

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós- graduação em Patologia

LUCIANA FERNANDES DO PRADO

ESTUDO DA APOPTOSE NA AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL
INDUZIDA PELA *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*.

Belo Horizonte

2022

LUCIANA FERNANDES DO PRADO

ESTUDO DA APOPTOSE NA AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA
PELA *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Área de concentração: Patologia Investigativa

Orientador: Prof^o. Dr^o. Marcelo Vidigal Caliari

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Fabrício Marcus Oliveira Silva

Belo Horizonte

2022

043 Prado, Luciana Fernandes do.
Estudo da apoptose na amebíase hepática experimental induzida pela Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar [manuscrito] / Luciana Fernandes do Prado. – 2022.
91 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliarí. Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Marcus Oliveira Silva.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Amebíase. 3. Entamoeba histolytica. 4. Abscesso Hepático Amebiano. 5. Apoptose. I. Caliarí, Marcelo Vidigal. II. Silva, Fabrício Marcus Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG
 ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO N° 455 DE LUCIANA FERNANDES DO PRADO

Realizou-se, no dia 14 de dezembro de 2022, às 8:30 horas, Sala 241 – Bloco C – 3º andar/ICB – da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Dissertação, intitulada **“ESTUDO DA APOPTOSE NA AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*”**, apresentada por **Luciana Fernandes do Prado**, número de registro **2020673872**, graduada no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Paula Peixoto Campos Lopes**, Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG; **Profa. Annamaria Ravara Vago**, Departamento de Morfologia - ICB/UFMG; **Prof. Dr. Fabricio Marcus Silva Oliveira**, FIOCRUZ – COORIENTADOR; **Prof. Marcelo Vidigal Caliarí**, Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG – ORIENTADOR.

A Comissão considerou a Dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Profa. Paula Peixoto Campos Lopes - ICB/UFMG

Profa. Annamaria Ravara Vago - ICB/UFMG

Prof. Dr. Fabricio Marcus Silva Oliveira - FIOCRUZ – COORIENTADOR

Prof. Marcelo Vidigal Caliarí - ICB/UFMG – ORIENTADOR

Belo Horizonte, 14 de dezembro de 2022.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Vidigal Caliarí, Professor do Magistério Superior, em 14/12/2022, às 12:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Annamaria Ravara Vago, Chefe de departamento, em 15/12/2022, às 14:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paula Peixoto Campos Lopes, Professora do Magistério Superior, em 19/12/2022, às 09:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Fabricio Marcus Silva Oliveira, Usuário Externo, em 20/12/2022, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1950970 e o código CRC 01C016F8.

22/12/2022 11:53

SEI/UFMG - 1950970 - Ata de defesa de Dissertação/Tese

Referência: Processo nº 23072.271957/2022-12

SEI nº 1950970

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, meu Pai e Grande Mestre que nunca me abandonou e me permitiu viver a cada dia todos os sonhos Dele pra mim. Com Ele eu posso chegar a lugares que nunca pensei;

À minha mãe pelo amor e cuidado;

Ao meu orientador professor Marcelo Caliari que me acolheu e não me deixou desistir;

Ao meu coorientador Fabrício Marcus pela dedicação e apoio;

Às minhas amigas e secretárias preferidas Marília, Regina e Cintya;

Aos colegas de trabalho Jack, Vânia, Nayara e Tarcísio pelo companheirismo;

Aos professores Enio, Paula, Milene e Vanessa pelo carinho e apoio;

Aos colegas de jornada Igor, Emerson, Bárbara, Ana Paula, Aline e Anderson pela disposição em me ajudar;

Aos professores do departamento de Patologia Geral pelo conhecimento transmitido;

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a voar mais alto e concluir essa etapa da minha vida.

Só foi possível porque nunca estive sozinha, todos vocês sempre estiveram ao meu lado em cada passo dado.

Muito obrigada!

“Porque os meus pensamentos não são os vossos pensamentos, nem os vossos caminhos os meus caminhos, diz o Senhor. Porque, assim como o céu é mais alto do que a terra, assim são os meus caminhos mais altos do que os vossos caminhos, e os meus pensamentos mais altos do que os vossos pensamentos”.

Isaías 55:8-9

RESUMO

A amebíase é uma doença que atinge cerca de 12% da população mundial, sendo a *Entamoeba histolytica*, responsável por lisar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e a *Entamoeba dispar* representante dos casos assintomáticos. Entretanto, estudos têm demonstrado a capacidade de *E. dispar* de produzir lesões em modelos experimentais. O sucesso da invasão amebiana no hospedeiro se deve a destruição tecidual pelos seus fatores de virulência, capazes de provocar necrose e apoptose. Há poucos estudos sobre a apoptose induzida por *E. histolytica* e *E. dispar*. Diante disso, foi objetivo deste trabalho avaliar a apoptose em modelo experimental de abscesso hepático amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica* e *E. dispar*, por meio do ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*) e de reações imuno-histoquímicas para os marcadores Caspase 3, Bax e Bcl-2. Em todos os AHA's induzidos por *E. histolytica* (grupo EH) e *E. dispar* (grupo ED) foram detectadas reações TUNEL⁺, em células com aspectos morfológicos indicativos de apoptose, tanto do hospedeiro quanto do parasito. Todos os AHA's também apresentaram reações positivas para os três marcadores imuno-histoquímicos analisados. Ao contrário do verificado no grupo EH, a análise morfométrica mostrou menor área Caspase 3 clivada⁺ e Bax⁺, bem como maior área Bcl2⁺ no AHA do grupo ED, indicando menores níveis de apoptose no AHA induzido por esta espécie. *E. dispar* e *E. histolytica* apresentaram apoptose dependente de caspase 3 e de Bax, sendo mais intensa no grupo ED, comprovando a menor capacidade desta espécie em sobreviver no AHA. Sendo assim, este estudo demonstrou pela primeira vez que a apoptose também está presente, e de forma significativa, no AHA induzido experimentalmente pela *E. dispar*. Também, a expressão significativa de caspase 3 clivada no AHA sugeriu o envolvimento da via intrínseca da apoptose e, a expressão de Bax e Bcl-2 demonstrou a importância destas duas proteínas na modulação da apoptose em ambas espécies.

Palavras chave: Amebíase, *Entamoeba dispar*, Abscesso hepático amebiano, Apoptose, Caspase 3 clivada.

ABSTRACT

Amoebiasis is a disease that affects about 12% of the world's population, with *Entamoeba histolytica* responsible for lysing and penetrating the host's tissues and *Entamoeba dispar* representing asymptomatic cases. However, studies have demonstrated the ability of *E. dispar* to produce lesions in experimental models. The success of amoebic invasion in the host is due to tissue destruction by its virulence factors, capable of causing necrosis and apoptosis. There are few studies on apoptosis induced by *E. Histolytica* and *E. dispar*. Therefore, the objective of this study was to evaluate apoptosis in an experimental model of amoebic liver abscess (ALA) induced by *E. histolytica* and *E. dispar*, using the TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) and immunological reactions - histochemistry for Caspase 3, Bax and Bcl-2 markers. In all ALA's induced by *E. histolytica* (EH group) and *E. dispar* (ED group) TUNEL+ reactions were detected in cells with morphological aspects indicative of apoptosis, both of the host and the parasite. All ALA's also showed positive reactions for the three immunohistochemical markers analyzed. Unlike what was seen in the EH group, the morphometric analysis showed a smaller Caspase 3+ and Bax+ cleaved area, as well as a larger Bcl2+ area in the ALA of the ED group, indicating lower levels of apoptosis in the ALA induced by this species. *E. dispar* and *E. histolytica* showed caspase 3 and Bax-dependent apoptosis, being more intense in the ED group, proving the lower ability of this species to survive in the ALA. Therefore, this study demonstrated for the first time that apoptosis is also present, and significantly so, in AHA experimentally induced by *E. dispar*. Also, the significant expression of cleaved caspase 3 in AHA suggested the involvement of the intrinsic pathway of apoptosis, and the expression of Bax and Bcl-2 demonstrated the importance of these two proteins in the modulation of apoptosis in both species.

Keywords: Amoebiasis, *Entamoeba dispar*, Amoebic liver abscess, Apoptosis, Cleaved Caspase 3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ciclo biológico e patogênese da amebíase.....	18
Figura 2: Esquema de representação de eventos apoptóticos	30
Figura 3. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; análise histopatológica.....	39
Figura 4. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; ensaio de TUNEL.....	40
Figura 5. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; imuno-histoquímica caspase 3 clivada	41
Figura 6. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; imuno-histoquímica Bax	42
Figura 7. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; imuno-histoquímica Bcl-2	44
Figura 8. Fígado de Hamster inoculado com <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i> ; trofozoítos caspase 3 clivada ⁺ , Bax ⁺ e Bcl-2 ⁺	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHA - Abcesso hepático amebiano

AIF – Fator indutor de apoptose

Apaf-1 – Fator ativador de protease apoptose 1

CP's – Cisteína proteinases

DAB – Diaminobenzidina

DAI – Dias após a infecção

DD – Domínio de morte

DISC – Complexo sinalizador indutor de morte

EhCP5 - Cisteína proteinase 5 da *Entamoeba histolytica*

E. dispar - *Entamoeba dispar*

E. histolytica - *Entamoeba histolytica*

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FADD – Fas associada domínio de morte

FasL – Ligante Fas

FasR – Receptor Fas

GAL/GALNAc - Lectina ligante de galactose e N-acetil-D-galactosamina

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

GrA - Granzimas A

GrB - Granzimas B

IAP – Proteína inibidora de apoptose

ICE -Enzima de Conversão de IL-1 ou caspase -1

IFN- γ – Interferon γ

IL1- β – Interleucina 1 β

IL-1 – Interleucina 1

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IgM - Imunoglobulina M

LPG- Lipofosfoglicanos

LPPG - Lipofosfopeptídeoglicanos

NF- κ B – Fator Nuclear κ B

NKT - T Natural Killer

OMS - Organização Mundial de Saúde

PTPase – Proteína fosfatase específica tirosina

SMAC ou Diabolo – Segundo ativador mitocondrial de caspases

TdT - Deoxinucleotídeo

Th2 - T-*helper* do tipo 2

TLR- Receptor *Toll Like*

TNF - Fator de necrose tumoral

TNFR1 -Receptor de fator de necrose tumoral 1

TRADD – Receptor TNF associado ao domínio de morte

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Epidemiologia.....	15
1.2 Morfologia de <i>Entamoeba histolytica</i> x <i>Entamoeba dispar</i>	16
1.3 Ciclo biológico e patogênese da amebíase	16
1.4 Abscesso hepático amebiano	18
1.5 Fatores de virulência amebianos	19
1.5.1 Lectina ligante de galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc).....	20
1.5.2 Cisteína proteinases	21
1.5.3 Amebaporos.....	22
1.5.4 Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada.....	23
1.5.5 Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptídeoglicanos	24
1.6 Resposta imune na amebíase	24
1.7 Apoptose induzida por <i>Entamoeba histolytica</i>	25
1.8 Destruição de <i>Entamoeba histolytica</i> por apoptose.....	29
1.9 Infecção experimental por <i>Entamoeba dispar</i> e ruptura de paradigmas	30
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVO GERAL.....	34
3.1 Objetivos específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Animais.....	35
4.2 Cepas de <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i>	35
4.3 Análise histopatológica	35
4.4 Identificação “in situ” da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling)	36
4.5 Reações imuno-histoquímicas	36
4.6 Análise quantitativa da área de marcação Caspase 3 clivada ⁺ , Bax ⁺ , Bcl-2 ⁺ e de trofozoítos ⁺ para os mesmos marcadores	37
4.7 Análise estatística	38
5. RESULTADOS	38

5.1 Análises histopatológicas	38
5.2 Investigação de apoptose no AHA por meio do ensaio de TUNEL.....	39
5.3 Análises morfométricas das áreas Caspase 3 clivada ⁺ , Bax ⁺ e Bcl-2 ⁺ nos AHA's induzidos por <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i>	40
5.3.1 Caspase 3 clivada ⁺	41
5.3.2 Bax ⁺	42
5.3.3 Bcl-2 ⁺	43
5.4 Análise semiquantitativa dos trofozoítos Caspase 3 clivada ⁺ , Bax ⁺ e Bcl-2 ⁺ nos AHA's induzidos por <i>Entamoeba histolytica</i> e <i>Entamoeba dispar</i>	44
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS.....	63

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Comitê de Sistemática da Sociedade Internacional de Protozoologia, as espécies do gênero *Entamoeba* pertencem ao reino protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, família Endamoebidae e classe Lobosea, composta por organismos eucariotas e unicelulares que se locomovem e se alimentam através de pseudópodes. Esse gênero é constituído por espécies não patogênicas: *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni* e *Entamoeba polecki*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba buetschlii* (CDC, 2019); espécies que estão sob investigação devido ao potencial patogênico: *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) (OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2021; OLIVEIRA, et al., 2021); *Entamoeba moshkovski*, *Entamoeba bangladeshi* (CDC, 2019) e, finalmente, *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), a única até o momento considerada patogênica (CDC, 2019; GARCIA, 2007).

A Amebíase é uma doença causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, que pode apresentar quadros patológicos graves, eventualmente fatais, mantendo-se como um grande problema de saúde pública nos países em desenvolvimento (HUSTON, 2004). Apesar da maioria das infecções ser assintomática, ao hospedar o intestino grosso dos seres humanos, a *E. histolytica* pode dar origem a uma importante forma clínica denominada colite amebiana. A partir do intestino grosso, os trofozoítos podem disseminar-se para o fígado, diafragma, pulmões e encéfalo, caracterizando a amebíase extraintestinal. Nesta forma da doença, o fígado é o órgão mais frequentemente atingido, ocorrendo o desenvolvimento do abscesso hepático amebiano (AHA) (CDC, 2019; HAQUE et al., 2003; STANLEY, 2003).

O protozoário *E. histolytica* foi descrito em 1875 pelo médico Russo Fedor Aleksandrovich Lösch, após trofozoítos terem sido observados nas fezes disentéricas de um camponês, falecido em virtude de graves úlceras intestinais detectadas à necropsia (GARCIA, 2007; JACKSON, 1998). Em 1903, devido a sua capacidade de destruir os tecidos do hospedeiro, Schaudinn denominou esse protozoário como *Entamoeba histolytica* (DIAMOND; CLARK, 1993). Desde a identificação da *E. histolytica* por Lösch houve questionamentos quanto à sua ação patogênica, já que grande parte dos indivíduos infectados eram assintomáticos. Diante disso, Emile Brumpt (1925) propôs a teoria dualista baseando-se no aspecto clínico-epidemiológico, na qual duas espécies de amebas poderiam habitar o intestino humano. Uma delas seria patogênica, *E. histolytica*, enquanto a outra não seria capaz de produzir lesões, *E. dispar* (WALSH, 1986). Posteriormente, pesquisas demonstraram diferenças antigênicas e bioquímicas entre *E. histolytica* e *E. dispar* corroborando com a existência de duas espécies morfológicamente idênticas, porém biologicamente diferentes. De

fato, *E. histolytica* era a espécie patogênica devido a sua capacidade de lisar e penetrar nos tecidos, produzindo a amebíase invasiva e, a espécie não patogênica *E. dispar* explicaria a existência de um grande número de casos assintomáticos por todo o mundo (CLARK; DIAMOND, 1991; SARGEAUNT, 1992; CLARK, 1998). Em 1997, após os estudos de Tannich *et al.* (1989) e Clark e Diamond (1993), que envolveram a análise do genoma, do perfil de isoenzimas e a utilização de anticorpos monoclonais, *E. dispar* foi assumida como espécie e oficialmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1997).

1.1 Epidemiologia

A amebíase é uma doença com ampla distribuição mundial, que produz cerca de 50 milhões de casos por ano em todo o mundo, sendo que a maioria dos infectados permanecem assintomáticos, o que contribui para perpetuação do ciclo de vida do protozoário através da excreção de cistos e ingestão de alimentos contaminados com os mesmos (WHO, 1997). Uma parcela menor de infectados é acometida com a doença invasiva (STAUFFER; RAVDIN, 2003). Segundo a OMS, 1% da população mundial está infectada com *E. histolytica* e 12% com a *E. dispar* (WHO, 1997). Aproximadamente 110.000 pessoas morrem todos os anos por amebíase, sendo considerada por alguns a segunda causa de morte por doença parasitária, superada apenas pela malária (STANLEY, 2003; QUE; REED, 2000; WHO, 1997) e o AHA é a principal causa de mortalidade por infecções extraintestinais (SINGH A *et al.*, 2019).

A amebíase é considerada endêmica e ocorre em países subdesenvolvidos de climas quentes, tropicais e subtropicais, na qual as condições sanitárias e o abastecimento de água são precários e ineficientes. Do contrário, nos países desenvolvidos, ocorre principalmente entre imigrantes, viajantes, homossexuais masculinos e pacientes internados em instituições como asilos e creches (CHAVES *et al.*, 2010).

A quantidade de indivíduos infectados varia em diferentes áreas geográficas, porém com destaque em algumas regiões, tais como Bangladesh, Índia, México, leste e sul da África, Vietnam e América do Sul (ZLOBL, 2001).

No Brasil, nos períodos de 2012 a 2016 foram totalizadas 14.268 internações por amebíase, com o maior número de casos na região Nordeste (6.033; 42,28%), seguido pelas regiões Norte (5.388; 37,76%), Sudeste (1.196; 8,38%), Centro-Oeste (1.096; 7,68%) e Sul (555; 3,88%). Tais variações ocorrem entre as regiões devido as condições socioeconômicas precárias e a dificuldade de acesso aos serviços de saúde pública (SOUZA *et al.*, 2019). Contudo, a maior prevalência de infecção pela *E. dispar* está em Belo Horizonte, Salvador e

Manaus (BENETTON *et al.*, 2005; DOURADO *et al.*, 2006; OLIVEIRA-COSTA *et al.*, 2006; SANTOS; SOARES, 2008).

1.2 Morfologia de *Entamoeba histolytica* x *Entamoeba dispar*

Através da microscopia ótica com tecnologia Nomarski foi observado que a cepa de *E. dispar* SAW 760RR clone A possui algumas diferenças ultra estruturais ao compará-la com a cepa HM1: IMSS de *E. histolytica*. O núcleo de *E. dispar* apresenta-se com uma camada periférica fina composta de grânulos densos, enquanto em *E. histolytica* a camada periférica do núcleo é espessa; ambos os núcleos apresentam cinco a seis condensações centrais, que provavelmente corresponde a um número igual de cromossomos metafásicos. Os trofozoítos da *E. dispar* são mais alongados com pseudópode anterior e proeminente, um uroide (região de alta adesividade) posterior evidente, enquanto que na *E. histolytica*, os trofozoítos são mais arredondados com vários pequenos pseudópodes e um discreto uroide. Além disso, através da microscopia eletrônica de transmissão é possível observar numerosos vacúolos concentrando-se em determinadas áreas do citoplasma de *E. dispar* e grandes depósitos de grânulos de glicogênio nas áreas livres, já a *E. histolytica* contém vários vacúolos de diferentes tamanhos distribuídos uniformemente no citoplasma e raros grânulos de glicogênio (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1998).

Embora sejam consideradas morfológicamente idênticas, o tamanho dos trofozoítos de ambas espécies varia entre 12 a 60 μm de diâmetro. O núcleo apresenta-se com cromatina na membrana nuclear e um cariossoma pequeno, compacto e centralizado. O citoplasma é diferenciado em um ectoplasma claro e hialino e o endoplasma mais granular. A motilidade é rápida e unidirecional, com o prolongamento de pseudópodes em resposta às condições ambientais (GARCIA, 2007). Os cistos variam em tamanho de 10 a 20 μm , podendo se apresentar em dois estágios: pré-cisto (cisto imaturo, uninucleado com uma massa de glicogênio e corpos cromatóides com bordas lisas e arredondadas) e metacistos (cisto maduro, praticamente sem glicogênio e barras cromatóides, com aproximadamente 4 núcleos) (GARCIA, 2007).

