concentração de 10µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,1% em meio PYG. C+: clorexidina. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

Na avaliação da atividade anti-*Acanthamoeba* realizada neste estudo, a prometazina na concentração de 20 µM inibiu $48,66 \pm 7,1\%$ dos trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*. No estudo feito por Baig e colaboradores (2019), que utilizou a *Acanthamoeba castellanii* (T4), mostrou que, nas concentrações de 110 µM e 220 µM, a prometazina apresentou efeitos antiproliferativos moderados, já nas concentrações de 880 µM e 1,8 mM o composto inibiu por completo o crescimento dos trofozoítos de *Acanthamoeba* após 24 horas de exposição.

Outros compostos fenotiazínicos também já foram testados em outras amebas de vida livre, incluindo *Acanthamoeba* spp. Desde 1984, os compostos fenotiazínicos estão sendo relatados como inibidores de amebas de vida livre (SCHUSTER; MANDEL, 1984). Um estudo *in vitro* feito por Mattana e colaboradores (2004), empregando trofozoítos de *A. castellanii*, mostrou que a clorpromazina na concentração de 4,8 µM inibiu 100% das amebas. Embora a clorpromazina possa se acumular no SNC, tornando-a boa candidata à terapia para amebas que causam

infecções no SNC, seu uso é dificultado pela potencial toxicidade (MATTANA; BIANCU; ALBERTI; ACCARDO *et al.*, 2004). No estudo feito por Baig e colaboradores (2013), utilizando a proclorperazina em trofozoítos de *A. castellanii*, mostrou-se que, após 24 horas, a proclorperazina na concentração de 66,8 µM apresentou boa inibição frente a trofozoítos de *Acanthamoeba* spp.

A clorexidina é um dos compostos de primeira escolha no tratamento de ceratite amebiana causada por *Acanthamoeba*, vários estudos avaliando a dose-resposta desse composto já foram realizados. No ensaio feito por McBride e colaboradores, em *Acanthamoeba castellanii*, mostrou-se que a clorexidina conseguiu inibir 50% das amebas usando o ensaio colorimétrico alamarBlue® e contagem manual, respectivamente. Em outro estudo utilizando alamarBlue®, Martín-Navarro e colaboradores (2008) alcançaram IC50 em trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010). Por fim, no estudo feito por Ortega-Rivas e colaboradores (2016), em trofozoítos de *A. castellanii* Neff (T4) e genótipo T3, também foi possível determinar a IC50, sendo que neste ensaio foi utilizado o ensaio colorimétrico baseado na coloração com sulforhodamina B (SRB).

Podemos observar que a IC50 alcançada pela clorexidina nesse trabalho (5 e 10 µM), está próximo daqueles já reportados na literatura e que já foram descritos anteriormente. Percebe-se que, apesar de que muitos estudos já tenham sido feitos com intenção de descobrir novos medicamentos ativos contra *Acanthamoeba* spp, a clorexidina permanece tendo a melhor resposta e, conseqüentemente, continua sendo usada no tratamento de CA.

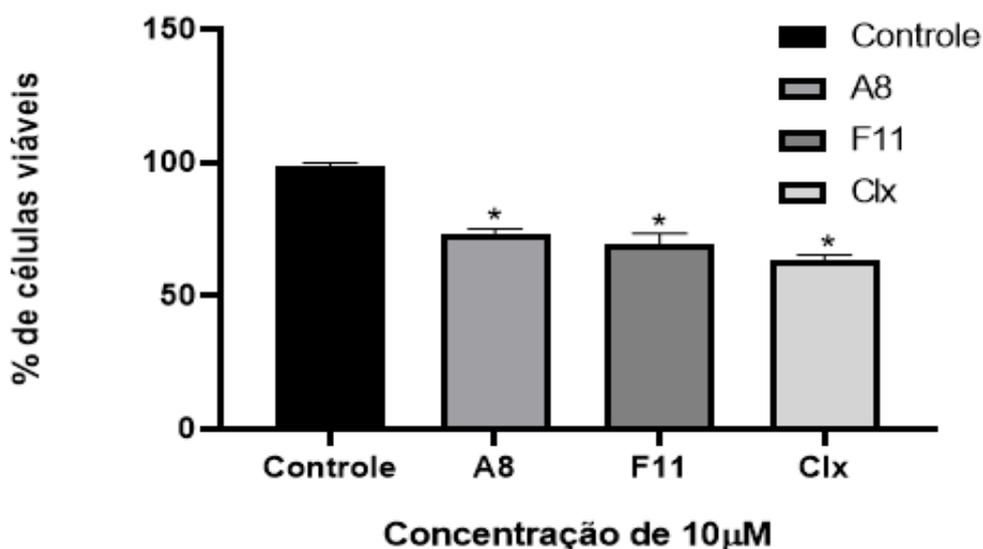
O presente trabalho descreve pela primeira vez a ação anti-*Acanthamoeba* da ciclesonida. Apesar do medicamento ser utilizado como por via inalatória, podem ser desenvolvidas novas formulações que viabilizem a sua utilização em infecções causadas por *Acanthamoeba* spp.