1.3 Ciclo biológico e patogênese da amebíase

O ciclo biológico é monoxênico, ou seja, não há necessidade de um hospedeiro intermediário para completar seu desenvolvimento e com estágios evolutivos bem definidos:

trofozoíto, pré-cisto, cisto e metacisto e está relacionado com a patogênese da amebíase (Figura 1) (SILVA; GOMES, 2005).

A infecção amebiana inicia com a ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos de *E. histolytica*. Após a ingestão, o cisto passa pelo trato digestivo e ao chegar ao intestino delgado ocorre o excistamento, formando os metacistos. Os metacistos dividem-se por fissão binária, dando origem aos trofozoítos que migram para o intestino grosso, podendo permanecer no lúmen alimentando-se de detritos e da microbiota ou transformarem-se em novos cistos e serem eliminados nas fezes (HAQUE *et al.*, 2003; STANLEY, 2003). O estabelecimento dos trofozoítos na mucosa intestinal depende de vários fatores, tais como o estado nutricional, genética e microbiota do hospedeiro (BRANDT; TAMAYO, 1970). Contudo, após o excistamento pode ocorrer adesão de trofozoítos na camada da mucina intestinal e formação de novos cistos, resultando em infecção assintomática. Entretanto, em alguns casos, ocorre adesão, lise do epitélio colônico e conseqüentemente a invasão do cólon por trofozoítos; em outros casos podem ocorrer a disseminação hematogênica, ocasionando a amebíase extraintestinal, atingindo o fígado e outros locais (HAQUE *et al.*, 2003) (Figura 1).

Os mecanismos de encistamento e excistamento ainda não são completamente conhecidos, no entanto, sabe-se que a lectina ligante de galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), presente na superfície do trofozoíto, atua na lise dependente de contato das células alvo e na resistência ao complemento do hospedeiro (EICHINGER, 2001). Após a lise tecidual, os trofozoítos invadem camadas mais profundas, gerando zonas de necrose liquefativa que podem se coalescer formando úlceras. Além disso, a morte de trofozoítos leva a liberação de produtos tóxicos amebianos que podem contribuir para a expansão da necrose (COSTA *et al.*, 2007).

A característica principal da patogênese deste protozoário é a sua capacidade de lisar diretamente as células do hospedeiro e causar destruição tecidual. Evidências sugerem uma interação entre os trofozoítos e as células do hospedeiro que ocorre através de uma série de etapas: adesão a célula alvo, efeito citopático e fagocitose (GARCIA, 2007).

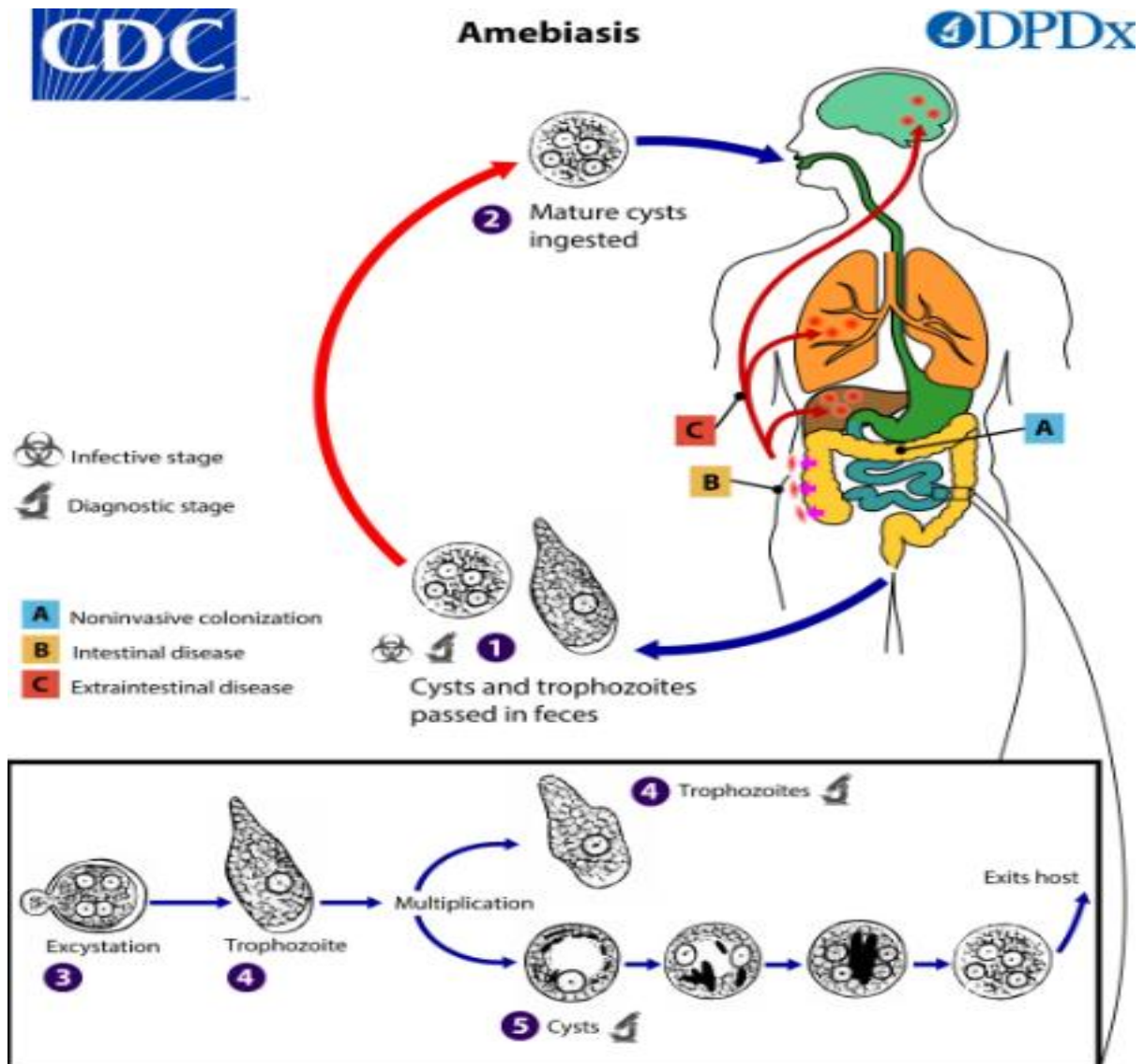


Figura 1: Ciclo biológico e patogênese da amebíase: Cistos e trofozoítos são eliminados nas fezes. Os trofozoítos são normalmente encontrados nas fezes diarreicas e os cistos nas fezes formadas. Os cistos podem sobreviver por vários dias no ambiente externo e permanecerem infecciosos no ambiente devido à proteção conferida por suas paredes. Os trofozoítos eliminados nas fezes são rapidamente destruídos uma vez fora do corpo e, se ingeridos, não sobreviveriam à exposição ao ambiente gástrico. A infecção com *Entamoeba histolytica* e/ou *Entamoeba dispar* ocorre através da ingestão de cistos maduros nos alimentos ou mãos contaminados com fezes. O contágio com cistos infecciosos e trofozoítos na matéria fecal durante o contato sexual também pode ocorrer. O excistamento ocorre no intestino delgado e os trofozoítos são liberados, migrando para o intestino grosso. Os trofozoítos podem permanecer confinados ao lúmen intestinal (A: infecção não invasiva) com indivíduos continuando a eliminar cistos nas fezes (portadores assintomáticos), ou invadir mucosa intestinal (B: doença intestinal), ou migrar para os vasos sanguíneos, atingindo locais extraintestinais, como fígado, cérebro e pulmões (C: doença extraintestinal). Os trofozoítos se multiplicam por fissão binária e produzem cistos, e ambos os estágios são eliminados nas fezes. Fonte: (<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>).

1.4 Abscesso hepático amebiano

O AHA é principal manifestação clínica extraintestinal, sendo significativamente associado a elevada morbidade e mortalidade na amebíase. É caracterizado por extensas áreas

de necrose liquefativa do parênquima hepático, formando cavidades contendo restos celulares. Margeando as áreas de necrose é encontrada grande quantidade de debris celulares, escasso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos e macrófagos e, tecido de granulação circunjacente. Apesar da designação “abscesso”, não se trata de um abscesso verdadeiro por não ser constituído de pus. Trofozoítos podem ser encontrados em todas as regiões do AHA, bem como no lúmen dos capilares sinusóides do parênquima hepático não-necrosado, interstício portal, ramos da veia porta e ductos biliares. Contudo, o maior número frequentemente está presente margeando (borda do AHA) a zona central de necrose, bem como no interior da mesma (YAN; STANLEY, 2001; STANLEY, 2003).

Esta forma extraintestinal acomete 1% dos infectados com *E. histolytica*, sendo que os homens são mais propensos à infecção do que as mulheres, provavelmente devido ao consumo excessivo de álcool e fatores hormonais (WEELS; ARGUEDAS, 2004). Um estudo experimental com camundongos identificou que as fêmeas eram mais suscetíveis de eliminar a infecção amebiana por *E. histolytica* mais rapidamente devido aos altos índices de interferon- γ (INF- γ) nas fases iniciais do desenvolvimento do AHA (LOTTER *et al.*, 2006). Sabe-se também que a genética do hospedeiro influencia na disseminação da infecção amebiana, uma vez que indivíduos que têm o alelo de Antígeno Leucocitário Humano de classe II DQB1*0601 possuem ação protetora contra *E. histolytica*, ao alterar a apresentação de antígeno para as células TCD4+ (DUGGAL *et al.*, 2004).

1.5 Fatores de virulência amebianos

Embora haja diferenças na expressão dos fatores de virulência entre as espécies, vários estudos têm relatado tanto em *E. histolytica* como em *E. dispar*, a presença de produtos amebianos que agem como indutores de destruição celular e favorecem a sobrevivência da ameba no hospedeiro, são eles: Lectina ligante de galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc), Cisteínas proteinases (CPs) e Amebaporos (HAQUE *et al.*, 2003; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009, fosfatases (AGUIRRE-GARCIA *et al.*, 2003), Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptideoglicanos (MOODY *et al.*, 1997).

1.5.1 Lectina ligante de galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc)

Para que os trofozoítos exerçam o papel patogênico nas células hospedeiras e rompam a extensa camada de mucina que cobre o epitélio intestinal, é necessário estabelecer contato e interação entre as lectinas (glicoproteína multimérica de 260 kDa) do microrganismo e glicoproteínas presentes na mucina do cólon (MCCOY *et al.*, 1994; MONCADA *et al.*, 2003; TREJOS-SUÁREZ *et al.*, 2009). O muco intestinal oferece uma resistência ao trofozoíto, porém os resíduos de Gal-GalNAc se ligam aos terminais expostos das glicoproteínas da mucosa intestinal, contrariando essa resistência (TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009). A adesão dos trofozoítos ao tecido epitelial é um requisito para sua colonização e invasão, sendo mediada por várias moléculas, dentre elas a lectina específica para resíduos de Gal/GalNAc (PACHECO *et al.*, 2004).

A lectina Gal/GalNAc é um heterodímero composto de uma subunidade leve de 31-35 KDa que provavelmente está envolvida na atividade citopática do parasito; de uma subunidade pesada de 170 KDa ligadas por pontes dissulfeto que está envolvida na sinalização da atividade de adesão extracelular da lectina amebiana e uma subunidade intermediária de 150KDa ligada não-covalentemente às subunidades leve e pesada (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; PACHECO *et al.*, 2004; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009). Essa molécula também participa da destruição celular, uma vez que a morte das células-alvo depende de contato, ocasionando aumento intracelular de Ca^{2+} e indução de apoptose (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO - OSORIO, 2009).

Essa proteína polimérica e multifuncional, além dos papéis citados acima, desempenha uma importante função na transdução de sinal e na evasão do sistema de complemento do hospedeiro. Sabe-se que a mucina, principal componente da glicoproteína da mucosa intestinal, pode inibir a ação da lectina Gal/GalNAc. No entanto, para evadir dessa inibição, *E. histolytica* secreta outros carboidratos, dentre eles: glucosidase, galactosidase e N-acetil-D-galactosaminidase, fazendo com que a mucosa seja alterada e tenha maior afinidade por outras substâncias secretadas pela ameba (PACHECO *et al.*, 2004; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009).

A lectina Gal/GalNAc possui semelhança estrutural e reatividade cruzada antigênica com CD59, um antígeno leucocitário humano que impede o agrupamento do complexo C5b-9 na membrana. No trofozoíto, esta lectina também atua como agente inibidor do complexo de ataque C5b-9, impedindo que o trofozoíto seja destruído pela ação do complemento (BRAGA

et al., 1992). Apesar dos trofozoítos poderem utilizar deste mecanismo para evadir do sistema imune do hospedeiro, em um estudo de nosso grupo, verificamos que tanto *E. histolytica* quanto *E. dispar* podem ser destruídas pelo complemento e contribuir para a seleção de parasitos mais resistentes (COSTA, *et al.*, 2010b). Além disso, a *E. dispar* expressa a lectina Gal/GalNAc em quantidade inferior em relação à *E. histolytica*, sugerindo uma menor resistência diante da ação do complemento (DODSON *et al.* 1997). De fato, estes autores observaram que, apesar da lectina apresentar elevado grau de homologia em relação às duas espécies, a *E. dispar* possui menor capacidade de aderência e citotoxicidade devido à uma menor expressão.

1.5.2 Cisteína proteinases

As CP's são enzimas proteolíticas secretadas pelos trofozoítos e essenciais na destruição da mucosa colônica, pois degradam diferentes componentes da matriz extracelular (fibronectina, laminina, colágeno, entre outros), além de separar as células, eliminando os possíveis obstáculos mecânicos que impediriam a invasão tecidual (KEENE *et al.*, 1986; QUE; REED, 2000; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009).

No genoma amebiano já foram descritos mais de quarenta genes que codificam CPs, no entanto, pouco se sabe sobre localização precisa destas proteínas na membrana citoplasmática (SATO *et al.*, 2006). Em culturas de *E. histolytica*, os genes que codificam a CP1, CP2 e CP5 são altamente expressos e responsáveis por 90% da produção das CPs. Foi observada 95% de homologia nos genes CP2, CP3, CP4 e CP6 entre as espécies *E. dispar* e *E. histolytica*. A princípio, os genes CP1 e CP5 não foram encontrados na *E. dispar* após a análise pelo método de *Southern blot* (BRUCHHAUS *et al.*, 1996). Contudo, nosso grupo detectou pela primeira vez a expressão de CP5 por RT-qPCR nas cepas MCR, VEJ e ADO de *E. dispar*, em culturas associadas ou não a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium (*S. typhimurium*) (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Expressa em grande quantidade por *E. histolytica*, a cisteína proteinase 5 de *E. histolytica* (EhCP5) apresenta funções proteolíticas que são fundamentais na patogênese da amebíase (MORTIMER; CHADEE, 2010). Os 4 genes homólogos de cisteína proteinase presentes em *E. dispar* estão presentes em menor concentração e atividade biológica, corroborando para a característica não invasiva desta espécie (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

Embora mais de 90% da atividade das CP's seja representada pelas CP1, CP2 e CP5, a degradação de mucina parece ser predominantemente provocada pela CP5, uma vez que sua

inibição reduz intensamente a atividade proteolítica da enzima. Além disso, trofozoítos deficientes de CP5 são incapazes de superar a barreira de muco em cultura de células (CORNIK; CHADEE, 2017). Após a ruptura da barreira epitelial mediante a ação das CP's, ocorre a degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, a movimentação dos trofozoítos, que se estendem pela submucosa formando úlceras em forma de “boca de garrafa” (QUE; REED, 2000).

As CP's contribuem para a lise tecidual e também interferem na função do sistema imunológico do hospedeiro, por interferirem no recrutamento de células inflamatórias para a resposta local à invasão. Tais proteínas ativam a via alternativa do complemento através da clivagem do componente C3 e degradam as anafilatoxinas C3a e C5a, geradas na ativação da cascata de complemento (TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009). Essa degradação de C3a e C5a, que são mediadores quimiotáticos para polimorfos, contribui para explicar a escassez de neutrófilos observada nas zonas de necrose liquefativa (QUE; REED, 2000). Além disso, as cisteínas proteinases contribuem com a evasão dos trofozoítos à resposta imune, uma vez que degradam as imunoglobulinas A e G (IgA e IgG), e a proteína precursora pro IL-18, responsável pela síntese de IL-18, mediador crucial neste processo pró-inflamatório (TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009).

Sabe-se também que as cisteínas proteinases amebianas estimulam a produção de IL-1 β e IL-8 a partir das células epiteliais intestinais humanas, induzindo o influxo de neutrófilos e danos na barreira intestinal (ZHANG *et al.*, 2000). As células epiteliais danificadas ou necróticas liberam pIL-1 β inativo, que requer clivagem proteolítica pela Enzima de Conversão de IL-1 (ICE ou caspase-1) para formar mIL-1 β ativo (HOGQUIST *et al.*, 1991). O mIL-1 β contribui para a produção de mediadores inflamatórios nas células intestinais vizinhas através da ativação do Fator de transcrição NF- κ B (SEYDEL *et al.*, 1997). Dessa forma, as CPs amebianas contribuem com a progressão e propagação da resposta inflamatória intestinal (ZHANG *et al.*, 2000). Além do mais, a ativação da ICE pelas CP's amebianas contribuem na patogênese do AHA, uma vez que essas enzimas mimetizam um membro da família das caspases (TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009; ZHANG *et al.*, 2000).

1.5.3 Amebaporos

Outro fator de virulência produzido pelos trofozoítos são as Amebaporos, proteínas de 8 kDa, encontradas nas vesículas dos lisossomos de *E. histolytica*. Tais moléculas formam canais iônicos ou poros nas membranas lipídicas e despolarizam as células alvo, ocasionando a

mudança do ambiente celular e conseqüentemente a lise celular por choque osmótico (LEIPPE *et al.*, 1994; LEIPPE, 1997; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009).

A família de amebaporos compreende três isoformas, Amebaporos A, B e C, com o mesmo tamanho molecular, porém com uma grande diferença em sua estrutura primária (LEIPPE *et al.*, 1994). As três isoformas atuam na formação de poros, mas diferem em sua cinética, visto que, a amebaporo C tem uma cinética mais rápida na despolarização dos lipossomas e também são necessárias concentrações mais baixas para induzir a formação de canais. Tal observação sugere que a amebaporo C tenha uma maior eficácia na ligação com a membrana (LEIPPE *et al.*, 1994).

Esses peptídeos amebianos são análogos estruturais e funcionais da NK-lisa e da granulosina, perforinas dos linfócitos T citotóxicos e células *Natural Killer* (NK), que são capazes de formar poros na membrana celular (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; LEIPPE, 1997).

A inibição da expressão gênica de Amebaporos nos trofozoítos de *E. histolytica* reduziu significativamente a patogenicidade deste protozoário, demonstrando que esta proteína contribui notavelmente na atividade citolítica e destrutiva dos tecidos pelos trofozoítos (BRACHA *et al.*, 1999).

Em *E. dispar*, foram encontrados homólogos das isoformas em relação a *E. histolytica*, com altas semelhanças estruturais primárias, porém em menor concentração e atividade biológica, provavelmente influenciando na patogenicidade dessa espécie (NICKEL *et al.*, 1999).

1.5.4 Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada

Foram identificadas em diferentes cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* as enzimas Fosfatase ácida de membrana, presente nas duas espécies e, a Fosfatase ácida secretada, encontrada somente na *E. histolytica*. Ambas enzimas possuem ação PTPase (Proteína fosfatase específica tirosina), capazes de desfosforilar tirosina, serina, ATP e treonina, provocando a dissociação dos microfilamentos de actina, impedindo que as células do sistema imune (principalmente macrófagos) de emitir pseudópodes para realizar fagocitose, contribuindo para a resistência do parasita (AGUIRRE-GARCIA, 2003).

1.5.5 Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptídeoglicanos

Os lipofosfoglicanos (LPG) e lipofosfopeptídeoglicanos (LPPG) são proteofosfoglicanos, presentes na superfície dos trofozoítos e acredita-se que essas moléculas colaborem para a citotoxicidade amebiana, além de impedir a ativação do complemento. As cepas patogênicas de *E. histolytica* apresentam altos níveis de LPG e LPPG, enquanto que as cepas não patogênicas de *E. histolytica* e as de *E. dispar* produzem níveis baixíssimos ou indetectáveis de LPG e, níveis baixos ou formas modificadas de LPPG (MOODY *et al.*, 1997).

1.6 Resposta imune na amebíase

A imunidade inata contribui significativamente nos primeiros dias da infecção amebiana. Auxiliado pelo peristaltismo, o muco colônico produzido pelas células caliciformes presentes na mucosa do ceco e colón, impede a adesão, invasão dos parasitos e a chegada de toxinas ao epitélio, contribuindo também para a colonização pela microbiota nativa (TSE; CHADEE, 1992; VARIYAM, 2007). De fato, em estudo prévio demonstramos que camundongos C57BL6 CD1^{-/-} apresentavam menor camada de muco, bem como menor expressão da mucina MUC2, principal componente do muco colônico, o que contribuiu para a maior intensidade do parasitismo e da colite amebiana ulcerativa (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A resposta imune mediada por células também é importante para a defesa contra *E. histolytica*. Na fase aguda observa-se na mucosa e submucosa uma grande quantidade de neutrófilos e outras células inflamatórias, dentre elas os macrófagos, linfócitos e eosinófilos (PRATHAP; GILMAN, 1970). Em contrapartida, nas lesões intestinais e hepáticas, o infiltrado inflamatório ao redor da necrose amebiana humana varia de discreto a moderado, sendo constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos (VENTURA-JUÁREZ *et al.*, 2003).

No início da infecção, os receptores *Toll-like* (TLR) presentes nas células epiteliais, reconhecem e se ligam a lectina amebiana Gal/GalNAc, conseqüentemente, ativando Fator de transcrição NF- κ B e levando a produção de citocinas inflamatórias, dentre elas: as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, Interferon γ (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016). A lectina Gal/GalNAc e os LPPG's presentes na superfície de ambas as espécies ativam as células T CD4 que produzem IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-13 e, células T CD8 que produzem IL-17. A IL-17 estimula a infiltração de neutrófilos e aumenta a secreção de mucinas, peptídeos antimicrobianos e Imunoglobulina A (IgA) no cólon (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016). Estes fatores de virulência amebianos também ativam as células T

Natural Killer (NKT). Um estudo de nosso grupo demonstrou a importância de tais células na imunidade contra os trofozoítos em modelo murino experimental de colite amebiana induzida pela *E. histolytica* (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Quando disseminados pela corrente sanguínea, principalmente para o fígado, os trofozoítos são destruídos pelo IFN- γ secretado pelas células NKT. Já o TNF- α secretado pelos macrófagos hepáticos ativados parece contribuir também para formação do AHA (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016).

Os trofozoítos de *E. histolytica* aumentam a secreção de IL-8 e TNF- α , aumentando rapidamente a ativação e recrutamento dos neutrófilos que não são encontrados em quantidade significativa no AHA, sugerindo que a maioria é destruído, podendo contribuir para o aumento da área do AHA (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Por outro lado, nossos estudos tem demonstrado que o parasitismo é o principal responsável pelo incremento da área de necrose do AHA, já que a supressão significativa da inflamação não reduziu significativamente o dano tecidual (COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2011).

Os níveis de Imunoglobulinas variam conforme o quadro clínico dos pacientes com amebíase. Em pacientes com amebíase intestinal são observados níveis séricos elevados de IgA e IgM, porém apresentam-se diminuídos em pacientes com amebíase hepática, na qual predomina a classe IgG e seus isotipos IgG1, IgG2 e IgG3, sugerindo uma resposta T-*helper* do tipo 2 (Th2) (KAUR *et al.*, 2004).

O Sistema Complemento contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória, na destruição e remoção dos parasitos (BOHLSON *et al.*, 2007). Contudo, os trofozoítos conseguem escapar da ação do complemento resistindo à lise através da clivagem e inativação de C3a e C5a (BRAGA *et al.*, 1992; REED *et al.*, 1995), apesar de muitos deles também serem lisados pelo complemento (COSTA *et al.*, 2010b). Além disso, estudos também mostraram a eliminação de trofozoítos pela ação do óxido nítrico (NO) (RAMOS *et al.*, 2007) e das espécies reativas de oxigênio (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016).

1.7 Apoptose induzida por *Entamoeba histolytica*

O sucesso da invasão amebiana se deve à indução de morte celular e fagocitose das células hospedeiras (HUSTON *et al.*, 2003). Nos estágios iniciais da infecção, os trofozoítos podem causar lesões inespecíficas. Todavia, caso haja progressão da lesão, a infiltração celular em torno dos trofozoítos ocasiona rapidamente lise das células inflamatórias e consequente necrose tecidual (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). No entanto,

há indícios de que a apoptose também pode contribuir para o dano tecidual. Inibidores de adesão dos trofozoítos como a D-galactose reduziram significativamente os índices de apoptose no epitélio intestinal de camundongos inoculados com *E. histolytica*, mediante ação da lectina GAL/GALNAc que promoveu ativação da caspase 3, independente de caspases 8 e 9 (HUSTON *et al.*, 2000).

O termo apoptose (*a-po-toe-sis*) foi citado pela primeira vez por Kerr e colaboradores em 1972, e define uma forma morfológicamente distinta de morte celular, na qual ocorre autodestruição da célula com consumo de energia, síntese proteica e preservação das estruturas de membrana que impede a sua autólise (ELMORE, 2007).

A apoptose consiste de mecanismos altamente complexos e regulados que participam de vários processos biológicos, tais como: embriogênese, formação de órgãos e no controle da população celular (JACOBSON *et al.*, 1997; WYLLIE, 1980). Sabe-se que todos os processos celulares são cuidadosamente regulados e, qualquer alteração nas vias de controle dessa regulação, faz com que a apoptose torna-se patológica (MARTINEZ *et al.*, 2010).

A ativação da apoptose envolve duas principais vias, na qual os constituintes de uma via podem influenciar a outra: a via extrínseca ou via do receptor de morte, que é dependente de caspase 8 e, a via intrínseca ou mitocondrial, dependente de caspase 9. Cada via requer uma sinalização específica para iniciar a cascata de eventos moleculares dependente de energia (Figura 2) (ELMORE, 2007).

As caspases são proteases de cisteína que clivam proteínas na região C-terminal em resíduos de aspartato e são classificadas conforme a sequência de ativação e atuação na apoptose: caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10) e caspases efetoras (3 e 7) (PARK, 2012). Já as caspases 1, 4 e 5 estão envolvidas no processo inflamatório (FUENTES-PRIOR; SALVESSEN, 2004).

Muitas células expressam moléculas de superfície conhecidas como Receptor de morte (DR), tais como os membros da superfamília do gene do TNF. A porção intracelular do DR é conhecida como Domínio de morte (DD) e faz a ligação do sinal de morte da superfície celular para as vias de sinalização intracelular. Os principais ligantes e seus respectivos receptores de morte que melhor caracteriza a via extrínseca são: Ligante Fas (FasL) ou ligante Apo-1/CD95 e Receptor Fas (FasR); Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e receptor de fator de necrose tumoral 1 TNFR1 (ELMORE, 2007). A ligação FasL/FasR resulta na proteína adaptadora Fas-associada ao domínio de morte (FADD) e a ligação do TNF- α / TNFR1 resulta na ligação da proteína adaptadora TRADD (receptor associado ao domínio de morte TNF). Esse agrupamento de receptor-ligante forma o complexo sinalizador indutor de morte (DISC), que ativa a caspase-

8 e conseqüentemente as caspases efetoras 7 e 3, resultando na clivagem nuclear de proteínas e no início da apoptose (ELMORE, 2007; MARTINEZ *et al.*; 2010).

Na via intrínseca ou mitocondrial, vários estímulos, tais como: radiação, hipóxia, toxinas, entre outros, podem causar a transição da permeabilidade mitocondrial, que é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna com conseqüente abertura de poros. Após a abertura dos poros ocorre a liberação de moléculas pró apoptóticas para o citosol: 1º) o citocromo c, se associa a Apaf-1 (Fator ativador de protease apoptose 1) formando o apoptossomo, ocasionando a conversão da pro caspase 9 em caspase 9 e ativação das caspases 3 ou 7, dando início a apoptose; 2º) a proteína Segundo ativador mitocondrial de caspases (Diablo ou SMAC) inibe a proteína inibidora de apoptose (IAP) permitindo a ativação de caspases (ELMORE, 2007; MARTINEZ *et al.*, 2010). Com a progressão da apoptose e com a célula destinada a morrer, ocorre a liberação de outras moléculas apoptogênicas: Fator indutor de apoptose (AIF) que ativa a caspase 9 e as endonucleases. A AIF e endonucleases G seguem para o núcleo, sendo que a AIF provoca a fragmentação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) em pedaços de aproximadamente 50 a 300 kb e a condensação da cromatina nuclear periférica. Já a endonuclease G quebra a cromatina nuclear para produzir oligonucleotídeos de DNA (ELMORE, 2007).

Além das vias citadas, existe uma via adicional dependente de perforinas/granzimas (serina proteases presentes em grânulos citoplasmáticos) que envolve a citotoxicidade das células T (Figura 2). Esta via pode induzir apoptose por meio de granzimas A (GrA) ou B (GrB). Embora cada via requeira sinalização específica para iniciar uma cascata de eventos moleculares, a via da granzima A atua independente das caspases, causando danos ao DNA. Já as vias intrínseca, extrínseca e a da granzima B atuam na ativação de caspases iniciadoras (8, 9, 10) que conseqüentemente ativarão a caspase executora 3 (ELMORE, 2007). Como resultado da atividade das caspases executoras têm-se as características bioquímicas e morfológicas da apoptose, tais como: fragmentação do DNA, degradação de proteínas citoesqueléticas e nucleares, expressão de fosfatidilserina e de outras moléculas para reconhecimento pelos receptores de células fagocitárias, formação dos corpos apoptóticos, e finalmente captação por estas células, prevenindo o desenvolvimento de inflamação (SAVILL, 1997; ELMORE, 2007).

Por intermédio da eletroforese de DNA em gel de agarose, é possível detectar o clássico “padrão em escada”, resultante da fragmentação internucleosomal do DNA por endonucleases, em fragmentos aproximadamente de 180 pares de base, (WYLLIE *et al.*, 1980). A identificação “*in situ*” deste tipo de fragmentação pode ser feita através do método de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) que detecta as extremidades 3'-OH do

DNA fragmentado, por meio da enzima transferase terminal de deoxinucleotídeo (TdT), ao incorporar nucleotídeos marcados às extremidades livres do DNA (GAVRIELI *et al.*, 1992).

As proteínas da família Bcl-2 (Linfoma de Células B2) participam da regulação da apoptose através de proteínas anti e pró-apoptóticas que irão determinar a sobrevivência ou a morte da célula, respectivamente (SINGH R. *et al.*, 2019). As proteínas antiapoptóticas incluem: Bcl-2, Bcl-x; Bcl-xl, Bcl-xs, Bcl-w e Bag e, algumas das proteínas pró-apoptóticas incluem Bcl-10, Bax, Bak, Bid e Bad. Acredita-se que as proteínas da família Bcl-2 desempenham o papel importantíssimo na regulação e liberação do citocromo c, quando há um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial (ELMORE, 2007).

Após a apoptose ser desencadeada ocorre a liberação de proteínas pró-apoptóticas, tais como Bax e Bak, que aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial externa através da formação de poros, resultando na liberação das moléculas apoptogênicas. Por sua vez, estas proteínas ativadoras pró-apoptóticas podem ser ligadas e inibidas por proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2, Bcl-xl e a MCL1, perpetuando a sobrevivência celular (SINGH R. *et al.*, 2019).

Evidências têm demonstrado que a *E. histolytica* é capaz de induzir apoptose em hepatócitos e células inflamatórias independente das vias Fas/FasL e TNF- α /TNFr, utilizando-se das amebaporos e de outras moléculas amebianas (SEYDEL; STANLEY, 1998), contribuindo significativamente tanto na expansão do AHA (YAN; STANLEY, 2001) como também na infecção intestinal amebiana (BECKER *et al.*, 2010). A apoptose também pode ocorrer em células mieloides murinas independente de Bcl-2, visto que a super expressão da proteína Bcl-2 não impediu a fragmentação do DNA das células murinas (RAGLAND *et al.*, 1994). Nosso grupo de pesquisa relatou pela 1ª vez a presença de células em apoptose no AHA induzido pela *E. Dispar*, sugerindo a participação deste outro tipo de morte celular na ampliação do dano tecidual produzido por esta espécie (COSTA *et a.*, 2010a).

Um estudo de inibição da ligação da lectina Gal/GalNAc com D-galactose, mostrou que esta inibição pode prevenir a fragmentação do DNA pela *Entamoeba histolytica* (HUSTON *et al.*, 2000), reforçando a ideia que a indução da apoptose é contato-dependente entre célula do hospedeiro e parasito (HUSTON *et al.*, 2000; RAVDIN *et al.*, 1980; MARTINEZ-PALOMO *et al.*, 1985). No mesmo estudo, a inibição da CP e da atividade da calpaína (outra enzima desencadeadora de apoptose) reduziu a atividade da CP, sugerindo que este fenômeno é independente de CP e que a calpaína também não está envolvida (HUSTON *et al.*, 2000). Além do mais, o cultivo de células deficientes em caspase 8 e tratadas com um inibidor de caspase 9 não impediu a fragmentação do DNA, ao contrário do observado quando tratadas com um

inibidor de caspase 3, sugerindo que a apoptose por *E. histolytica* ocorre através de um mecanismo independente da caspase 8 e 9 e dependente da caspase 3 (HUSTON *et al.*, 2000).

Assim como em organismos multicelulares, a fagocitose de corpos apoptóticos na amebíase serve para limitar o processo inflamatório, impedindo a liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios das células destruídas, o que contribui, apesar do elevado dano tecidual, para a escassez do infiltrado inflamatório ao redor das lesões amebianas no fígado e no cólon e, para o estabelecimento de uma infecção persistente por *E. histolytica* (HUSTON *et al.*, 2003).

Estudo “*in vitro*” mostrou que a maioria das células fagocitadas pelos trofozoítos eram apoptóticas e positivas para caspase 3 (HUSTON *et al.*, 2003). No mesmo estudo, os autores verificaram que a fagocitose foi inibida pelo uso de D-galactose, porém foi aumentada com a expressão da fosfatidilserina na membrana externa das células apoptóticas.

A apoptose parece ser um dos mecanismos de sobrevivência desenvolvido durante o processo evolutivo na maioria das espécies animais e vegetais com variações inter e intra-espécies (RAMOS *et al.*, 2007). Este mecanismo, preservado em diferentes parasitos tais como *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondi*, *Acanthamoeba*, *Leishmania major*, *Cryptosporidium parvum*, *Trichinella spiralis* e a *E. Histolytica*, parece favorecer o sucesso de seu ciclo biológico nos hospedeiros (BIENVENU *et al.*, 2010).

1.8 Destruição de *Entamoeba histolytica* por apoptose

Embora ocorra com algumas diferenças moleculares, a morte celular por apoptose tem sido descrita ocorrer em parasitos, tais como em *Leishmania* sp, *Trypanosoma* sp., *Giardia* sp. e *E. histolytica*, (RAMOS *et al.*, 2007). Estudo “*in vitro*” demonstrou que o óxido nítrico (NO) foi capaz de induzir apoptose de *E. histolytica* independente de caspases, provavelmente utilizando uma proteína p53-like (RAMOS *et al.*, 2007).

Em 2011, um estudo “*in vivo*” sobre a interação parasito-hospedeiro e a reação inflamatória induzida pela *E. histolytica*, identificou a presença de trofozoítos com alterações morfológicas típicas de apoptose. Pelo método de TUNEL, os autores detectaram a fragmentação internucleosomal do DNA, tendo sido proposto que a produção de óxido nítrico pelas células inflamatórias poderia estar envolvida no desencadeamento deste tipo de morte celular nos trofozoítos (VILLALBA-MAGDALENO *et al.*, 2011).

Alguns autores conseguiram demonstrar a participação de proteínas calpaína-like cálcio dependentes, bem como a elevação dos níveis de cálcio em trofozoítos de *E. histolytica* durante

a fase de execução da apoptose (VILLALBA *et al.*, 2007; NANDI *et al.*, 2010; MONROY, 2015). Em contrapartida, tais trabalhos não conseguiram detectar a presença de proteínas caspase-like nesta espécie.

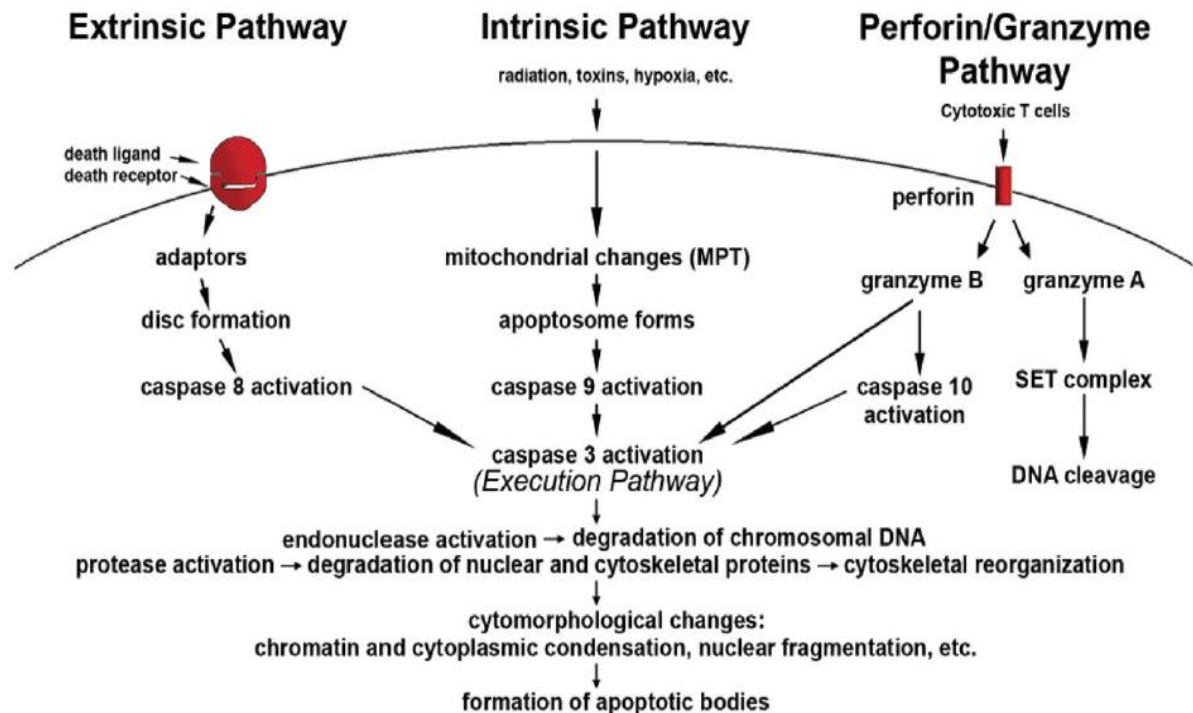


Figura 2: Esquema de representação de eventos apoptóticos: vias extrínseca, intrínseca e via dependente de perforina/granzima. Cada via requer sinalização específica para iniciar uma cascata de eventos moleculares dependente de energia. Cada via ativa sua própria caspase iniciadora (8, 9, 10) que, por sua vez, ativará a caspase executora 3. No entanto, a granzima A funciona de maneira independente da caspase. O caminho da execução resulta em características citomorfológicas, incluindo encolhimento celular, condensação de cromatina, formação de bolhas citoplasmáticas, corpos apoptóticos e, finalmente, fagocitose dos corpos apoptóticos por células parenquimatosas adjacentes, células neoplásicas ou macrófagos. Fonte: (ELMORE, 2007).