6.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em células SIRC

A clorexidina pode causar toxicidade ocular quando utilizada no tratamento de CA. Por isso, avaliou-se a toxicidade do composto a células de córnea (SIRC). Os resultados obtidos estão apontados na Figura 12. A ciclesonida apresentou 74,53 ±

4,1% das células de córnea viáveis, já a prometazina apresentou $70,74 \pm 7,7\%$ de células viáveis. Em contrapartida, a clorexidina exibiu $64,83 \pm 4,0\%$ de viabilidade das células de córnea. O controle de viabilidade (DMSO 0,1%) apresentou viabilidade de 98,35%. Como pode-se observar, este estudo mostrou que a ciclesonida e prometazina apresentaram menor porcentagem de inibição das células de córnea em relação à clorexidina. Contudo, quando comparado os compostos com o controle positivo (clorexidina), não foi observada diferença significativa.

Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade em células SIRC



Ensaio de viabilidade de cepa ATCC50492 após incubação por 24 h com 2,5, 5, 10, 15 e 20µM de compostos presentes no Covid-Box®. C-: Controle negativo, DMSO 0,2% em meio PYG. *Valor de $P \leq 0,05$ comparado com o controle negativo (ANOVA de uma via e pós-teste Turkey). Fonte: Autor

As infecções causadas pelo gênero *Acanthamoeba* são difíceis de se tratar, a maioria dos casos de EAG chegam a óbito. Já a CA, na maioria dos casos, é difícil de ser tratada e apresenta risco grande de toxicidade ocular pelos medicamentos utilizados. Neste contexto, esse trabalho usou a triagem de fármacos reposicionáveis, na intenção de encontrar compostos que apresentassem efeito sobre trofozoítos. Ao todo, 160 compostos foram triados contra trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii*, mas apenas a ciclesonida e a prometazina apresentaram potencial efeito amebicida.

A clorexidina é um dos medicamentos de primeira escolha para tratar a CA, mas apresenta elevado grau de toxicidade ocular. Sendo assim, este estudo apresentou resultados promissores de dois compostos, mesmo eles apresentando menor efeito amebicida em comparação a clorexidina, mostraram menor porcentagem de toxicidade ocular que a clorexidina frente a células de córnea. Sendo assim, estudos futuros são necessários para compreender melhor o efeito desses compostos contra *Acanthamoeba* spp., bem como relação estrutura atividade.

A relação estrutura atividade é uma avaliação importante. A partir de um composto inicial pode-se conduzir o planejamento de outros análogos na intenção de ampliar a atividade e efeitos frente a *Acanthamoeba* spp. Como protótipo inicial pode ser usado os compostos que tiveram bons resultados neste estudo, com a intenção de melhorar seus efeitos antiamebianos.

Outra perspectiva importante seria realizar a avaliação de sinergia entre esses compostos e os medicamentos já utilizados, que podem ser considerados no tratamento por infecções pelo gênero *Acanthamoeba*. Poucos estudos já avaliaram a possibilidade de sinergia no tratamento de CA, mesmo com aqueles já usados na prática clínica (TALBOTT; CEVALLOS; CHEN; CHIN *et al.*, 2019). Em um teste *in vitro* de sinergismo feito por Talbott e colaboradores (2019), mostrou-se que a clorexidina e a propamidina usadas em contraste tiveram efeito cisticida a todos os isolados clínicos de *Acanthamoeba*. Já, quando se usou voriconazol em conjunto aos outros medicamentos, o efeito cisticida não foi observado. Além disso, Talbott e colaboradores (2019), observaram que o voriconazol foi um potente antagonista de propamidina e clorexidina, reduzindo a atividade cisticida desses dois agentes. Com esse possível efeito antagonista, foi especulado que o voriconazol inibe a lanosterol 14 α -desmetilase dependente do citocromo P450, uma enzima crucial para a síntese de ergosterol da membrana celular, sendo possível que a interrupção da síntese de ergosterol altere o alvo da clorexidina, que também atinge as membranas celulares.