1.9 Infecção experimental por *Entamoeba dispar* e ruptura de paradigmas

Até 1997 a *Entamoeba dispar* era considerada apenas como um micro-organismo não patogênico, responsável apenas pelas infecções assintomáticas (WHO, 1997). Porém a partir da década de 1990 conseguiu-se reproduzir experimentalmente a colite amebiana e o AHA através de cepas de *E. dispar* isoladas no Brasil, cultivadas juntamente com a microbiota indígena do paciente a qual foi isolada (COSTA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2000).

Mesmo sendo considerada uma espécie não invasiva e incapaz de produzir doença, a *E. dispar* já foi isolada de seres humanos portadores de colite não disentérica (COSTA *et al.*, 2000)

e sequências do seu DNA foram identificadas por técnicas de biologia molecular em amostras de pacientes portadores do AHA (XIMÉNEZ *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos também demonstraram que esta espécie também poderia ser capaz de produzir amebíase sintomática humana, tanto no intestino grosso (GRAFFEO *et al.*, 2014), como no fígado (XIMÉNEZ *et al.*, 2010).

Nesse sentido, tais evidências recentes demonstraram que *E. dispar* poderia apresentar algum potencial patogênico para seres humanos. Ximénes e colaboradores (2010) encontraram polimorfismo gênico em AHA infectados com *E. dispar*, sugerindo algumas hipóteses para essa variedade: coinfeção intestinal por *E. histolytica* e *E. dispar*, na qual a *E. dispar* se beneficia da virulência de *E. histolytica* e invade passivamente a mucosa intestinal, alcançando o fígado; a relação parasito-hospedeiro e o potencial patogênico da cepa de *E. dispar* contribuem para a formação do AHA e, finalmente, a simbiose entre enterobactérias patogênicas do hospedeiro e os trofozoítos atuariam em conjunto promovendo a infecção extraintestinal (XIMÉNEZ *et al.*, 2010).

A colite amebiana e o AHA experimentais produzidos pela *E. dispar* desenvolvem-se somente a partir de cepas associadas com bactérias do hospedeiro, sugerindo que as mesmas poderiam causar lesões iniciais que favoreceriam a proliferação e invasão do tecido pelos trofozoítos e/ou aumentariam a expressão de fatores de virulência e/ou provocariam mudanças genotípicas. Nesse sentido, é bem provável que a aquisição da patogenicidade de cepas de *E. dispar* está relacionada à interação com a microbiota indígena do hospedeiro onde foi isolada. (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Outros micro-organismos patogênicos talvez possam também interferir na virulência e patogenicidade da *E. dispar*. De fato, ao associar cepas de *E. dispar* com a *Salmonella entérica* Sorovar Typhimurium, nosso grupo observou aumento da expressão gênica de amebaporo A, lectina Gal/GalNAC e da CP5 nas cepas MCR, ADO e VEJ, correlacionando-se positivamente com o aumento da intensidade das lesões amebianas cecais experimentais, como a necrose e a inflamação (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Estudo recente de nosso grupo avaliou a patogenicidade e a cinética evolutiva do AHA produzido experimentalmente pelas cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar* e, pela cepa EGG de *E. histolytica*. Nesse estudo observamos que a cepa ACFN, isolada de paciente assintomático do município de Belo Horizonte/MG, no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, foi a mais patogênica. No 3º dia após infecção (DPI) o AHA era constituído por zona central de necrose liquefativa circundada por borda rica em debris celulares, grande quantidade de trofozoítos (também presentes no interior da área de

necrose), poucos neutrófilos e macrófagos e, escasso tecido de granulação. Também foram observadas diferentes células com aspectos morfológicos de apoptose. Tais áreas de necrose ampliaram significativamente até o 8º dia após a infecção (DPI), levando ao óbito 100% dos Hamsters a partir do 9º DPI (SILVA *et al.*, 2021).

A cepa MCR de *E. dispar*, isolada de paciente assintomático e com sorologia (ELISA) negativa para *E. histolytica* (GOMES *et al.*, 2000) foi capaz de causar AHA tão importante e significativo quanto o produzido pela cepa EGG de *E. histolytica* (COSTA, *et al.*, 2007). O AHA induzido por essa cepa foi estudado e descrito detalhadamente em uma cinética de 16 dias de infecção (COSTA, *et al.*, 2010a; da SILVA *et al.*, 2021).

2. JUSTIFICATIVA

A amebíase é uma doença negligenciada, que acomete indivíduos em várias regiões do mundo, comprometendo a saúde e ocasionando óbito de parte significativa dos pacientes acometidos. A indução da apoptose em células do hospedeiro é um dos mecanismos utilizados pelos trofozoítos para causar lesões intestinais e hepáticas. Há poucos estudos sobre apoptose na amebíase, apenas um sobre este tipo de morte celular no AHA induzido experimentalmente pela *Entamoeba dispar* (Costa *et al.*, 2010a) e ainda não foi completamente esclarecida a patogênese das lesões amebianas.

Sendo assim, torna-se necessário verificar se a *E. dispar* é capaz de induzir apoptose, realizar mais estudos exploratórios no sentido de aprofundar o conhecimento sobre o papel da apoptose induzida pela *E. histolytica* e *E. dispar* na infecção experimental, na tentativa de identificar e avaliar os prováveis mecanismos envolvidos, contribuindo para aumentar a compreensão da patogênese da amebíase.

3. OBJETIVO GERAL

Investigar a apoptose no abscesso hepático amebiano experimental (AHA) induzido pela *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*.

3.1 Objetivos específicos

No fígado de hamsters inoculados com cepas de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* e, eutanasiados 3 dias após a infecção:

- ✓ 3.1.1 Investigar e quantificar a ocorrência de apoptose no AHA;
- ✓ 3.1.2 Avaliar e quantificar a ocorrência de apoptose em trofozoítos presentes no AHA;
- ✓ 3.1.3 Investigar os mecanismos de apoptose através da expressão de caspase 3 clivada, Bax e Bcl-2 no AHA e, nos trofozoítos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

O presente trabalho foi realizado com amostras de projetos previamente aprovados e executados em conformidade com as normas da Comissão de Ética em Uso Animal – CEUA - da Universidade Federal de Minas Gerais, sob os protocolos de números 154/2005 e 252/2018, nas instalações dos Laboratórios de Protozooses e de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral (DPAG) e, do Laboratório de Amebíase e de Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Foram utilizados fragmentos de fígado emblocados em parafina, de 16 hamsters (*Mesocricetus auratus*), sendo 8 hamsters inoculados com a *E. dispar* (Grupo ED) e 8 inoculados com a *E. histolytica* (Grupo EH). Os blocos de parafina com as respectivas amostras pertenciam ao acervo do Laboratório de Protozooses do DPAG/ICB/UFMG.

4.2 Cepas de *Entamoeba histolytica* e de *Entamoeba dispar*

Os fragmentos de fígado avaliados foram provenientes de hamsters inoculados com as cepas ACFN e EGG e, eutanasiados ao 3º dia após a infecção (3 DPI). A cepa EGG de *E. histolytica*, de paciente portador de colite disentérica e AHA, no município de Manaus (AM) e a cepa ACFN de *E. dispar* foi isolada de paciente assintomático no município de Belo Horizonte (MG). Ambas as cepas são xênicas, ou seja, estão associadas com a microbiota indígena do indivíduo as quais foram isoladas. A identificação da espécie foi confirmada através da análise do zimodema e PCR.

4.3 Análise histopatológica

Para a análise histopatológica foram obtidos dos blocos selecionados, secções histológicas com 4µm de espessura e realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). Após a coloração, foram feitas reavaliações histopatológicas para confirmação da presença de lesões hepáticas e descrição dos aspectos morfológicos característicos de apoptose presentes nos dois grupos de hamsters.

4.4 Identificação “*in situ*” da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*).

Secções de 4µm de espessura foram obtidas e fixadas em lâminas gelatinizadas para a detecção “*in situ*” da fragmentação do genoma, seguindo o protocolo do kit FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric – Klenow Enzyme - QIA21 (Calbiochem - Sigma-Aldrich; *St. Louis*, USA). Após a desparafinização e hidratação dos cortes, os mesmos foram submetidos à proteinase K por 20 minutos. Já a inativação da peroxidase endógena foi feita em imersão na solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% com metanol. Posteriormente, os cortes foram incubados em câmara úmida a 37°C *overnight* com a enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeo). Após o tempo determinado, adicionou-se o conjugado de peroxidase estreptavidina e a revelação foi feita com o cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) e, a contracoloração, com verde de metila 0,3%. Na sequência, os cortes foram desidratados rapidamente em etanol absoluto, diafanizados em xilol e montados em meio de montagem para lâminas histológicas.

Foram consideradas células positivas para apoptose aquelas que apresentavam grumos corados em tons de marrom revelados pelo DAB e também aquelas com características morfológicas, tais como a diminuição do seu tamanho e volume, perda do contato com a matriz extracelular e células vizinhas (Anoiquia), redução nuclear (Picnose), formação de corpos apoptóticos e fragmentação da membrana nuclear (Cariorrexe).

4.5 Reações imuno-histoquímicas

Cortes histológicos de 4µm de espessura foram fixados em lâminas gelatinizadas e preparados para as reações imuno-histoquímicas. Foi utilizado um kit comercial de detecção anti-mouse/anti-rabbit (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigênica foi realizada por meio de exposição das lâminas com os cortes à solução de ácido cítrico 1%, em calor úmido e pressão por 8 minutos (Panela de pressão elétrica Mondial PE-09). Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados *overnight* em câmara úmida e escura com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal produzido em coelho anticaspase 3 clivada (AB3623-90609, diluição 1:40, Millipore Corporation, EUA); anticorpo policlonal produzido em coelho anti-Bax (sc-526, diluição 1:80, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA);

anticorpo policlonal produzido em coelho anti-Bcl-2 (sc-492, diluição 1:80, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA);). As reações foram reveladas com o cromógeno 3-3' diaminobenzina (DAB) e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, diafanizadas em xilol e montadas em meio de montagem para lâminas histológicas. Como controle negativo da reação, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS).

4.6 Análise quantitativa da área de marcação Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺, Bcl-2⁺ e semiquantitativa de trofozoítos⁺ para os mesmos marcadores.

Todos os cortes histológicos submetidos às reações imuno-histoquímicas foram digitalizados utilizando o scanner de lâminas 3DHISTECH Panoramic MIDI (Budapest, Hungary). Através do programa Panoramic Viewer foram obtidas aleatoriamente 20 imagens da borda do AHA, por meio da objetiva de 40X do microscópio Axiolab - Carl Zeiss (Oberkochen, Germany), perfazendo uma área total de $8,69 \times 10^5 \mu\text{m}^2$, de acordo com metodologia previamente padronizada para a obtenção das medidas (COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010a; COSTA *et al.*, 2010b; COSTA *et al.*, 2011). Para o cálculo das medidas foi utilizado o programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss.

As áreas das marcações imuno-histoquímicas Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ foram calculadas em μm^2 através de algoritmos construídos no programa KS300, contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de marrom (marcação imuno-histoquímica positiva) para a criação de uma imagem binária e processamento digital, tomando-se o cuidado de excluir manualmente com o auxílio do cursor, todos os trofozoítos positivos para cada marcador (CALIARI, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Para quantificar a intensidade das marcações, utilizamos o cálculo da densidade ótica (DO) através do mesmo programa de morfometria, por meio de outro conjunto de algoritmos (CALIARI, 1997; COSTA *et al.*, 2010b). A DO é a razão entre a luz transmitida e a luz incidente no comprimento de onda de 500 nm, de acordo com a Lei de Beer: $DO = -\log I/I_0$. Onde I_0 é a intensidade total da luz que atravessa as áreas não marcadas do espécimen e I é a intensidade de luz transmitida do objeto analisado dividido pela área. Em uma imagem de espécime digital, I é proporcional aos valores dos pixels. Assim, valores menores de DO correspondem a uma intensa imunomarcação e, conseqüentemente, maior ligação dos anticorpos monoclonais às proteínas Caspase 3 clivada, Bax, Bcl-2 aos hepatócitos, outras

células do fígado, restos celulares e trofozoítos. Por outro lado, valores maiores de DO indicam uma marcação imuno-histoquímica mais fraca e menor concentração de anticorpos ligados aos antígenos. Os valores de DO foram expressos em unidades de tons de cinza (Grey) (COSTA *et al.*, 2010b).

Além disso, todos os trofozoítos Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ foram semi-quantificados nos cortes histológicos, sendo considerada como marcação positiva quando o parasito apresentava-se corado de marrom devido à revelação pelo DAB. Cada corte histológico foi completamente analisado utilizando a objetiva de 20X do microscópio Axiolab – Carl Zeiss, sendo feita a seguinte classificação do parasitismo: discreta (presença de 1 a 5 trofozoítos por campo), moderada (presença de 6 a 20 trofozoítos por campo) e intensa (presença acima de 21 trofozoítos por campo).

Para a análise da DO, todos os trofozoítos presentes em cada imagem foram completamente separados do restante do tecido por meio da criação de um plano gráfico, selecionados todos os pixels de sua marcação, criadas as imagens binárias, processadas e utilizadas para o cálculo da DO na unidade Grey, seguindo a mesma metodologia mencionada acima (CALIARI, 1997; COSTA *et al.*, 2010b; TOSCANO *et al.*, 2019).

O grupo de hamsters inoculados com *E. histolytica* (Grupo EH) foi utilizado como controle para avaliação da área Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ no AHA, bem como em relação à DO de cada marcação e ao número de trofozoítos positivos para cada marcador.

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software *GraphPadPrism* 8 (GraphPadInc, EUA), o teste de *Grubb* para detectar os *outliers* e, para verificação da distribuição dos dados, o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para análise de variância foram utilizados os testes *t* de *Student* para os dados paramétricos e *Mann-Whitney* para os dados não-paramétricos. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Análises histopatológicas

Em todas as lâminas analisadas foram observadas lesões típicas do AHA, já descritas detalhadamente em publicações de nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et*

al., 2010a; SILVA *et al.*, 2021), sendo que as lesões do grupo ED foram tão significativas quanto às do grupo EH. As secções histológicas apresentaram extensas áreas de necrose delimitadas por borda constituída por detritos celulares, infiltrado inflamatório discreto a moderado, constituído principalmente por macrófagos e neutrófilos e, quantidade variável de tecido de granulação. Mais frequentemente, quantidade variável de trofozoítos foi observada na borda e no centro do AHA e, alguns também estavam presentes nos capilares sinusóides do parênquima hepático não necrosado (Figura 3 A-D).

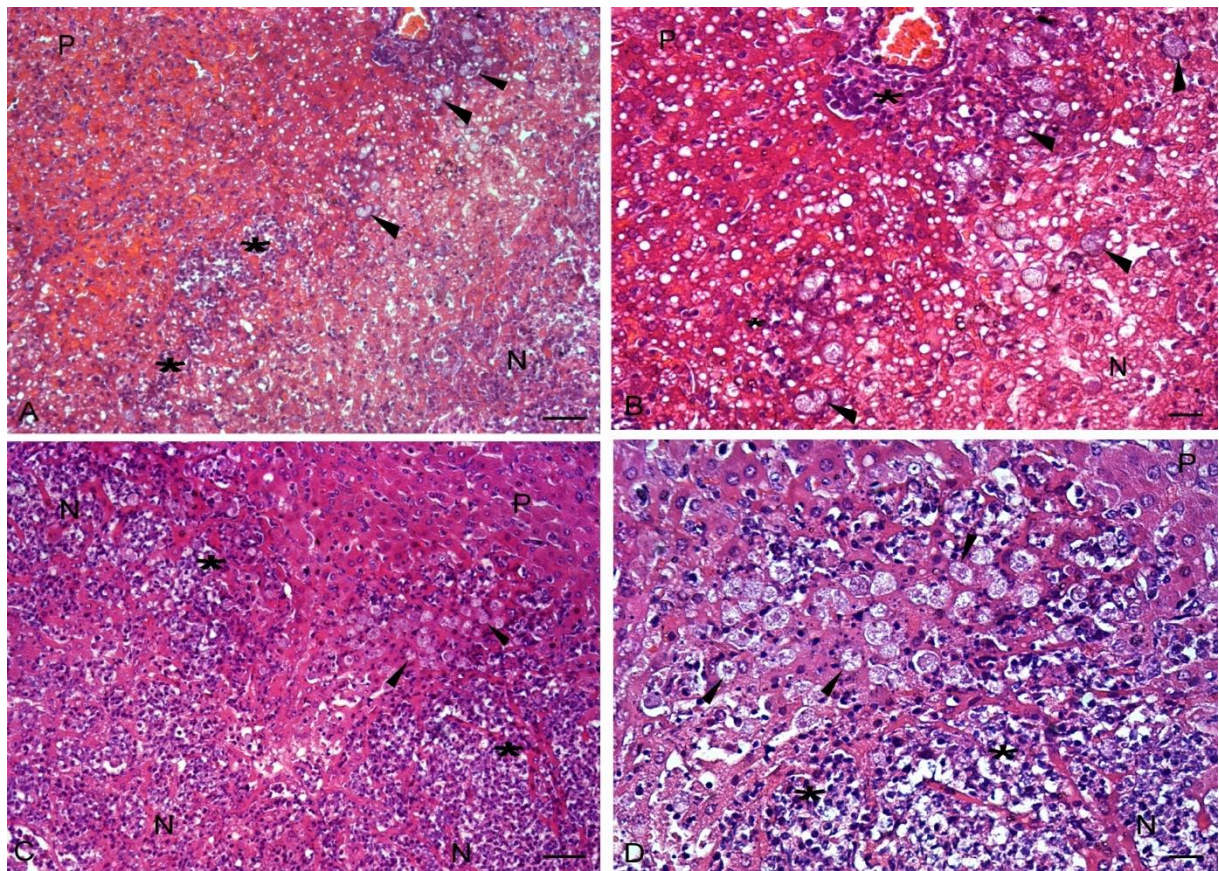


Figura 3. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; análises histopatológicas. (A) Borda do Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*, constituído por faixa de debris celulares e infiltrado inflamatório (*), zona central de necrose (N), bem como por grande número de trofozoítos (cabeças de seta), delimitada por parênquima hepático não necrosado (P). Barra = 50 µm; (B) Maior aumento da figura anterior. Barra = 20 µm; (C) AHA induzido por *E. dispar* com as mesmas lesões e estruturas. Barra = 50 µm; (D) Maior aumento da figura anterior. Barra 20 = µm. Hematoxilina & Eosina.

5.2 Investigação de apoptose no AHA por meio do ensaio de TUNEL

Para investigar a ocorrência de apoptose no AHA dos hamsters inoculados com as cepas ACFN de *E. dispar* e EGG de *E. histolytica*, realizamos o ensaio de TUNEL em secções

histológicas de fragmentos de fígado. Nas análises qualitativas das amostras observamos em todas as lâminas analisadas, coloração TUNEL positiva, caracterizada por coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos (Figura 4 A-D). Em menor quantidade, marcações positivas também foram observadas em áreas do parênquima hepático não necrosado (Figura 4 A-B).

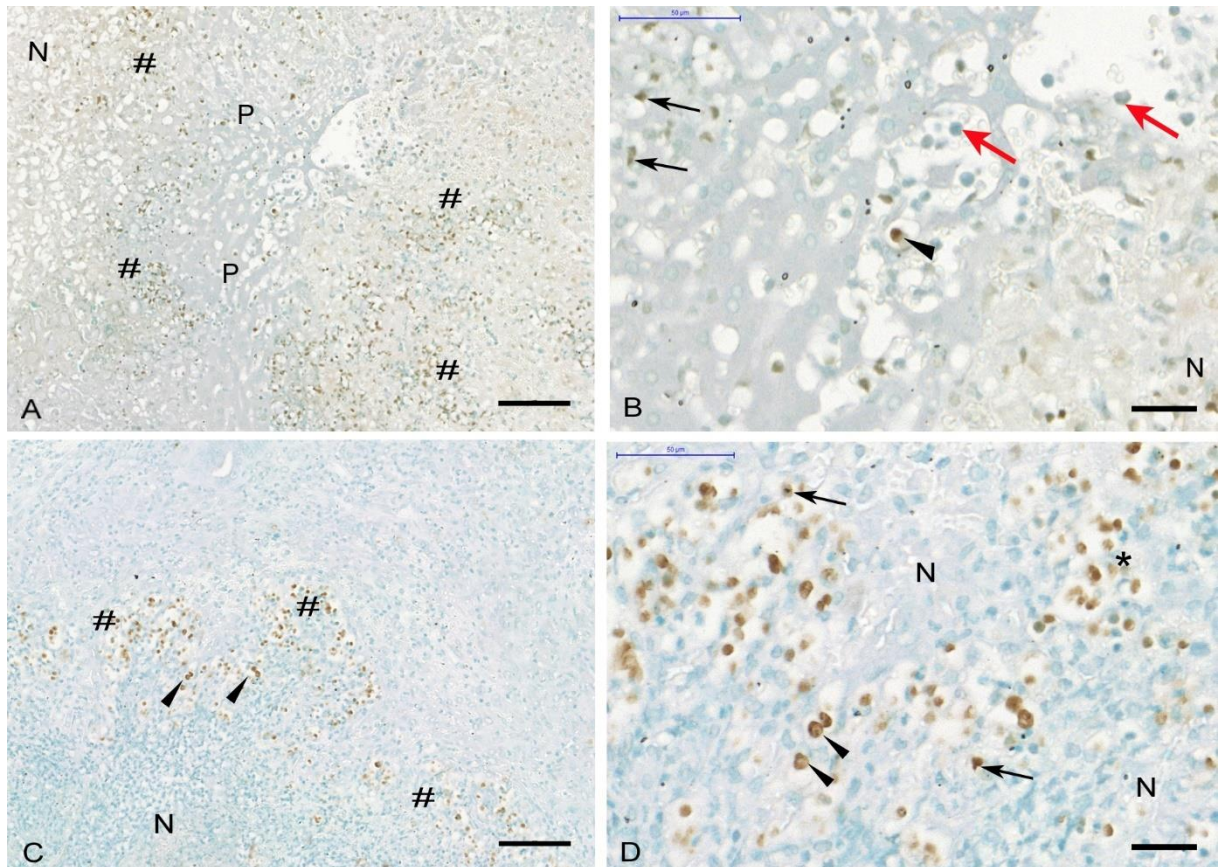


Figura 4. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; ensaio de TUNEL. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Notar a presença de várias marcações TUNEL⁺, visualizadas como precipitados marrom-escuros, principalmente nas áreas de necrose (#) e, em menor quantidade, no parênquima hepático não necrosado (P); (B) Maior aumento da figura anterior. Trofozoíto TUNEL⁺ (cabeça de seta) e maior número de trofozoítos TUNEL⁻ (setas vermelhas). Reações TUNEL⁺ em prováveis células inflamatórias (setas); (C) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. dispar*. Grande quantidade de marcações TUNEL⁺ de coloração marrom-escuro na borda do AHA (#), quantidade menor destas marcações na área central de necrose (N) e escassas marcações no parênquima hepático não necrosado (P); (D) Maior aumento da figura anterior mostrando trofozoítos TUNEL⁺ com anoiquia e picnose (Cabeças de setas). Reações TUNEL⁺ em prováveis células inflamatórias (setas). TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*). Barra = 50 µm.

5.3 Análises morfométricas das áreas Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ nos AHA's induzidos por *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

5.3.1 Caspase 3 clivada⁺

Em todas as lâminas analisadas foram observadas marcações Caspase 3 clivada⁺ em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos, caracterizadas pela coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB. Tal marcação indicou o desenvolvimento de apoptose nestas células dos AHA's de ambos os grupos de Hamsters (Figura 5 A-D), corroborando com os achados no ensaio de TUNEL. A substituição do anticorpo 1° por PBS produziu reação negativa (Figura 5 E). A análise qualitativa destas reações imuno-histoquímicas demonstrou maior área de marcação nos hamsters do Grupo EH quando comparado ao grupo ED.

A análise morfométrica demonstrou maior área Caspase 3 clivada⁺ no AHA induzido pela *E. histolytica*, em comparação com o produzido pela *E. dispar*, indicando maiores níveis de apoptose ($p=0,0056$) (Figura 5 F). Não foi observada diferença na DO entre os dois grupos de hamsters (Figura 5 G).

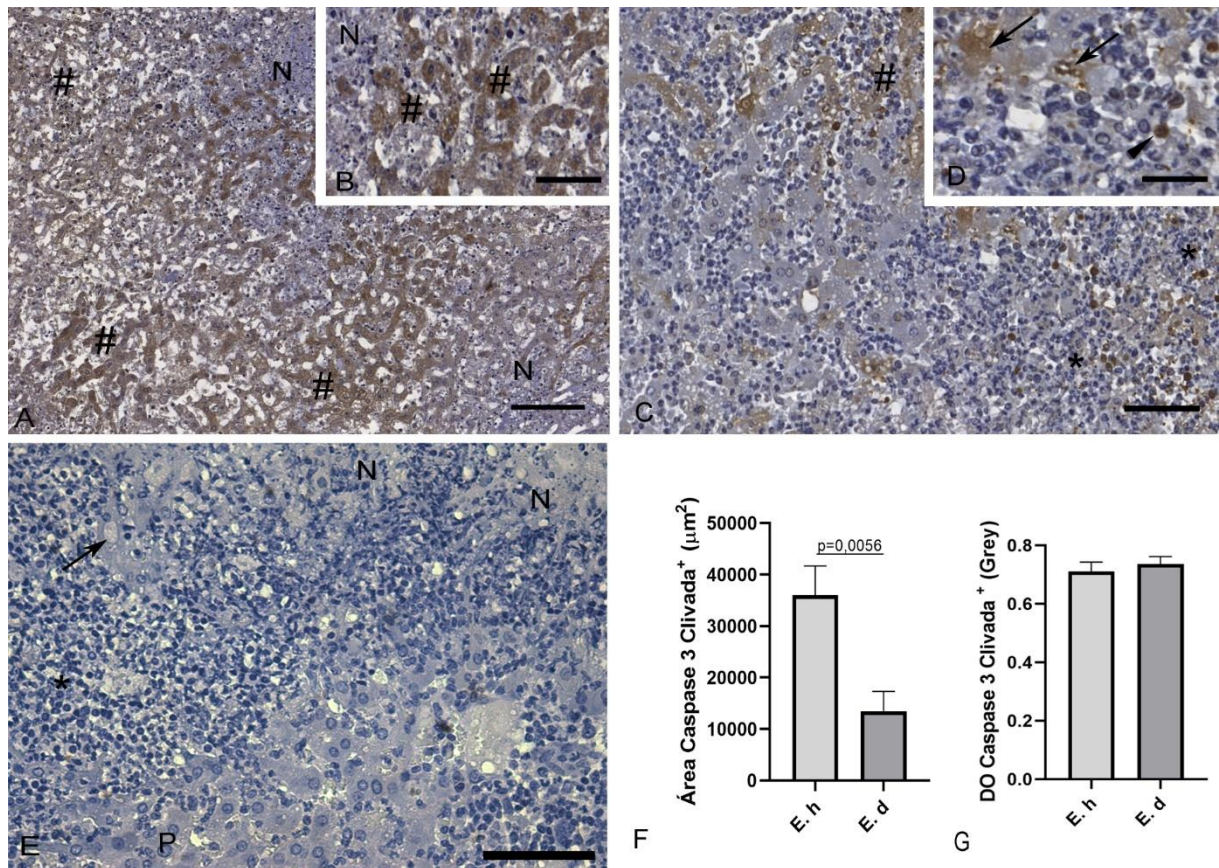


Figura 5. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; imuno-histoquímica caspase 3 clivada. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Amplas áreas Caspase 3 clivada⁺ (#). Barra = 50 μm ; (B) Detalhe da figura anterior mostrando hepatócitos Caspase 3 clivada⁺ (#). Barra = 20 μm ; (C) AHA induzido por *E. dispar*. Menor área Caspase 3 clivada⁺ (#) em comparação com o grupo EH.

Barra = 50 μm ; **(D)** Detalhe da figura anterior hepatócitos (setas) e célula inflamatória (cabeça de seta) Caspase 3 clivada⁺. Barra = 20 μm ; **(E)** Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Caspase 3 clivada. Notar a ausência de marcações positivas. Trofozoíto negativo (seta). Barra = 50 μm . Debris celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Contracoloração por Hematoxilina. **(F)** Área caspase 3 clivada⁺ (μm^2), $p=0,0056$, teste *t* de *Student* não-pareado; **(G)** Densidade óptica (DO) das áreas caspase 3 clivada⁺ (Grey), teste *t* de *Student* não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média \pm S.E.M, $n = 8$.

5.3.2 Bax⁺

Marcações Bax⁺ coradas com tons de marrom foram detectadas em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos em todas as lâminas (Figura 6 A-D). A substituição do anticorpo 1^o por PBS produziu reação negativa (Figura 6 E).

Foi observada redução da DO de Bax⁺ no AHA induzido pela *E. histolytica*, indicando aumento da intensidade de marcação imuno-histoquímica e maior expressão da proteína (Figura 6 G) ($p=0,0271$). A maior expressão de Bax⁺ no grupo EH sugere a participação da mesma na indução de maiores níveis de apoptose neste grupo. Por outro lado, não foi verificada diferença na área de marcação Bax⁺ entre os grupos EH e ED (Figura 6 F).

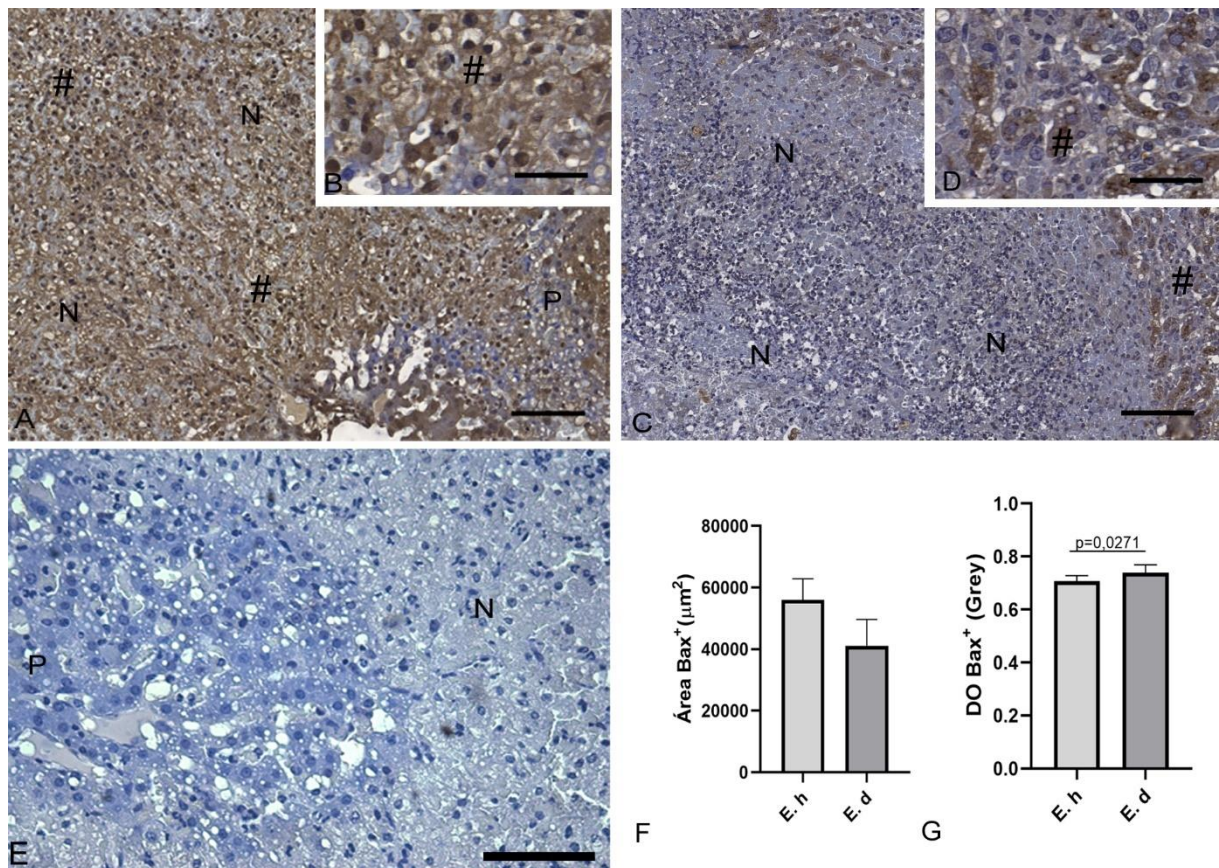


Figura 6. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*, imuno-histoquímica Bax. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Amplas áreas Bax⁺ (#). Barra = 50 µm; (B) Detalhe da figura anterior mostrando hepatócitos Bax⁺ (#). Barra = 20 µm; (C) Menor área Bax⁺ (#) em comparação com o grupo EH. Escassos hepatócitos Bax⁺ (cabeças de seta). Barra = 50 µm; (D) Detalhe da figura anterior mostrando alguns hepatócitos Bax⁺ (setas). Barra = 20 µm; (E) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Bax. Notar a ausência de marcações positivas. Barra = 50 µm. Debris celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Contracoloração por Hematoxilina. (F) Bax⁺ (µm²); (G) Densidade óptica (DO) das áreas Bax⁺ (Grey), $p = 0,0271$, teste *t* de Student não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média ± S.E.M, n = 8.

5.3.3 Bcl-2⁺

Todas as lâminas analisadas dos dois grupos de hamsters apresentaram marcações Bcl-2⁺ em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos, caracterizadas pela coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB (Figura 7 A-D). A substituição do anticorpo 1º por PBS produziu reação negativa (Figura 7 E). Qualitativamente foi observada maior marcação imuno-histoquímica no grupo ED em relação ao grupo EH.

A análise morfométrica demonstrou maior área Bcl-2⁺ no AHA induzido pela *E. dispar* ($p=0,0001$), em comparação com o produzido pela *E. histolytica*, assim como menor densidade óptica de Bcl-2 no AHA induzido pela *E. dispar* ($p=0,0217$), indicando aumento da intensidade de marcação imuno-histoquímica e maior expressão da proteína (Figura 7F-G). Em conjunto, estes dados mostraram que a maior expressão de Bcl-2 parece ter contribuído para os menores níveis de apoptose no AHA do grupo ED.

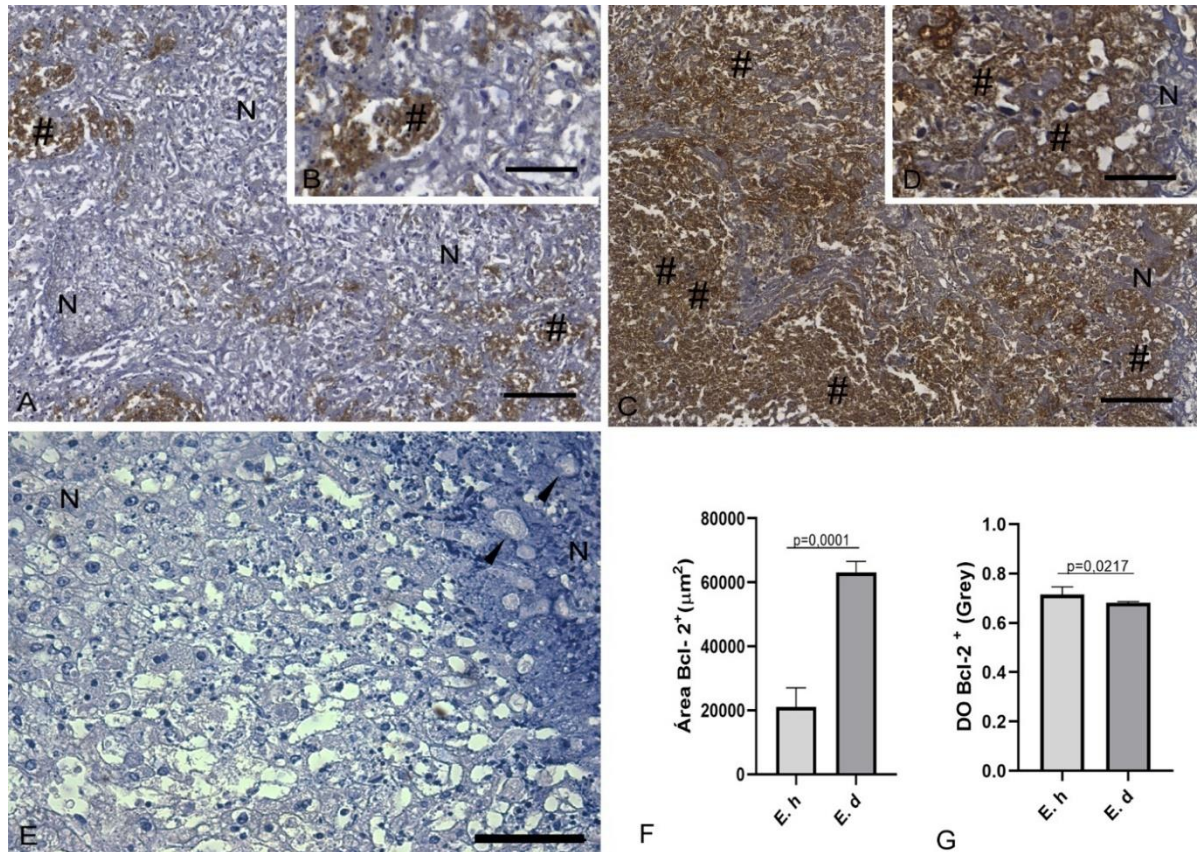


Figura 7. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; imuno-histoquímica Bcl2. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Reduzidas áreas Bcl-2⁺ em comparação com o grupo ED (#). Barra = 50 μm ; (B) Detalhe da figura anterior mostrando áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 20 μm ; (C) Extensas áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 50 μm ; (D) Detalhe da figura anterior mostrando áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 20 μm ; (E) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Bcl-2. Notar a ausência de marcações positivas. Trofozoítos negativos (cabeças de setas). Necrose (N). Contracoloração por Hematoxilina. (F) Área Bcl-2⁺ (μm^2), $p = 0,0001$, teste T de Student não-pareado; (G) Densidade óptica (DO) das áreas Bcl-2⁺ (Grey), $p = (p=0,0217)$, teste *t* de Student não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média \pm S.E.M, $n = 8$.

5.4 Análise semiquantitativa dos trofozoítos Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ nos AHA's induzidos por *Entamoeba. histolytica* e *Entamoeba dispar*

Em todas as amostras analisadas foi possível observar a presença de trofozoítos Caspase 3⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ na borda do AHA, na zona central de necrose e nos capilares sinusóides do parênquima hepático não necrosado.

Conforme mencionado na metodologia, para a análise semiquantitativa foram criadas três categorias de parasitismo na borda do AHA, na qual a presença do parasita era definida como discreta, moderada e intensa.

Tanto os trofozoítos caspase 3 clivada⁺ ($p = 0,0256$) quanto aqueles Bax⁺ ($p = 0,0150$) relacionados ao desenvolvimento de apoptose, foram encontrados em maior quantidade na

borda do AHA do grupo ED, tendo sido classificados como parasitismo moderado (Figura 8 A-F). Já em relação aos trofozoítos Bcl-2⁺, que estão menos propensos a sofrer apoptose, foram observados em maior quantidade na borda do AHA do grupo EH (p= 0,0130), sendo categorizados como causadores de um parasitismo intenso (Figura 8 G-I). Analisando estes dados em conjunto, podemos afirmar que os trofozoítos da cepa ACFN de *E. dispar* mostraram-se menos resistentes a sofrer apoptose do que aqueles da cepa EGG de *E. histolytica* e, que estes últimos foram capazes de manter maiores níveis de sobrevivência.