Sendo assim, pode-se pensar que a ciclesonida e a prometazina atuam sobre mecanismos diferentes da clorexidina, não interferindo em seu efeito sobre a *Acanthamoeba* spp.

O presente trabalho permitiu identificar dois compostos ativos frente a trofozoítos de *A. castellanii* e com baixo potencial citotóxico, que poderão servir como

protótipo no estudo de novas moléculas ativas, estudos de sinergia, visando melhorar a terapêutica das infecções por *Acanthamoeba* spp.

7 CONCLUSÕES

- Dos 160 compostos analisados, dois, ciclesonida e a prometazina, demonstraram efeito antiamebiano em trofozoítos de *A. castellanii* (T4) e ambos os compostos mostraram menor efeito que o controle positivo;
- A ciclesonida e a prometazina apresentaram baixo potencial citotóxico para células de córnea;
- Não foi possível determinar a IC50 da ciclesonida e prometazina a partir da faixa de concentração avaliada;
- O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, a atividade antiamebiana da ciclesonida em trofozoítos de *A. castellanii*.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar o efeito antiamebiano dos compostos com atividade contra cistos de *A. castellanii*.
- Determinar a IC50 dos compostos com atividade contra trofozoítos de *A. castellanii* e determinar o índice de seletividade.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAOUF, K.; BRAGGS, K. H.; YIN, T.; TRUONG, L. D. *et al.* Characterization of polymyxin B-induced nephrotoxicity: implications for dosing regimen design. **Antimicrob Agents Chemother**, 56, n. 9, p. 4625-4629, Sep 2012.
- ANWAR, A.; KHAN, N. A.; SIDDIQUI, R. Combating Acanthamoeba spp. cysts: what are the options? **Parasit Vectors**, 11, n. 1, p. 26, 01 2018.
- BAIG, A. M. Innovative Methodology in the Discovery of Novel Drug Targets in the Free-Living Amoebae. **Curr Drug Targets**, 20, n. 1, p. 60-69, 2019.
- BAIG, A. M.; IQBAL, J.; KHAN, N. A. In vitro efficacies of clinically available drugs against growth and viability of an Acanthamoeba castellanii keratitis isolate belonging to the T4 genotype. **Antimicrob Agents Chemother**, 57, n. 8, p. 3561-3567, Aug 2013.
- BAIG, A. M.; KATYARA, P.; RAJABALI, M. N.; KHALEEQ, A. *et al.* Neuroleptic Drug Targets a Brain-Eating Amoeba: Effects of Promethazine on Neurotropic Acanthamoeba castellanii. **ACS Chem Neurosci**, 10, n. 6, p. 2868-2876, 06 19 2019.
- BUCHELE, M. L. C.; WOPEREIS, D. B.; CASARA, F.; DE MACEDO, J. P. *et al.* Contact lens-related polymicrobial keratitis: Acanthamoeba spp. genotype T4 and Candida albicans. **Parasitol Res**, 117, n. 11, p. 3431-3436, Nov 2018.
- CHOI, R.; ZHOU, M.; SHEK, R.; WILSON, J. W. *et al.* High-throughput screening of the ReFRAME, Pandemic Box, and COVID Box drug repurposing libraries against SARS-CoV-2 nsp15 endoribonuclease to identify small-molecule inhibitors of viral activity. **PLoS One**, 16, n. 4, p. e0250019, 2021.
- CHOPRA, R.; MULHOLLAND, P. J.; HAU, S. C. In Vivo Confocal Microscopy Morphologic Features and Cyst Density in Acanthamoeba Keratitis. **Am J Ophthalmol**, 217, p. 38-48, 09 2020.
- COPE, J. R.; COLLIER, S. A.; SCHEIN, O. D.; BROWN, A. C. *et al.* Acanthamoeba Keratitis among Rigid Gas Permeable Contact Lens Wearers in the United States, 2005 through 2011. **Ophthalmology**, 123, n. 7, p. 1435-1441, 07 2016.
- CORSARO, D. Update on Acanthamoeba phylogeny. **Parasitol Res**, 119, n. 10, p. 3327-3338, Oct 2020.
- CORSARO, D.; KÖHSLER, M.; MONTALBANO DI FILIPPO, M.; VENDITTI, D. *et al.* Update on Acanthamoeba jacobsi genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. **Parasitol Res**, 116, n. 4, p. 1273-1284, Apr 2017.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). **Parasitol Res**, 107, n. 1, p. 233-238, Jun 2010.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. An apparent *Acanthamoeba* genotype is the product of a chimeric 18S rDNA artifact. **Parasitol Res**, 117, n. 2, p. 571-577, Feb 2018a.

CORSARO, D.; VENDITTI, D. Nuclear Group I introns with homing endonuclease genes in *Acanthamoeba* genotype T4. **Eur J Protistol**, 66, p. 26-35, Oct 2018b.

CORSARO, D.; WALOCHNIK, J.; KÖHSLER, M.; ROTT, M. B. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). **Parasitol Res**, 114, n. 7, p. 2481-2490, Jul 2015.

DART, J. K.; SAW, V. P.; KILVINGTON, S. *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis and treatment update 2009. **Am J Ophthalmol**, 148, n. 4, p. 487-499.e482, Oct 2009.

DE LACERDA, A. G.; LIRA, M. *Acanthamoeba keratitis*: a review of biology, pathophysiology and epidemiology. **Ophthalmic Physiol Opt**, Oct 2020.

DUARTE, A. G.; SATTAR, F.; GRANWEHR, B.; ARONSON, J. F. *et al.* Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. **J Heart Lung Transplant**, 25, n. 2, p. 237-240, Feb 2006.

ELSHEIKHA, H. M.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Drug Discovery against. **Pathogens**, 9, n. 5, May 2020.

FANSELOW, N.; SIRAJUDDIN, N.; YIN, X. T.; HUANG, A. J. W. *et al.* Keratitis, Pathology, Diagnosis and Treatment. **Pathogens**, 10, n. 3, Mar 10 2021.

FARRA, A.; BEKONDI, C.; TRICOU, V.; MBECKO, J. R. *et al.* Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: epidemiological and molecular aspects. **Pan Afr Med J**, 26, p. 57, 2017.

FICKER, L.; SEAL, D.; WARHURST, D.; WRIGHT, P. *Acanthamoeba keratitis*-- resistance to medical therapy. **Eye (Lond)**, 4 (Pt 6), p. 835-838, 1990.

FOWLER, M.; CARTER, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. **Br Med J**, 2, n. 5464, p. 740-742, Sep 25 1965.

FUERST, P. A. Insights from the DNA databases: approaches to the phylogenetic structure of *Acanthamoeba*. **Exp Parasitol**, 145 Suppl, p. S39-45, Nov 2014.

GARAJOVÁ, M.; MRVA, M.; VAŠKOVICOVÁ, N.; MARTINKA, M. *et al.* Cellulose fibrils formation and organisation of cytoskeleton during encystment are essential for *Acanthamoeba* cyst wall architecture. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 4466, 03 2019.

GAST, R. J. Development of an Acanthamoeba-specific reverse dot-blot and the discovery of a new ribotype. **J Eukaryot Microbiol**, 48, n. 6, p. 609-615, 2001 Nov-Dec 2001.

HARA, T.; YAGITA, K.; SUGITA, Y. Pathogenic free-living amoebic encephalitis in Japan. **Neuropathology**, 39, n. 4, p. 251-258, Aug 2019.

HENNESSEY, K. M.; ROGIERS, I. C.; SHIH, H. W.; HULVERSON, M. A. *et al.* Screening of the Pathogen Box for inhibitors with dual efficacy against *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum*. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 8, p. e0006673, 08 2018.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, D.; REYES-BATLLE, M.; CASTELAN-RAMÍREZ, I.; HERNÁNDEZ-OLMOS, P. *et al.* Evaluation of the sensitivity to chlorhexidine, voriconazole and itraconazole of T4 genotype *Acanthamoeba* isolated from Mexico. **Exp Parasitol**, 197, p. 29-35, Feb 2019.