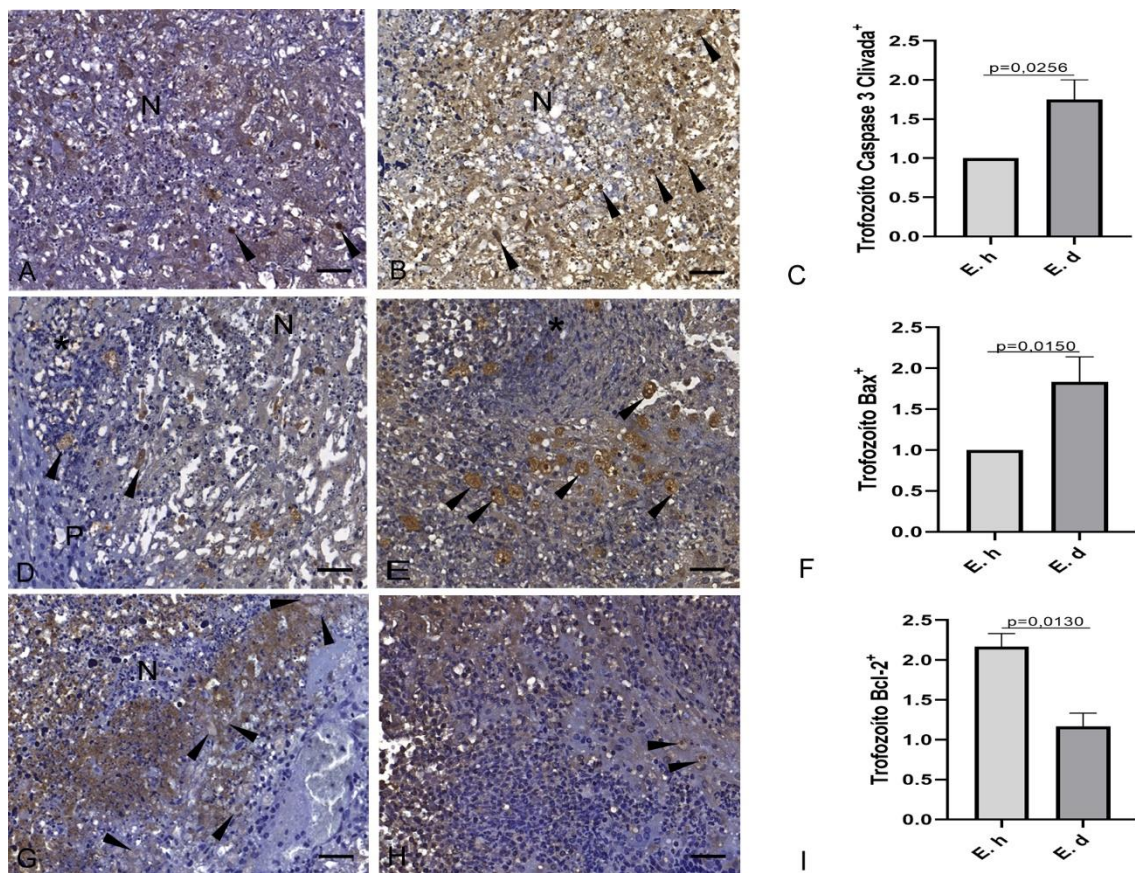


Figura 8. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; trofozoítos caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺. (A) Escassos trofozoítos caspase 3 clivada⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo EH; (B) Grande quantidade de trofozoítos caspase 3 clivada⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo ED; (C) Análise semiquantitativa dos trofozoítos caspase 3 clivada⁺; (D) Pequeno número de trofozoítos Bax⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo EH; (E) Grande número de trofozoítos Bax⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo ED; (F) Análise semiquantitativa dos trofozoítos Bax⁺; (G) Grande quantidade de trofozoítos Bcl-2⁺ no AHA do grupo EH; (H) Escassos trofozoítos Bcl-2⁺ no AHA do grupo ED; (I) Análise semiquantitativa dos trofozoítos Bcl-2⁺. Debris celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Contracoloração por Hematoxilina. Barra = 20 µm. Teste Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

O AHA é a forma extraintestinal mais comum de manifestação da amebíase e está associado com altas taxas de morbidade e mortalidade. Levantamento realizado entre 2011 e 2015 confirmou que o AHA continua sendo uma importante complicação da amebíase em alguns países asiáticos, africanos e latinos, particularmente em populações pobres, analfabetas e com elevado índice de alcoolismo (MARTÍNEZ-PALOMO *et al.*, 2017). Diante disso, torna-se necessária a realização de estudos para melhor compreensão de seus mecanismos de desenvolvimento e evolução. A totalidade dos autores sempre considerou que a necrose liquefativa experimental produzida na infecção amebiana era a principal responsável pela destruição do parênquima hepático (TSUTSUMI *et al.*, 1984). Contudo, pela primeira vez, este estudo demonstrou elevados níveis de apoptose no AHA induzido por *E. histolytica*, mediante detecção de elevada expressão de caspase 3 clivada e Bax, maiores do que o observado no AHA produzido por *E. dispar*. Além disso, também demonstramos que ambas as espécies expressaram caspase 3 clivada, Bax e Bcl-2 e que, *E. dispar* foi mais susceptível de sofrer apoptose do que *E. histolytica*, mediante maior expressão de caspase 3 clivada e Bax e, menor expressão de Bcl-2. Tais dados em conjunto demonstraram a menor capacidade da *E. dispar* em sobreviver no AHA. Este trabalho preenche uma importante lacuna na pesquisa em amebíase, que é a grande escassez de estudos a respeito da apoptose no AHA.

A utilização experimental de modelos animais “*in vivo*” contribuiu significativamente para o conhecimento da amebíase. Embora não exista um modelo animal que contemple todo o ciclo da doença, o uso de diferentes técnicas e de animais de laboratório tem proporcionado uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) e gerbils (*Meriones unguiculatus*) são animais suscetíveis para o desenvolvimento da amebíase, sendo que o hamster foi o modelo que mais têm reproduzindo satisfatoriamente o AHA (TSUTSUMI E SHIBAYAMA, 2006). Nosso grupo de pesquisa tem reproduzido o AHA experimental, tanto por *E. histolytica* quanto por *E. dispar*, de forma semelhante ao observado na doença humana (GOMES *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010a; COSTA *et al.*, 2010b; COSTA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2021).

Estudos de cinética da amebíase no AHA, tanto os induzidos por *E. histolytica* (TSUTSUMI *et al.*, 1984), quanto por *E. dispar* (COSTA *et al.*, 2010a), demonstraram que na fase inicial da infecção, são encontrados trofozoítos nos espaços porta, capilares sinusóides e veias centrais. A invasão do parênquima hepático pelos trofozoítos desenvolve-se mediante a liberação de seus produtos tóxicos, ocorrendo a ativação da resposta inflamatória e

recrutamento principalmente de neutrófilos e macrófagos. Há então a formação de microabscessos ricos em neutrófilos, que envolvem os trofozoítos na tentativa de eliminá-los. Contudo, os trofozoítos resistentes à resposta imune se dividem e os focos inflamatórios vão aumentando, coalescendo e levando a formação do AHA (COSTA *et al.*, 2010a; SANTI-ROCCA, 2009; RIGOTHIER *et al.*, 2002). O AHA é caracterizado por extensas áreas de hepatócitos mortos que formam cavidades circunscritas por debris celulares, células inflamatórias e trofozoítos, principalmente presentes nas bordas e no centro do AHA (SEYDEL e STANLEY, 1998). O aumento do AHA parece ser devido especialmente pelos produtos secretados pelos trofozoítos e, em menor grau, pelas células do sistema imune do hospedeiro (COSTA *et al.*, 2010b). O AHA produzido pela cepa ACFN de *E. dispar* foi semelhante ao produzido pela cepa EGG de *E. histolytica*, confirmando o seu potencial patogênico e corroborando com os dados de Costa e colaboradores (2007) e Silva e colaboradores (2021).

O estabelecimento da infecção amebiana depende da capacidade dos trofozoítos em destruir os tecidos do hospedeiro e de fagocitar suas células e restos celulares (HUSTON *et al.*, 2003). Para isso, o parasito se utiliza de seus fatores de virulência, capazes de lisar células hospedeiras, destruir proteínas da matriz extracelular, moléculas imunes e também de induzir apoptose (HAQUE *et al.*, 2003; HUSTON, 2004).

Em nosso estudo foi possível observar a fragmentação do DNA pelo ensaio de TUNEL, através da visualização de células marcadas em tons de marrom e com características morfológicas de apoptose, especialmente na borda do AHA e em sua zona central, demonstrando que a infecção pelas cepas EGG de *E. histolytica* e ACFN de *E. dispar* foram capazes de induzir apoptose em hepatócitos e células inflamatórias no fígado de hamster, corroborando dados do estudo que utilizou a cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* (SEYDEL & STANLEY, 1998). Evidências obtidas por outros autores também demonstraram que a apoptose também pode contribuir para o dano tecidual. Inibidores de adesão dos trofozoítos como a D-galactose reduziram significativamente os índices de apoptose no epitélio intestinal de camundongos inoculados com *E. histolytica*, mediante ação da lectina GAL/GALNAc que promoveu ativação da caspase 3, independente de caspases 8 e 9 (HUSTON *et al.*, 2000).

O ensaio de TUNEL é usado para detectar a fragmentação de DNA associada à morte celular (terminais 3'-OH do DNA) por endonucleases. A molécula de DNA é a única que pode ser reparada, contudo, não pode ser ressintetizada após o dano. A fragmentação ou a destruição do DNA é um dos estágios finais nas várias etapas do processo de morte celular e marcador preciso deste tipo de lesão irreversível (HENGARTNER, 2001; BASNAKIAN *et al.*, 2017; MOORE *et al.*, 2021). Além do ensaio de TUNEL, a fragmentação do DNA associada à morte

celular pode ser detectada por outras técnicas, tais como *DNA ladder assay* e *Comet assay* (MAJTNEROVA; ROUSAR, 2018; MOORE et al, 2021).

A apoptose é mediada por uma família de proteases de cisteína (Caspases) que desempenham papel na iniciação, regulação e execução dos eventos proteolíticos que ocorrem durante a apoptose. A ativação de caspases é um dos indicadores mais específicos do processo apoptótico (DUAN *et al*, 2003). Nesse contexto, após a confirmação da presença de apoptose nos dois grupos de hamsters pelo TUNEL, investigamos a expressão de caspase 3 clivada, enzima esta utilizada como marcador de ativação da apoptose.

A reação imuno-histoquímica para caspase-3 clivada, bem como para os outros marcadores utilizados neste estudo, funcionou perfeitamente nos cortes histológicos de todas as amostras, que foram fixadas em formalina tamponada, embebidas e emblocadas em parafina e, que estavam arquivadas há muitos anos. Tais achados corroboram com o estudo de DUAN e colaboradores (2003), sobre a detecção de apoptose em cortes histológicos por meio da imunohistoquímica de caspase-3 clivada.

Observamos marcação caspase 3 clivada⁺, tanto no grupo EH quanto no ED, em hepatócitos e células inflamatórias, com alterações morfológicas indicativas de apoptose, bem como em células de aspecto morfológico normal. Tal observação pode representar uma população de células nos estágios iniciais de apoptose. A análise morfométrica comprovou maior área caspase 3 clivada⁺ no grupo EH. Diante da presença de maiores áreas de reação positiva no grupo EH em comparação ao grupo ED, podemos concluir que a *E. Histolytica* produziu maiores níveis de apoptose do que a *E. dispar* no AHA experimental.

Estudos demonstraram que *E. histolytica* causa apoptose independente da via Fas/FasL (SEYDEL; STANLEY, 1998). Esse protozoário destrói as células-alvo em um processo sequencial de adesão à célula-alvo através da lectina de superfície Gal/GALNAc, influxo de cálcio, desfosforilação da tirosina e, conseqüentemente, ativação da caspase 3 (RALSTON & PETRI, 2011). Na seqüência, ocorre liberação de outros fatores de virulência, tais como amebaporos e cisteína-proteinases, induzindo a morte da célula hospedeira e sua fagocitose. De fato, estudo “*in vivo*” demonstrou que o bloqueio de caspases foi capaz de reduzir o tamanho do AHA em camundongos (YAN; STANLEY, 2001).

A família Bcl-2 compreende os agentes mediadores de apoptose que, embora seus membros compartilhem estruturas homólogas, suas funções biológicas se diferenciam em promotoras de apoptose (Bax, Bak, dentre outras) ou inibidoras de apoptose (Bcl-2, Bcl-xl, dentre outras) (GUO *et al*, 2012). Apesar de nossa análise não ter mostrado diferença nas áreas de marcação para a proteína pró apoptótica Bax entre o grupo EH e o ED, foi verificada redução

da DO Bax⁺ no AHA induzido pela *E. Histolytica*. Tal redução mostra ter ocorrido aumento da expressão de Bax em uma mesma área de marcação imuno-histoquímica, conforme metodologia padronizada previamente (COSTA *et al.*, 2010b). De fato, conforme padronizamos neste estudo de Costa e colaboradores, menores níveis de DO implicam em maior ligação de anticorpos e, conseqüentemente, marcações imuno-histoquímicas mais intensas. Tais resultados sugerem a participação desta proteína nos maiores níveis de apoptose no AHA induzido pela *E. histolytica* em comparação ao observado na infecção por *E. dispar*. Estes resultados são corroborados pelas observações de outros autores onde *E. histolytica* foi capaz de produzir maior quantidade e tipos de fatores de virulência do que a *E. dispar*, sendo, portanto, melhor equipada para gerar mais lesões, inclusive a apoptose (NICKEL *et al.*, 1999; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

Quanto à expressão de Bcl-2, verificamos maiores áreas de marcação Bcl-2⁺ e de DO Bcl-2⁺ no AHA do grupo ED quando comparado com o grupo EH. Este dado corrobora o que foi verificado em relação à expressão de caspase 3 clivada, que foi menor. Por ter sofrido menores níveis de apoptose, era esperado que o AHA deste grupo apresentasse maiores níveis de alguma proteína antiapoptótica, conforme observamos em relação à Bcl-2. No entanto, mesmo apresentando maior expressão Bcl-2⁺ do que o grupo EH, vale ressaltar que no AHA produzido pela *E. dispar*, a infecção também foi capaz de induzir apoptose, mesmo que em menores níveis que no grupo EH. Estes resultados são corroborados por um estudo “*in vitro*” onde células mieloides murinas foram induzidas a sofrerem aumento da expressão de Bcl-2. Tal aumento não foi capaz de proteger as células de sofrerem a apoptose por *E. histolytica*, sendo sugerido pelos autores, que a morte celular pode ter sido devida a ação de moléculas semelhantes à granzima, uma vez que essa espécie de ameba pode transportar enzimas para ativar diretamente o mecanismo de morte celular, contornando os controles celulares via Bcl-2 (RAGLAND *et al.*, 1994).

Os fatores de virulência que poderiam contribuir na execução de uma via independente de Bcl-2, seriam as amebaporos, que estão presentes nas duas espécies (NICKEL *et al.*, 1999). Ambas as espécies possuem uma classe de vesículas intracelulares ácidas que possivelmente desempenham papel na citotoxicidade, por meio de um mecanismo análogo ao dos CTLs (linfócitos T citotóxicos), que utilizam proteínas formadoras de poros (perforinas) e proteases (granzimas) (RALSTON; PETRI, 2011). A *E. dispar* apresenta 95% de homologia de suas amebaporos quando comparada à *E. histolytica*, mas em menor concentração. Apesar disso, estudos “*in vitro*” mostraram que a *E. dispar* utiliza amebaporos para destruir bactérias fagocitadas (LEIPPE, 1997).

Além de alguns produtos de secreção amebianos serem pró-apoptóticos, é possível também que o processo inflamatório possa ter contribuído para o desenvolvimento de apoptose no AHA. Por outro lado, a escassez de células inflamatórias em relação ao elevado tamanho do AHA, aponta para um provável maior envolvimento dos fatores de virulência amebianos como responsáveis pela indução desta apoptose. Nesse sentido, ainda precisam ser realizados mais estudos para se compreender quais são os responsáveis pela indução de apoptose, tanto nas células do hospedeiro quanto nos trofozoítos.

Apesar dos trofozoítos apresentarem alguns mecanismos de evasão do sistema imune, os mesmos podem ser destruídos, por exemplo, por neutrófilos, macrófagos, anticorpos e o sistema complemento. Estudo “*in vivo*” demonstrou que a produção de óxido nítrico pelas células fagocitárias pode estar envolvida na morte celular programada dos trofozoítos de *E. histolytica* (VILLALBA-MAGDALENO *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou a apoptose de trofozoítos expostos a H₂O₂, independente de caspase, com aumento do Ca²⁺ citosólico e expressão de fosfatidilserina no folheto exterior da membrana citoplasmática, com características morfológicas de morte por apoptose (NANDI *et al.*, 2010). Pelo contrário, nosso estudo mostrou a presença de marcação caspase 3 clivada⁺ em vários trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica*, muitos com anoiquia e picnose, demonstrando que a apoptose foi caspase 3 clivada dependente. Esse achado foi corroborado pela observação da maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax e, menor da antiapoptótica Bcl-2 no grupo ED, demonstrando a menor capacidade desta espécie em sobreviver no AHA. O fato de Nandi e colaboradores (2010) não terem observado ativação de caspases em seu estudo talvez fosse devido às condições experimentais “*in vitro*” serem bem diferentes ao que é observado em um estudo “*in vivo*”, como foi o realizado por nós.

Outros mecanismos têm sido pesquisados e propostos para explicar a ocorrência de apoptose em *E. histolytica*. Monroy e colaboradores (2010) demonstraram, em um estudo “*in vitro*” sobre a expressão gênica de sinais pró-apoptóticos e antiapoptóticos, que o gene do tipo saposina apresentou uma elevada expressão no início da apoptose. Esse gene expressa uma proteína de características semelhantes à proteína saposina C humana (WINKELMANN *et al.*, 2006). Essa proteína apresenta várias atribuições, dentre elas, a de ativar quinases e fosfatases (KONG *et al.*, 2005), Catepsina D e caspase-3 em células tumorais (De STEFANIS *et al.*, 2002). Em contrapartida, foi observado que as graninas, proteínas do parasito com semelhança estrutural às proteínas de ligação ao cálcio, podem apresentar uma atividade antiapoptótica (NICKEL, 2000). Tal hipótese foi formulada após a verificação de que houve sua superexpressão, demonstrando uma provável atividade compensatória, onde os trofozoítos

ativaram mecanismos moleculares para tentar recapturar o cálcio Ca^{2+} intracelular livre e impedir a apoptose. No entanto, maiores estudos são necessários para avaliar a participação destas proteínas na apoptose, tanto na *E. histolytica*, quanto na *E. dispar*.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou pela primeira vez que a apoptose também está presente, e de forma significativa, no AHA induzido experimentalmente pela *E. dispar*. Também, a expressão significativa de caspase 3 clivada no AHA sugeriu o envolvimento da via intrínseca da apoptose e, a expressão de Bax e Bcl-2 demonstrou a importância destas duas proteínas na modulação da apoptose. A infecção pela *E. histolytica* foi capaz de induzir mais apoptose no AHA do que pela *E. dispar*, enquanto esta espécie foi menos eficaz em resistir a indução de apoptose. Bax e Bcl2 também modularam a apoptose e a sobrevivência dos trofozoítos de ambas as espécies.

REFERÊNCIAS

Aguirre-García MM, Anaya-Ruiz M, Talamás-Rohana P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology*. 2003 Mar;126(Pt 3):195-202. doi: 10.1017/s0031182002002767. PMID: 12666878.

Basnakian, A.G.; Braman, N.; Yin, X.; Kolomeychuk, S.; Apostolov, E.O. Toxicological Analysis Using DNA Fragmentation. In *Encyclopedia of Analyt Chem*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley: Chichester, UK, 2017; pp. 1–2. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9629>

Becker, Stephen M. *et al.* Epithelial cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut. *American Journal of Pathology*, v. 176, n. 3, p. 1316–1322, 2010. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2010.090740>>.

Benetton ML, *et al.* Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/E. dispar complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2005 Jul;99(7):532-40. doi: 10.1016/j.trstmh.2004.11.015. PMID: 15869773.