JAGER, B. V.; STAMM, W. P. BRAIN ABSCESSSES CAUSED BY FREELIVING AMŒBA PROBABLY OF THE GENUS HARTMANNELLA IN A PATIENT WITH HODGKIN'S DISEASE. **The Lancet**, p. 3, 1972.

JAIN, R.; GARG, P.; MOTUKUPALLY, S. R.; GEARY, M. B. Clinico-microbiological review of non-contact-lens-associated acanthamoeba keratitis. **Semin Ophthalmol**, 30, n. 4, p. 281-288, Jul 2015.

JEONG, J.; KIM, G.; MOON, C.; KIM, H. J. *et al.* Pathogen Box screening for hit identification against *Mycobacterium abscessus*. **PLoS One**, 13, n. 4, p. e0195595, 2018.

KALRA, S. K.; SHARMA, P.; SHYAM, K.; TEJAN, N. *et al.* *Acanthamoeba* and its pathogenic role in granulomatous amebic encephalitis. **Exp Parasitol**, 208, p. 107788, Jan 2020.

KARAMATI, S. A.; NIYYATI, M.; LORENZO-MORALES, J.; LASJERDI, Z. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. **Acta Parasitol**, 61, n. 4, p. 784-789, Dec 2016.

KHAN, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. **FEMS Microbiol Rev**, 30, n. 4, p. 564-595, Jul 2006.

KOPAŃSKA, K.; NAJDA, A.; ZEBROWSKA, J.; CHOMICZ, L. *et al.* Synthesis and activity of 1H-benzimidazole and 1H-benzotriazole derivatives as inhibitors of *Acanthamoeba castellanii*. **Bioorg Med Chem**, 12, n. 10, p. 2617-2624, May 15 2004.

KOT, K.; ŁANOCHA-ARENDARCZYK, N. A.; KOSIK-BOGACKA, D. I. Amoebas from the genus *Acanthamoeba* and their pathogenic properties. **Ann Parasitol**, 64, n. 4, p. 299-308, 2018 2018.

KRÓL-TURMIŃSKA, K.; OLENDER, A. Human infections caused by free-living amoebae. **Ann Agric Environ Med**, 24, n. 2, p. 254-260, May 2017.

KUTNER, A.; ALDRICH, M.; PATEL, S.; KANG, J. J. *et al.* *Acanthamoeba* endophthalmitis during treatment for cutaneous disease in a renal transplant patient. **Transpl Infect Dis**, 20, n. 2, p. e12843, Apr 2018.

LASJERDI, Z.; NIYYATI, M.; HAGHIGHI, A.; SHAHABI, S. *et al.* Potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hospital wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. **Parasitol Res**, 109, n. 3, p. 575-580, Sep 2011.

LEAL, D. A. G.; SOUZA, D. S. M.; CAUMO, K. S.; FONGARO, G. *et al.* Genotypic characterization and assessment of infectivity of human waterborne pathogens recovered from oysters and estuarine waters in Brazil. **Water Res**, 137, p. 273-280, 06 2018.

LEDEE, D. R.; BOOTON, G. C.; AWWAD, M. H.; SHARMA, S. *et al.* Advantages of using mitochondrial 16S rDNA sequences to classify clinical isolates of *Acanthamoeba*. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 44, n. 3, p. 1142-1149, Mar 2003.

LEE, J. E.; OUM, B. S.; CHOI, H. Y.; YU, H. S. *et al.* Cysticidal effect on *acanthamoeba* and toxicity on human keratocytes by polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine. **Cornea**, 26, n. 6, p. 736-741, Jul 2007.

LIM, N.; GOH, D.; BUNCE, C.; XING, W. *et al.* Comparison of polyhexamethylene biguanide and chlorhexidine as monotherapy agents in the treatment of *Acanthamoeba* keratitis. **Am J Ophthalmol**, 145, n. 1, p. 130-135, Jan 2008.

LIVINGSTONE, I.; STEFANOWICZ, F.; MOGGACH, S.; CONNOLLY, J. *et al.* New insight into non-healing corneal ulcers: iatrogenic crystals. **Eye (Lond)**, 27, n. 6, p. 755-762, Jun 2013.

LORENZO-MORALES, J.; KHAN, N. A.; WALOCHNIK, J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. **Parasite**, 22, p. 10, 2015.

LORENZO-MORALES, J.; MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LÓPEZ-ARENCIBIA, A.; ARNALICH-MONTIEL, F. *et al.* *Acanthamoeba* keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide? **Trends Parasitol**, 29, n. 4, p. 181-187, Apr 2013.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; FORONDA, P.; MARTÍNEZ, E. *et al.* Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. **Parasitol Res**, 95, n. 4, p. 273-277, Mar 2005.

LORENZO-MORALES, J.; ORTEGA-RIVAS, A.; MARTÍNEZ, E.; KHOUBBANE, M. *et al.* Acanthamoeba isolates belonging to T1, T2, T3, T4 and T7 genotypes from environmental freshwater samples in the Nile Delta region, Egypt. **Acta Trop**, 100, n. 1-2, p. 63-69, Nov 2006.

MACCESI, M.; AGUIAR, P. H. N.; PASCHE, V.; PADILLA, M. *et al.* Multi-center screening of the Pathogen Box collection for schistosomiasis drug discovery. **Parasit Vectors**, 12, n. 1, p. 493, Oct 2019.

MAGNET, A.; HENRIQUES-GIL, N.; GALVÁN-DIAZ, A. L.; IZQUIEDO, F. *et al.* Novel Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. **Parasitol Res**, 113, n. 8, p. 2845-2850, Aug 2014.

MARCIANO-CABRAL, F.; CABRAL, G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. **Clin Microbiol Rev**, 16, n. 2, p. 273-307, Apr 2003.

MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathol**, 7, n. 1, p. 583-598, Jan 1997.

MARTÍN-NAVARRO, C. M.; LORENZO-MORALES, J.; CABRERA-SERRA, M. G.; RANCEL, F. *et al.* The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive Acanthamoeba strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. **J Med Microbiol**, 57, n. Pt 11, p. 1399-1404, Nov 2008.

MATTANA, A.; BIANCU, G.; ALBERTI, L.; ACCARDO, A. *et al.* In vitro evaluation of the effectiveness of the macrolide rokitamycin and chlorpromazine against Acanthamoeba castellanii. **Antimicrob Agents Chemother**, 48, n. 12, p. 4520-4527, Dec 2004.

MCBRIDE, J.; INGRAM, P. R.; HENRIQUEZ, F. L.; ROBERTS, C. W. Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against Acanthamoeba. **J Clin Microbiol**, 43, n. 2, p. 629-634, Feb 2005.

MCCLELLAN, K.; HOWARD, K.; NIEDERKORN, J. Y.; ALIZADEH, H. Effect of steroids on Acanthamoeba cysts and trophozoites. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, 42, n. 12, p. 2885-2893, Nov 2001.

MEMARI, F.; NIYYATI, M.; LORENZO-MORALES, J.; JONAYDI, Z. Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba strains isolated from the oral cavity of immunosuppressed individuals in Tehran, Iran. **Acta Parasitol**, 61, n. 3, p. 451-455, Sep 2016.

NAGINGTON, J.; RICHARDS, J. E. Chemotherapeutic compounds and Acanthamoebae from eye infections. **J Clin Pathol**, 29, n. 7, p. 648-651, Jul 1976.

NEFF, R. J.; NEFF, R. H. The biochemistry of amoebic encystment. **Symp Soc Exp Biol**, 23, p. 51-81, 1969.

NIYYATI, M.; LORENZO-MORALES, J.; RAHIMI, F.; MOTEVALLI-HAGHI, A. *et al.* Isolation and genotyping of potentially pathogenic Acanthamoeba strains from dust sources in Iran. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 103, n. 4, p. 425-427, Apr 2009.

NIYYATI, M.; LORENZO-MORALES, J.; REZAEI, S.; RAHIMI, F. *et al.* Genotyping of Acanthamoeba isolates from clinical and environmental specimens in Iran. **Exp Parasitol**, 121, n. 3, p. 242-245, Mar 2009.

NUGRAHA, A. B.; TUVSHINTULGA, B.; GUSWANTO, A.; TAYEBWA, D. S. *et al.* Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box against piroplasm parasites. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, 10, p. 84-90, 08 2019.

NUPRASERT, W.; PUTAPORNTIP, C.; PARIYAKANOK, L.; JONGWUTIWES, S. Identification of a novel t17 genotype of acanthamoeba from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. **J Clin Microbiol**, 48, n. 12, p. 4636-4640, Dec 2010.

ORTEGA-RIVAS, A.; PADRÓN, J. M.; VALLADARES, B.; ELSHEIKHA, H. M. Acanthamoeba castellanii: A new high-throughput method for drug screening in vitro. **Acta Trop**, 164, p. 95-99, Dec 2016.

PRESTON, S.; JIAO, Y.; JABBAR, A.; MCGEE, S. L. *et al.* Screening of the 'Pathogen Box' identifies an approved pesticide with major anthelmintic activity against the barber's pole worm. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, 6, n. 3, p. 329-334, 12 2016.

PUBCHEM.COM. **COMPOUND SUMMARY CICLESONIDE**. 2021. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ciclesonide>. Acesso em: 07 de setembro.

QVARNSTROM, Y.; NERAD, T. A.; VISVESVARA, G. S. Characterization of a new pathogenic Acanthamoeba Species, A. byersi n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. **J Eukaryot Microbiol**, 60, n. 6, p. 626-633, 2013 Nov-Dec 2013.

RAHIMI, F.; HASHEMIAN, S. M.; TAFTI, M. F.; MEHJERDI, M. Z. *et al.* Chlorhexidine Monotherapy with Adjunctive Topical Corticosteroids for Acanthamoeba Keratitis. **J Ophthalmic Vis Res**, 10, n. 2, p. 106-111, 2015 Apr-Jun 2015.

RAHMAN, M. M.; YAGITA, K.; KOBAYASHI, A.; OIKAWA, Y. *et al.* Genetic characterization of clinical acanthamoeba isolates from Japan using nuclear and mitochondrial small subunit ribosomal RNA. **Korean J Parasitol**, 51, n. 4, p. 401-411, Aug 2013.

RICE, C. A.; COLON, B. L.; CHEN, E.; HULL, M. V. *et al.* Discovery of repurposing drug candidates for the treatment of diseases caused by pathogenic free-living amoebae. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 9, p. e0008353, 09 2020a.

RICE, C. A.; TROTH, E. V.; RUSSELL, A. C.; KYLE, D. E. Discovery of Anti-Amoebic Inhibitors from Screening the MMV Pandemic Response Box on. **Pathogens**, 9, n. 6, Jun 2020b.

ROBAEI, D.; CARNT, N.; MINASSIAN, D. C.; DART, J. K. The impact of topical corticosteroid use before diagnosis on the outcome of Acanthamoeba keratitis. **Ophthalmology**, 121, n. 7, p. 1383-1388, Jul 2014.

ROBERTS, C. W.; HENRIQUEZ, F. L. Drug target identification, validation, characterisation and exploitation for treatment of Acanthamoeba (species) infections. **Exp Parasitol**, 126, n. 1, p. 91-96, Sep 2010.

SCHAFFNER, T. J.; SKONER, D. P. Ciclesonide: a safe and effective inhaled corticosteroid for the treatment of asthma. **J Asthma Allergy**, 2, p. 25-32, Feb 25 2009.

SCHUSTER, F. L.; MANDEL, N. Phenothiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae. **Antimicrob Agents Chemother**, 25, n. 1, p. 109-112, Jan 1984.

SCHUSTER, F. L.; VISVESVARA, G. S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. **Int J Parasitol**, 34, n. 9, p. 1001-1027, Aug 2004.

SHARMA, G.; KALRA, S. K.; TEJAN, N.; GHOSHAL, U. Nanoparticles based therapeutic efficacy against Acanthamoeba: Updates and future prospect. **Exp Parasitol**, 218, p. 108008, Nov 2020.

SHING, B.; SINGH, S.; PODUST, L. M.; MCKERROW, J. H. *et al.* The Antifungal Drug Isavuconazole Is both Amebicidal and Cysticidal against Acanthamoeba castellanii. **Antimicrob Agents Chemother**, 64, n. 5, 04 2020.

SIDDIQUI, R.; AQEEL, Y.; KHAN, N. A. The Development of Drugs against Acanthamoeba Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, 60, n. 11, p. 6441-6450, 11 2016.

SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. **Parasit Vectors**, 5, p. 6, Jan 2012.

SIFAOU, I.; REYES-BATLLE, M.; LÓPEZ-ARENCEBIA, A.; CHIBOUB, O. *et al.* Screening of the pathogen box for the identification of anti-Acanthamoeba agents. **Exp Parasitol**, 201, p. 90-92, Jun 2019.

SIRIPURAPU, G.; SAMAD, S. A.; FATIMA, S.; WIG, N. *et al.* SUCCESSFUL MANAGEMENT OF POST-COVID-19 ACANTHAMOEBIC ENCEPHALITIS. **Int J Infect Dis**, Jul 21 2021.

STEVENS, A. R.; O'DELL, W. D. In vitro and in vivo activity of 5-fluorocytosine on Acanthamoeba. **Antimicrob Agents Chemother**, 6, n. 3, p. 282-289, Sep 1974.

STOTHARD, D. R.; SCHROEDER-DIEDRICH, J. M.; AWWAD, M. H.; GAST, R. J. *et al.* The evolutionary history of the genus Acanthamoeba and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. **J Eukaryot Microbiol**, 45, n. 1, p. 45-54, 1998 Jan-Feb 1998.

SZENTMÁRY, N.; DAAS, L.; SHI, L.; LAURIK, K. L. *et al.* Acanthamoeba keratitis - Clinical signs, differential diagnosis and treatment. **J Curr Ophthalmol**, 31, n. 1, p. 16-23, Mar 2019.

SÜTÇÜ, M.; AKTÜRK, H.; GÜLÜMSER-ŞIŞKO, S.; ACAR, M. *et al.* Granulomatous amebic encephalitis caused by Acanthamoeba in an immunocompetent child. **Turk J Pediatr**, 60, n. 3, p. 340-343, 2018.

TALBOTT, M.; CEVALLOS, V.; CHEN, M. C.; CHIN, S. A. *et al.* Synergy Testing of Antiamoebic Agents for Acanthamoeba: Antagonistic Effect of Voriconazole. **Cornea**, 38, n. 10, p. 1309-1313, Oct 2019.

THOMSON, S.; RICE, C. A.; ZHANG, T.; EDRADA-EBEL, R. *et al.* Characterisation of sterol biosynthesis and validation of 14 α -demethylase as a drug target in Acanthamoeba. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 8247, 08 15 2017.

UEKI, N.; EGUCHI, H.; OOGI, Y.; SHIOTA, H. *et al.* Three cases of Acanthamoeba keratitis diagnosed and treated in the early stage. **J Med Invest**, 56, n. 3-4, p. 166-169, Aug 2009.

VEALE, C. G. L.; HOPPE, H. C. Screening of the Pathogen Box reveals new starting points for anti-trypanosomal drug discovery. **Medchemcomm**, 9, n. 12, p. 2037-2044, Dec 2018.

VENTURE, M. F. M. **COVID Box supporting information**. 2020. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open/covid-box/covid-box-supporting-information>. Acesso em: 04 de setembro.

VISVESVARA, G. S. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. **Curr Opin Infect Dis**, 23, n. 6, p. 590-594, Dec 2010.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 50, n. 1, p. 1-26, Jun 2007.

WALOCHNIK, J.; DUCHÊNE, M.; SEIFERT, K.; OBWALLER, A. *et al.* Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, 46, n. 3, p. 695-701, Mar 2002.

WEISMAN, R. A. Differentiation in *Acanthamoeba castellanii*. **Annu Rev Microbiol**, 30, p. 189-219, 1976.

WINCK, M. A.; CAUMO, K.; ROTT, M. B. Prevalence of *acanthamoeba* from tap water in rio grande do Sul, Brazil. **Curr Microbiol**, 63, n. 5, p. 464-469, Nov 2011.

WOPEREIS, D. B.; BAZZO, M. L.; DE MACEDO, J. P.; CASARA, F. *et al.* Free-living amoebae and their relationship to air quality in hospital environments: characterization of. **Parasitology**, 147, n. 7, p. 782-790, 06 2020.

YOUSUF, F. A.; SIDDIQUI, R.; SUBHANI, F.; KHAN, N. A. Status of free-living amoebae (*Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*) in drinking water supplies in Karachi, Pakistan. **J Water Health**, 11, n. 2, p. 371-375, Jun 2013.