Bienvenu AL, Gonzalez-Rey E, Picot S. Apoptosis induced by parasitic diseases. *Parasit Vectors*. 2010 Nov 17;3:106. doi: 10.1186/1756-3305-3-106. PMID: 21083888; PMCID: PMC2995786.

Bohlsón SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol*. 2007 Jan;44(1-3):33-43. doi: 10.1016/j.molimm.2006.06.021. Epub 2006 Aug 14. PMID: 16908067.

Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol Microbiol*. 1999 Nov;34(3):463-72. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01607.x. PMID: 10564488.

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA Jr. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest*. 1992 Sep;90(3):1131-7. doi: 10.1172/JCI115931. PMID: 1381719; PMCID: PMC329975.

Brandt H, Tamayo RP. Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol*. 1970 Sep;1(3):351-85. doi: 10.1016/s0046-8177(70)80072-7. PMID: 4330002.

Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol*. 1996 Oct;22(2):255-63. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.00111.x. PMID: 8930910.

Caliari, M.V.; *Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes*. Ed. UFMG. p149, 1997.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Página revista em: 29 de outubro de 2019 . <https://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/index.html> . Acesso em 06/07/2020

Chaves, A. C. P; Seixas Filho, J.T; Dantas, M.M.L. Revisão do mecanismo fisiopatológico da amebíase. 2010. Revista Augustus | Rio de Janeiro | Vol. 14 | N. 29 | Fevereiro de 2010 | Semestral. http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/2011/ciencias/09revisao_mecanismo_fisiopatologico_amebiase.pdf

Clark CG, Diamond LS. Ribosomal RNA genes of 'pathogenic' and 'nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. *Mol Biochem Parasitol*. 1991 Dec;49(2):297-302. doi: 10.1016/0166-6851(91)90073-f. PMID: 1685555.

Clark CG. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998 Jul-Aug;92(4):361-4. doi: 10.1016/s0035-9203(98)91049-5. PMID: 9850382.

Clark CG, Diamond LS. *Entamoeba histolytica*: a method for isolate identification. *Exp Parasitol*. 1993 Dec;77(4):450-5. doi: 10.1006/expr.1993.1105. PMID: 8253158.

Cornick S, Chadee K. *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. *Tissue Barriers*. 2017 Jan 2;5(1):e1283386. doi: 10.1080/21688370.2017.1283386. PMID: 28452682; PMCID: PMC5362996.

Costa AO, Viana JC, Assis D, Rocha OA, Silva EF. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch Med Res*. 2000 Jul-Aug;31(4 Suppl):S247-8. doi: 10.1016/s0188-4409(00)00214-9. PMID: 11070302.

Costa CAX, Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*. 2007 Dec;14(4):329-34. doi: 10.1051/parasite/2007144329. PMID: 18225422.

Costa CAX, De Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem*. 2010a Aug26;54(3):e39. doi: 10.4081/ejh.2010.e39. PMID: 20819776; PMCID: PMC3167314.

Costa CAX, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliarí MV. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. *Parasit Vectors*. 2010b Mar26;3(1):23. doi: 10.1186/1756-3305-3-23. PMID: 20338063; PMCID: PMC2861030.

Costa CAX, Fonseca TH, Oliveira FM, Santos JF, Gomes MA, Caliarí MV. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: an immunohistochemical and morphometric study. *Parasit Vectors*. 2011 Feb 28;4:27. doi: 10.1186/1756-3305-4-27. PMID: 21356065; PMCID: PMC3058109.

De Stefanis D, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, Sala G, Ghidoni R, Codogno P, Isidoro C. Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of

apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biol Chem.* 2002 Jun;383(6):989-99. doi: 10.1515/BC.2002.106. PMID: 12222689.

Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *J Eukaryot Microbiol.* 1993 May-Jun;40(3):340-4. doi: 10.1111/j.1550-7408.1993.tb04926.x. PMID: 8508172.

Dourado A, Maciel A, Aca Ida S. Ocorrência de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE [Occurrence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in ambulatory patients of Recife, PE]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Jul-Aug;39(4):388-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822006000400015. PMID: 17119758.

Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, Leo BM, Schroeder JW, Mann BJ. Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology International*,46: 225-235 , 1997.
[https://doi.org/10.1016/S1383-5769\(97\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5769(97)00032-9)

Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb;199(2):221-8. <https://doi.org/10.1002/path.1289>. PMID: 12533835.

Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Petri WA Jr. Influence of human leukocyte antigen class II alleles on susceptibility to *Entamoeba histolytica* infection in Bangladeshi children. *J Infect Dis.* 2004 Feb 1;189(3):520-6. doi: 10.1086/381272. Epub 2004 Jan 20. PMID: 14745711.

Eichinger D. A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. *J Eukaryot Microbiol.* 2001 Jan-Feb;48(1):17-21. doi: 10.1111/j.1550-7408.2001.tb00411.x. PMID: 11249188.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.

Espinosa-Cantellano M, Gonzáles-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, Martínez-Palomo A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol.* 1998 May-Jun;45(3):265-72. doi: 10.1111/j.1550-7408.1998.tb04535.x. PMID: 9669863.

Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):318-31. doi: 10.1128/CMR.13.2.318. PMID: 10756002; PMCID: PMC100155.

Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J.* 2004 Dec 1;384(Pt 2):201-32. doi: 10.1042/BJ20041142. PMID: 15450003; PMCID: PMC1134104.

Garcia, Lynne Shore. Diagnostic medical parasitology. ASM Press American Society for Microbiology. Washington, DC.5ªed, Cap 2, pag 6-27, 2007. Disponível em: https://www.academia.edu/6428060/Diagnostic_Medical_Parasitology. Acesso: 25/08/2020

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):493-501. doi: 10.1083/jcb.119.3.493. PMID: 1400587; PMCID: PMC2289665.

Gomes, Maria A. *et al.* Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical, and molecular parameters. *Archives of Medical Research*, 2000.

Graffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, Romano L, Masucci L. *Entamoeba dispar*: A rare case of enteritis in a patient living in a non endemic area. *Case Rep Gastrointest Med.* 2014;2014:498058. [PMCID: PMC3965946] [PubMed: 24851190]

Guo XZ, Shao XD, Liu MP, Xu JH, Ren LN, Zhao JJ, Li HY, Wang D. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2002 Dec;8(6):1059-62. doi: 10.3748/wjg.v8.i6.1059. PMID: 12439925; PMCID: PMC4656380.

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003 Apr 17;348(16):1565-73. doi: 10.1056/NEJMra022710. PMID: 12700377.

Hengartner MO. Apoptosis. DNA destroyers. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):27, 29. doi: 10.1038/35083663. PMID: 11452284.

Hogquist KA, Nett MA, Unanue ER, Chaplin DD. Interleukin 1 is processed and released during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 1;88(19):8485-9. doi: 10.1073/pnas.88.19.8485. PMID: 1924307; PMCID: PMC52533.

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA Jr. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 2000 Dec;2(6):617-25. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00085.x. PMID: 11207613.

Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):964-72. doi: 10.1128/IAI.71.2.964-972.2003. PMID: 12540579; PMCID: PMC145391.

Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol.* 2004 Jan;20(1):23-6. doi: 10.1016/j.pt.2003.10.013. PMID: 14700586.

Jackson TF. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol.* 1998 Jan;28(1):181-6. doi: 10.1016/s0020-7519(97)00177-x. PMID: 9504344.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):347-54. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81873-5. PMID: 9039261.

Kaur U, Sharma AK, Sharma M, Vohra H. Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin-specific antibody response in an endemic area. *Scand J Immunol.* 2004 Nov;60(5):524-8. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01512.x. PMID: 15541046.

Keene WE, Petitt MG, Allen S, McKerrow JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*. 1986 Mar 1;163(3):536-49. doi: 10.1084/jem.163.3.536. PMID: 2869098; PMCID: PMC2188059.

Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2005 Oct;278(1-2):39-51. doi: 10.1007/s11010-005-1979-6. PMID: 16180087.

Leippe M, Andrä J, Nickel R, Tannich E, Müller-Eberhard HJ. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore formation in bacterial cytoplasmic membranes. *Mol Microbiol*. 1994 Dec;14(5):895-904. doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01325.x. PMID: 7715451.

Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today*. 1997 May;13(5):178-83. doi: 10.1016/s0169-4758(97)01038-7. PMID: 15275088.

Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun*. 2006 Jan;74(1):118-24. doi: 10.1128/IAI.74.1.118-124.2006. PMID: 16368964; PMCID: PMC1346632.

Martinez, Michelle M.; REIF, Randall D.; PAPPAS, Dimitri. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Anal. Methods*, 2010,2, 996-1004. <https://doi.org/10.1039/C0AY00247J>

Martínez-Palomo A, González-Robles A, Chávez B, Orozco E, Fernández-Castelo S, Cervantes A. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool*. 1985 Feb;32(1):166-75. doi: 10.1111/j.1550-7408.1985.tb03033.x. PMID: 2859368.

Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M, Tsutsumi, G.R.; Tsutsumi, V. Chapter 13 - Amebic Liver Abscess, *Liver Pathophysiology*, Academic Press, 2017, Pages 181-186, ISBN 9780128042748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00013-8>.

Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*. 2018 Oct;45(5):1469-1478. doi: 10.1007/s11033-018-4258-9. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30022463.

McCoy JJ, Mann BJ, Petri WA Jr. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infect Immun*. 1994 Aug;62(8):3045-50. doi: 10.1128/iai.62.8.3045-3050.1994. Erratum in: *Infect Immun* 1994 Dec;62(12):5707. PMID: 8039871; PMCID: PMC302925.

Moncada D, Keller K, Chadee K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect Immun*. 2003 Feb;71(2):838-44. doi: 10.1128/IAI.71.2.838-844.2003. PMID: 12540564; PMCID: PMC145371.

Monroy VS, Flores MO, Villalba-Magdaleno JD, Garcia CG, Ishiwara DG. *Entamoeba histolytica*: differential gene expression during programmed cell death and identification of

early pro- and anti-apoptotic signals. *Exp Parasitol.* 2010 Dec;126(4):497-505. doi: 10.1016/j.exppara.2010.05.027. Epub 2010 May 31. PMID: 20515683.

Monroy VS, Flores OM, García CG, Maya YC, Fernández TD, Pérez Ishiwara DG. Calpain-like: A Ca(2+) dependent cystein protease in *Entamoeba histolytica* cell death. *Exp Parasitol.* 2015 Dec;159:245-51. doi: 10.1016/j.exppara.2015.10.005. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26496790.

Moody S, Becker S, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology.* 1997 Feb;114 (Pt 2):95-104. doi: 10.1017/s0031182096008396. PMID: 9051918.

Moore, C.L.; Savenka, A.V.; Basnakian, A.G. TUNEL Assay: A Powerful Tool for Kidney Injury Evaluation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22,412. <https://doi.org/10.3390/ijms22010412>

Mortimer L, Chadee K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 2010 Nov;126(3):366-80. doi: 10.1016/j.exppara.2010.03.005. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20303955.

Nakada-Tsukui K, Nozaki T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. *Front Immunol.* 2016 May 12;7:175. doi: 10.3389/fimmu.2016.00175. PMID: 27242782; PMCID: PMC4863898.

Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, Das P. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology (Reading).* 2010 Jul;156(Pt 7):1926-1941. doi: 10.1099/mic.0.034066-0. Epub 2010 Mar 18. PMID: 20299403.

Nickel R, Ott C, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem.* 1999 Nov;265(3):1002-7. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00807.x. PMID: 10518795.

Nickel R, Jacobs T, Urban B, Scholze H, Bruhn H, Leippe M. Two novel calcium-binding proteins from cytoplasmic granules of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 2000 Dec 8;486(2):112-6. doi: 10.1016/s0014-5793(00)02245-6. PMID: 11113449.

Oliveira-Costa, J. et al. Prevalência de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais de um laboratório privado na Grande Belo Horizonte. *Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2006.*

Oliveira FM, Horta BC, Prata LO, Santiago AF, Alves AC, Faria AM, Gomes MA, Caliarí MV. Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Infect Dis Rep.* 2012 Apr 27;4(2):e27. doi: 10.4081/idr.2012.e27. PMID: 24470941; PMCID: PMC3892629.

Oliveira FM, Neumann E, Gomes MA, Caliarí MV. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol.* 2015 Jan-Jun;5(1):9-14. doi: 10.4103/2229-5070.149887. PMID: 25709947; PMCID: PMC4327003.

Oliveira FM, Cláudia de Carvalho Fernandes A, Henrique de Cicco Sandes S, Prata LO, Junior MA, Vilela da Silva CA, Campolina-Silva GH, Lorenzo de Jesus Oliveira M, Oliveira CA, Neumann E, Nunes AC, Gomes MA, Caliaro MV. Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis and the expression of amoebic virulence factors. *Microb Pathog.* 2021 Sep;158:105010. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105010. Epub 2021 Jun 12. PMID: 34126224.

Pacheco J, Shibayama M, Campos R, Beck DL, Houpt E, Petri WA Jr, Tsutsumi V. In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol Int.* 2004 Mar;53(1):35-47. doi: 10.1016/j.parint.2003.10.005. PMID: 14984834.

Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4807-4818. doi: 10.3390/ijms13044807. Epub 2012 Apr 16. PMID: 22606010; PMCID: PMC3344246.

Prathap K, Gilman R. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. *Am J Pathol.* 1970 Aug;60(2):229-46. PMID: 5457212; PMCID: PMC2032904.

Que X, Reed SL. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):196-206. doi: 10.1128/CMR.13.2.196. PMID: 10755997; PMCID: PMC100150.

Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp Parasitol.* 1994 Nov;79(3):460-7. doi: 10.1006/expr.1994.1107. PMID: 7957763.

Ramos E, Olivos-García A, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A, Montfort I, Pérez Tamayo R. *Entamoeba histolytica*: apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Exp Parasitol.* 2007 Jul;116(3):257-65. doi: 10.1016/j.exppara.2007.01.011. Epub 2007 Jan 26. PMID: 17336295.

Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med.* 1980 Aug 1;152(2):377-90. doi: 10.1084/jem.152.2.377. PMID: 6249882; PMCID: PMC2185944.

Ralston KS, Petri WA. The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays Biochem.* 2011;51:193-210. doi: 10.1042/bse0510193. PMID: 22023450.

Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):266-74. PMID: 7602103.

Rigothier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillén N. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun.* 2002 Jun;70(6):3208-15. doi: 10.1128/IAI.70.6.3208-3215.2002. PMID: 12011016; PMCID: PMC128000.

Santi-Rocca J, Rigotherier MC, Guillén N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):65-75, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00029-08. PMID: 19136434; PMCID: PMC2620641.

Santos, Fred Luciano Neves e Soares, Neci Matos Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2008, v. 44, n. 4 pp. 249-261. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000400004>.

Sato D, Nakada-Tsukui K, Okada M, Nozaki T. Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2, localized in distinct compartments, negatively regulate secretion in *Entamoeba histolytica*. *FEBS Lett.* 2006 Oct 2;580(22):5306-12. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.081. Epub 2006 Sep 12. PMID: 16979632.

Sargeant PG. '*Entamoeba histolytica*' is a complex of two species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992 May-Jun;86(3):348. doi: 10.1016/0035-9203(92)90341-9. PMID: 1412672.

Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull.* 1997;53(3):491-508. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a011626. PMID: 9374033.

Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2980-3. doi: 10.1128/IAI.66.6.2980-2983.1998. PMID: 9596776; PMCID: PMC108298.

Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun.* 1997 May;65(5):1631-9. doi: 10.1128/iai.65.5.1631-1639.1997. PMID: 9125540; PMCID: PMC175187.

Silva, E.F.; Gomes, M.A. Amebíase: *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar*. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu, São Paulo, 11^a ed., cap.15, p.127-138, 2005.

Silva CAV, de Oliveira IMC, Cruz RE, Silva Prado GK, Santos FV, Neves NCV, Gomes MA, Silva Oliveira FM, Caliarí MV. South American *Entamoeba dispar* strains produce amoebic liver abscesses with different pathogenicities and evolutionary kinetics. *Acta Trop.* 2021 Dec;224:106114. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106114. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34450059.

Singh A, Banerjee T, Kumar R, Shukla SK. Prevalence of cases of amebic liver abscess in a tertiary care centre in India: A study on risk factors, associated microflora and strain variation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS One.* 2019 Apr 3;14(4):e0214880. doi: 10.1371/journal.pone.0214880. Erratum in: *PLoS One.* 2019 Apr 17;14(4):e0215774. PMID: 30943253; PMCID: PMC6447230.

Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Mar;20(3):175-193. doi: 10.1038/s41580-018-0089-8. PMID: 30655609; PMCID: PMC7325303.

Souza, Camylla Santos De *et al.* Amebíase no contexto da emergência: análise do perfil de internações e morbimortalidade nos Estados brasileiros em 5 anos. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, v. 17, n. 85, p. 66–70, 2019. <https://www.sbcm.org.br/ojs3/index.php/rsbcm/issue/view/25>

Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet*. 2003 Mar 22;361(9362):1025-34. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9. PMID: 12660071.

Stauffer W, Ravdin JI. Entamoeba histolytica: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct;16(5):479-85. doi: 10.1097/00001432-200310000-00016. PMID: 14502002.

Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic Entamoeba histolytica. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul;86(13):5118-22. doi: 10.1073/pnas.86.13.5118. PMID: 2544890; PMCID: PMC297568.

Toscano ECB, Vieira ÉLM, Portela ACDC, Reis JLJ, Caliari MV, Giannetti AV, Gonçalves AP, Siqueira JM, Suemoto CK, Leite REP, Nitrini R, Teixeira AL, Rachid MA. Bcl-2/Bax ratio increase does not prevent apoptosis of glia and granular neurons in patients with temporal lobe epilepsy. *Neuropathology*. 2019 Oct;39(5):348-357. doi: 10.1111/neup.12592. Epub 2019 Aug 7. PMID: 31392787.

Trejos-suárez, Juanita; Castaño-Osorio, Jhon Carlos. Factores de virulencia del patógeno intestinal Entamoeba histolytica. *Infectio. Volume 13, Issue 2*, June 2009, Pages 100-110. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70731-3](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70731-3)

Tse SK, Chadee K. Biochemical characterization of rat colonic mucins secreted in response to Entamoeba histolytica. *Infect Immun*. 1992 Apr;60(4):1603-12. doi: 10.1128/iai.60.4.1603-1612.1992. PMID: 1548082; PMCID: PMC257036. VARIYAM, E.P. Luminal host-defence mechanisms against invasive amebiasis. *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 23, p. 108-111, 2006.

Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am J Pathol*. 1984 Oct;117(1):81-91. PMID: 6385728; PMCID: PMC1900566.

Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res*. 2006 Feb;37(2):210-20. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.09.011. PMID: 16380321.

Variyam EP. Luminal host-defense mechanisms against invasive amebiasis. *Trends Parasitol*. 2007 Mar;23(3):108-11. doi: 10.1016/j.pt.2007.01.006. Epub 2007 Jan 26. PMID: 17258936.

Ventura-Juárez J, Jarillo-Luna RA, Fuentes-Aguilar E, Pineda-Vázquez A, Muñoz-Fernández L, Madrid-Reyes JI, Campos-Rodríguez R. Human amoebic hepatic abscess: in situ interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol*. 2003 Oct;25(10):503-11. doi: 10.1111/j.1365-3024.2003.00662.x. PMID: 15157027.

Villalba JD, Gómez C, Medel O, Sánchez V, Carrero JC, Shibayama M, Ishiwarra DGP. Programmed cell death in Entamoeba histolytica induced by the aminoglycoside G418. *Microbiology (Reading)*. 2007 Nov;153(Pt 11):3852-3863. doi: 10.1099/mic.0.2007/008599-0. PMID: 17975094.

Villalba-Magdaleno JD, Pérez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M. In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic liver abscess. *Microbiology (Reading)*. 2011 May;157(Pt 5):1489-1499. doi: 10.1099/mic.0.047183-0. Epub 2011 Feb 24. PMID: 21349978.

Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis*. 1986 Mar-Apr;8(2):228-38. doi: 10.1093/clinids/8.2.228. PMID: 2871619.

Wells CD, Arguedas M. Amebic liver abscess. *South Med J*. 2004 Jul;97(7):673-82. doi: 10.1097/00007611-200407000-00013. PMID: 15301125.

WHO/PAHO/UNESCO, 1997. Report of a consultation of experts on amoebiasis, in: *Weekly Epidemiological Report of the World Health Organisation*. pp. 97–99.

Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 May;147(1):85-94. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.01.010. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16529828.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980 Apr 10;284(5756):555-6. doi: 10.1038/284555a0. PMID: 6245367.

Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, González E, Valadez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida O, Silva EF. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Mar;7(3):1105-20. doi: 10.3390/ijerph7031105. Epub 2010 Mar 16. PMID: 20617021; PMCID: PMC2872301.

Yan L, Stanley SL Jr. Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7911-4. doi: 10.1128/IAI.69.12.7911-7914.2001. PMID: 11705976; PMCID: PMC98890.

Zhang Z, Wang L, Seydel KB, Li E, Ankri S, Mirelman D, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amoebiasis. *Mol Microbiol*. 2000 Aug;37(3):542-8. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02037.x. PMID: 10931347.

Zlobl TL. Amebiasis. *Prim Care Update Ob Gyns*. 2001 Mar;8(2):65-68. doi: 10.1016/s1068-607x(00)00076-7. PMID: 11246030.

ANEXO A: CERTIFICADO CETEA/ CEUA 154/2005



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 154/2005**, relativo ao projeto intitulado "**Influência da Imunidade sobre as lesões amebianas produzidas pela *E. dispar* e *E. histolytica***", que tem como responsável **Marcelo Vidigal Caliari**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **15/ 03/2006**.

Este certificado expira-se em **15/ 03 / 2011**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 154/2005**, related to the project entitled "**Immunity influence of amebian lesions produced by *E. dispar* and *E. histolytica***", under the supervision of **Marcelo Vidigal Caliari**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 15, 2006**.

This certificate expires in **March 15, 2011**.

Belo Horizonte, 15 de Março de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria – Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/prpq/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B: CERTIFICADO CEUA 252/2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da virulência e da patogenicidade de cepas de Entamoeba dispar associadas com a Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) sobre o abscesso hepático amebiano: estudo in vitro, imunológico e patológico.", protocolo do CEUA: 252/2018 sob a responsabilidade de Marcelo Vidigal Caliani que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 8.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 17/09/2018.

Vigência da Autorização	17/09/2018 a 16/09/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12

Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG
*Espécie/linhagem	Hamster / Mesocricetus auratus
Nº de animais	12
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Depto de Parasitologia do ICB/UFMG

Considerações posteriores:

17/09/2018	Aprovado COM RECOMENDAÇÃO na reunião do dia 17/09/2018. Validade: 17/09/2018 à 16/09/2023 RECOMENDAÇÃO: Prezado pesquisador, o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados.
------------	--

Belo Horizonte, 20/09/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceu/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005

31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@proq.ufmg.br

ANEXO C: ARTIGO

ESTUDO DA APOPTOSE NA AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL INDUZIDA PELA *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*.

Luciana Fernandes do Prado ¹, Fabrício Marcus Oliveira ², Marcelo Vidigal Caliari ¹,
Eliana C. de Brito Toscano ³, Nubia Braga Pereira¹.

1- Laboratório de Protozooses Universidade Federal de Minas Gerais.

2- Fundação Osvaldo Cruz

3- Universidade Federal de Juiz de Fora

E-mail: **luccianafprado@gmail.com**

RESUMO

A amebíase é uma doença que atinge cerca de 12% da população mundial, sendo a *Entamoeba histolytica*, responsável por lisar e penetrar nos tecidos do hospedeiro e a *Entamoeba dispar* representante dos casos assintomáticos. Entretanto, estudos têm demonstrado a capacidade de *E. dispar* de produzir lesões em modelos experimentais. O sucesso da invasão amebiana no hospedeiro se deve a destruição tecidual pelos seus fatores de virulência, capazes de provocar necrose e apoptose. Há poucos estudos sobre a apoptose induzida por *E. dispar* e *E. histolytica*. Diante disso, foi objetivo deste trabalho avaliar a apoptose em modelo experimental de abscesso hepático amebiano (AHA) induzido por *E. dispar*, por meio do ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*) e de reações imuno-histoquímicas para os marcadores Caspase 3, Bax e Bcl-2. Em todos os AHA's induzidos por *E. dispar* (grupo ED) e *E. histolytica* (grupo EH) foram detectadas reações TUNEL⁺, em células com aspectos morfológicos indicativos de apoptose, tanto do hospedeiro quanto do parasito. Todos os AHA's apresentaram reações positivas para os três marcadores. Ao contrário do verificado no grupo EH, a análise morfométrica mostrou menor área Caspase 3 clivada⁺ e Bax⁺, bem como maior área Bcl-2⁺ no AHA do grupo ED, indicando menores níveis de apoptose induzido por esta espécie. *E. dispar* e *E. histolytica* sofreram apoptose dependente de caspase 3 e de Bax, sendo mais intensa no grupo ED, comprovando a menor capacidade desta espécie em sobreviver no AHA. Sendo assim, este estudo demonstrou pela primeira vez que a apoptose também está presente, e de forma significativa, no AHA induzido experimentalmente pela *E. dispar*. Também

originalmente, a expressão significativa de caspase 3 clivada no AHA sugeriu o envolvimento da via intrínseca da apoptose e, a expressão de Bax e Bcl-2 demonstrou a importância destas duas proteínas na modulação da apoptose em ambas espécies.

Palavras chave: Amebíase, Apoptose, Entamoeba dispar, Abscesso hepático amebiano, Caspase 3 clivada.

ABSTRACT

Amebiasis is a disease that affects about 12% of the world's population, with *Entamoeba histolytica* responsible for lysing and penetrating the host's tissues and *Entamoeba dispar* representing asymptomatic cases. However, studies have demonstrated the ability of *E. dispar* to produce lesions in experimental models. The success of amoebic invasion in the host is due to tissue destruction by its virulence factors, capable of causing necrosis and apoptosis. There are few studies on apoptosis induced by *E. dispar* and *E. histolytica*. Therefore, the objective of this study was to evaluate apoptosis in an experimental model of amoebic liver abscess (AHA) induced by *E. dispar*, using the TUNEL assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling) and immunohistochemical reactions for the Caspase 3 cleaved, Bax and Bcl-2 markers. In all AHA's induced by *E. dispar* (ED group) and *E. histolytica* (EH group) TUNEL+ reactions were detected in cells with morphological aspects indicative of apoptosis, both of the host and the parasite. All AHA's showed positive reactions for the three markers. Unlike what was seen in the EH group, the morphometric analysis showed a smaller Caspase 3⁺ cleaved and Bax⁺ area, as well as a larger Bcl2⁺ area in the AHA of the ED group, indicating lower levels of apoptosis induced by this species. *E. dispar* and *E. histolytica* underwent caspase 3 and Bax-dependent apoptosis, being more intense in the ED group, proving the lower capacity of this species to survive in the AHA. Therefore, this study demonstrated for the first time that apoptosis is also present, and significantly so, in AHA experimentally induced by *E. dispar*. Also, the significant expression of cleaved caspase 3 in AHA suggested the involvement of the intrinsic pathway of apoptosis, and the expression of Bax and Bcl-2 demonstrated the importance of these two proteins in the modulation of apoptosis in both species.

Keywords: Amoebiasis, Entamoeba dispar, Amoebic liver abscess, Apoptosis, Cleaved Caspase 3.

1. INTRODUÇÃO

A amebíase é uma doença com ampla distribuição mundial causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), sendo transmitida pelas vias fecal/oral, podendo apresentar quadros patológicos graves e eventualmente fatais (WHO, 1997; HUSTON, 2004). A maioria das infecções são assintomáticas, porém, a *E. histolytica* pode dar origem a formas clínicas importantes, tais como a amebíase intestinal representada pela colite amebiana, e a amebíase extraintestinal nos órgãos: pulmão, cérebro e fígado, sendo o abscesso hepático amebiano (AHA) a forma mais frequente. O AHA está associado a morbidade e mortalidade da amebíase, sendo caracterizado por extensas áreas de morte dos hepatócitos que às vezes formam cavidades contendo restos celulares (YAN e STANLEY, 2001; STANLEY, 2003; CDC, 2019).

A amebíase é considerada endêmica, ocorrendo em países subdesenvolvidos, na qual as condições sanitárias e o abastecimento de água são precários e ineficientes. Estima-se que as duas espécies infectem cerca de 12% da população mundial, sendo a infecção pela *E. dispar* muito mais comum e podendo a *E. histolytica* representar cerca de 1% deste universo (WHO, 1997).

O sucesso da invasão amebiana se deve à morte celular causada pelos principais produtos amebianos: Lectina ligante de galactose/N-acetilgalactosamina (GAL/GalNAc) - responsável pela adesão do trofozoíto à mucosa colônica; Cisteínas proteinases (CPs) - enzimas proteolíticas, secretadas pelos trofozoítos, que degradam diferentes componentes da matriz extracelular; Amebaporos – proteínas que formam canais iônicos ou poros nas membranas lipídicas e despolarizam as células alvo, ocasionando a lise celular por choque osmótico (HAQUE *et al.*, 2003; TREJOS-SUÁREZ; CASTAÑO-OSORIO, 2009). Além dos fatores citados, tem a fagocitose das células hospedeiras (HUSTON *et al.*, 2003); a necrose tecidual, (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000) e também a apoptose, que juntos contribuem para a destruição tecidual (HUSTON *et al.*, 2000). A apoptose, é um processo crucial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas, tais como: retração da célula, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. A ativação da apoptose envolve duas principais vias, a via extrínseca ou via do receptor de morte (caspase 8) e a via intrínseca ou mitocondrial (caspase 9). São várias moléculas envolvidas no controle das vias de ativação da apoptose, dentre elas, as proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x1), as pró-apoptóticas Bax e Bak e, finalmente as Caspases. Além das vias citadas, existe uma via adicional dependente de perforinas/granzimas (serinas proteases presentes nos grânulos) que

envolve a citotoxicidade das células T. Esta via pode induzir apoptose por meio de granzimas A (independente de caspases) ou B (dependente de caspases) (ELMORE, 2007). A morte celular por apoptose, também tem sido descrita ocorrer em parasitas, tais como *Leishmania* sp, *Trypanosoma* sp., *Giardia* sp. e *E. histolytica* (RAMOS et al., 2007).

A resposta imune mediada por células é importante para a defesa contra *E. histolytica*, e o sistema complemento contribui para o desencadeamento da resposta inflamatória e na destruição e remoção dos parasitos (BOHLSON *et al.*, 2007). Contudo os trofozoítos conseguem escapar da ação do complemento resistindo à lise (BRAGA *et al.*, 1992) através da clivagem e inativação de C3a e C5a (REED *et al.*, 1995), apesar de muitos deles também serem lisados pelo complemento (COSTA *et al.*, 2010b).

Até 1997 a *Entamoeba dispar* era considerada não patogênica, responsável apenas pelas infecções assintomáticas (WHO, 1997), porém pesquisadores reproduziram experimentalmente a colite amebiana e o AHA através de cepas de *E. dispar* isoladas no Brasil (GOMES *et al.*, 2000). Um recente estudo avaliou a patogenicidade e a cinética evolutiva de cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ para *E. dispar* e identificou-se que a cepa ACFN, é a mais patogênica, apresentando um AHA constituído por uma zona central de necrose liquefativa circundada por áreas com muitos trofozoítos, restos celulares, poucos neutrófilos e macrófagos (SILVA *et al.*, 2021).

Nesse contexto, tendo em vista que a amebíase é uma doença mundial e negligenciada, e que a indução da apoptose em células do hospedeiro é um dos mecanismos utilizados pelos trofozoítos para causar lesões intestinais e hepáticas, bem como a escassez de estudos envolvendo apoptose na colite e no AHA, tornou-se necessário realizar estudos exploratórios para aprofundar o conhecimento sobre o papel da apoptose induzida pela *E. histolytica* e *E. dispar* na infecção experimental, na tentativa de identificar e avaliar os prováveis mecanismos envolvidos, bem como verificar se estas espécies também sofrem apoptose.

O objetivo geral desse trabalho foi investigar a apoptose no AHA experimental induzido pelas *E. histolytica* e *E. dispar*, através das proteínas Caspase 3 clivada, Bax, Bcl-2 em células do AHA e, em trofozoítos presentes no AHA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

O presente trabalho foi realizado com amostras de projetos previamente aprovados e

executados em conformidade com as normas da Comissão de Ética em Uso Animal – CEUA - da Universidade Federal de Minas Gerais, sob os protocolos de números 154/2005 e 252/2018, nas instalações dos Laboratórios de Protozooses e de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral (DPAG) e do Laboratório de Amebíase e de Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Foram utilizados fragmentos de fígado emblocados em parafina de: 8 hamsters (*Mesocricetus auratus*) inoculados com a *E. dispar* (Grupo ED), 8 hamsters inoculados com a *E. histolytica* (Grupo EH).

2.2 Cepas de *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar*

Os fragmentos de fígado avaliados, são provenientes de hamsters inoculados com as cepas ACFN de *E. dispar* e EGG de *E. histolytica* e foram eutanasiados ao 3º dia pós infectados (3 DPI). A cepa EGG de paciente portador de colite disentérica e AHA no município de Manaus (AM) e a cepa ACFN foi isolada de paciente assintomático no município de Belo Horizonte (MG). Ambas as cepas são xênicas, ou seja, estão associadas com a microbiota indígena do indivíduo as quais foram isoladas. A identificação da espécie foi confirmada através da análise do zimodema e PCR.

2.3 Análise histopatológica

Para a análise histopatológica foram obtidos dos blocos selecionados, secções histológicas com 4µm de espessura e realizada a coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). Após a coloração, foram feitas reavaliações histopatológicas para confirmação da presença de lesões hepáticas e descrição dos aspectos morfológicos característicos de apoptose presentes nos dois grupos de hamsters.

2.4 Identificação “*in situ*” da fragmentação do DNA segundo a técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*)

Outras secções de 4µm de espessura foram obtidos e fixados em lâminas gelatinizadas para a detecção “*in situ*” da fragmentação do DNA, seguindo o protocolo do kit FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Colorimetric – Klenow Enzyme - QIA21(Calbiochem - Sigma-Aldrich; **St. Louis**, USA). Após a desparafinização e hidratação dos cortes, os mesmos foram submetidos à proteinase K e a inativação da peroxidase endógena foi feita em imersão

na solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% com metanol. Posteriormente, os cortes foram incubados em câmara úmida a 37°C *overnight* com a enzima TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeo). Após o tempo determinado, adicionou-se o conjugado de peroxidase estreptavidina e a revelação foi feita com o cromógeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) e a contracoloração com verde de metila 0,3%, depois os cortes foram desidratados rapidamente em etanol absoluto, diafanizados em xilol e montados em meio de montagem para lâminas histológicas. Foram consideradas células positivas para apoptose aquelas que apresentavam grumos corados em tons de marrom revelados pelo DAB e também aquelas com características morfológicas, tais como a diminuição do seu tamanho e volume, perda do contato com a matriz extracelular e células vizinhas (Anoiquia), redução nuclear (Picnótico), formação de corpos apoptóticos, fragmentação da membrana nuclear (cariorrexe).

2.5 Reações imuno-histoquímicas

Outros cortes histológicos de 4µm de espessura foram fixados em lâminas gelatinizadas e preparados para as reações de imuno-histoquímica, foi utilizado um kit comercial de detecção antimouse/anti-rabbit (Novolink Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. A recuperação antigênica foi realizada por meio de exposição das lâminas com os cortes à solução de ácido cítrico 1%, em calor úmido e pressão (Panela de pressão elétrica Mondial PE-09). Posteriormente, os cortes histológicos foram incubados *overnight* em câmara úmida e escura com os seguintes anticorpos primários: anticorpo policlonal produzido em coelho anti-Bax (sc-526, diluição 1:80, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA); anticorpo policlonal produzido em coelho anti-Bcl-2 (sc-492, diluição 1:80, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA); anticorpo policlonal produzido em coelho anti-caspase 3 clivada (AB3623 (90609), diluição 1:40, Millipore Corporation, EUA). As reações foram reveladas com o cromógeno 3-3' diaminobenzina (DAB) e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavadas em água corrente, desidratadas em solução crescente de álcool, diafanizadas em xilol e montadas em meio de montagem para lâminas histológicas. Como controle negativo da reação, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato (PBS).

2.6 Análise quantitativa da área de marcação Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺, Bcl-2⁺ e de trofozoítos⁺ para os mesmos marcadores

As áreas das marcações imuno-histoquímicas Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺, Bcl-2⁺ foram calculadas em μm^2 através de algoritmos construídos no programa KS300, contido no analisador de imagens Carl Zeis. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de marrom (marcação imuno-histoquímica positiva) para a criação de uma imagem binária e processamento digital, tomando-se o cuidado de excluir manualmente com o auxílio do cursor, todos os trofozoítos positivos para cada marcador (CALIARI, 1997; Oliveira *et al.*, 2021).

Para quantificar a intensidade das marcações, utilizamos o cálculo da densidade ótica (DO) através do mesmo programa de morfometria, por meio de outro conjunto de algoritmos (CALIARI, 1997; Costa *et al.*, 2010b;). A DO é a razão entre a luz transmitida e a luz incidente no comprimento de onda de 500 nm, de acordo com a Lei de Beer: $DO = - \log I/I_0$. Em uma imagem de espécime digital, I é proporcional aos valores dos pixels. Assim, valores de DO mais próximos de zero correspondem a uma intensa imunomarcação e, conseqüentemente, maior ligação dos anticorpos monoclonais às proteínas Caspase 3 clivada, Bax e Bcl-2 aos hepatócitos, outras células do fígado, restos celulares e trofozoítos. Os valores de DO foram expressos em unidades de tons de cinza (Grey) (COSTA *et al.*, 2010b).

Além disso, todos os trofozoítos Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ foram semi-quantificados nos cortes histológicos, sendo considerada como marcação positiva quando o parasito apresentava-se corado de marrom devido à revelação pelo DAB. Cada corte histológico foi completamente analisado utilizando o microscópio Axiolab (Oberkochen, Germany), por intermédio das objetivas de 20 e 40X, sendo feita a seguinte classificação do parasitismo: discreta (presença de 1 a 5 trofozoítos por campo na objetiva de 20x), moderada (presença de zero 6 a 20 trofozoítos por campo na objetiva de 20x) e intensa (presença acima de 21 trofozoítos por campo na objetiva de 20x).

O grupo de hamsters inoculados com *E. histolytica* (Grupo EH) foi utilizado como controle para avaliação da área Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ no AHA, bem como em relação à DO de cada marcação e ao número de trofozoítos positivos para cada marcador.

2.7 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software *GraphPadPrism 8* (GraphPadInc, EUA), o teste de *Grubb* para detectar os *outliers* e, para verificação da distribuição dos dados, o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para análise de variância foram utilizados os

testes *t* de *Student* para os dados paramétricos e *Mann-Whitney* para os dados não-paramétricos. Todos os testes foram considerados significativos quando apresentaram um valor de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Análises histopatológicas

As secções histológicas apresentaram extensas áreas de necrose delimitadas, a borda constituída por detritos celulares, infiltrado inflamatório discreto a moderado, constituído principalmente por macrófagos e neutrófilos e, quantidade variável de tecido de granulação. Mais frequentemente, quantidade variável de trofozoítos foi observada na borda e no centro do AHA e, alguns também estavam presentes nos capilares sinusóides do parênquima hepático não necrosado (Figura 1 A-D). Em todas as lâminas analisadas foram observadas lesões típicas do AHA, já descritas detalhadamente em publicações de nosso grupo de pesquisa (COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010a; SILVA *et al.*, 2021), sendo que as lesões do grupo ED foram tão significativas quanto às do grupo EH.

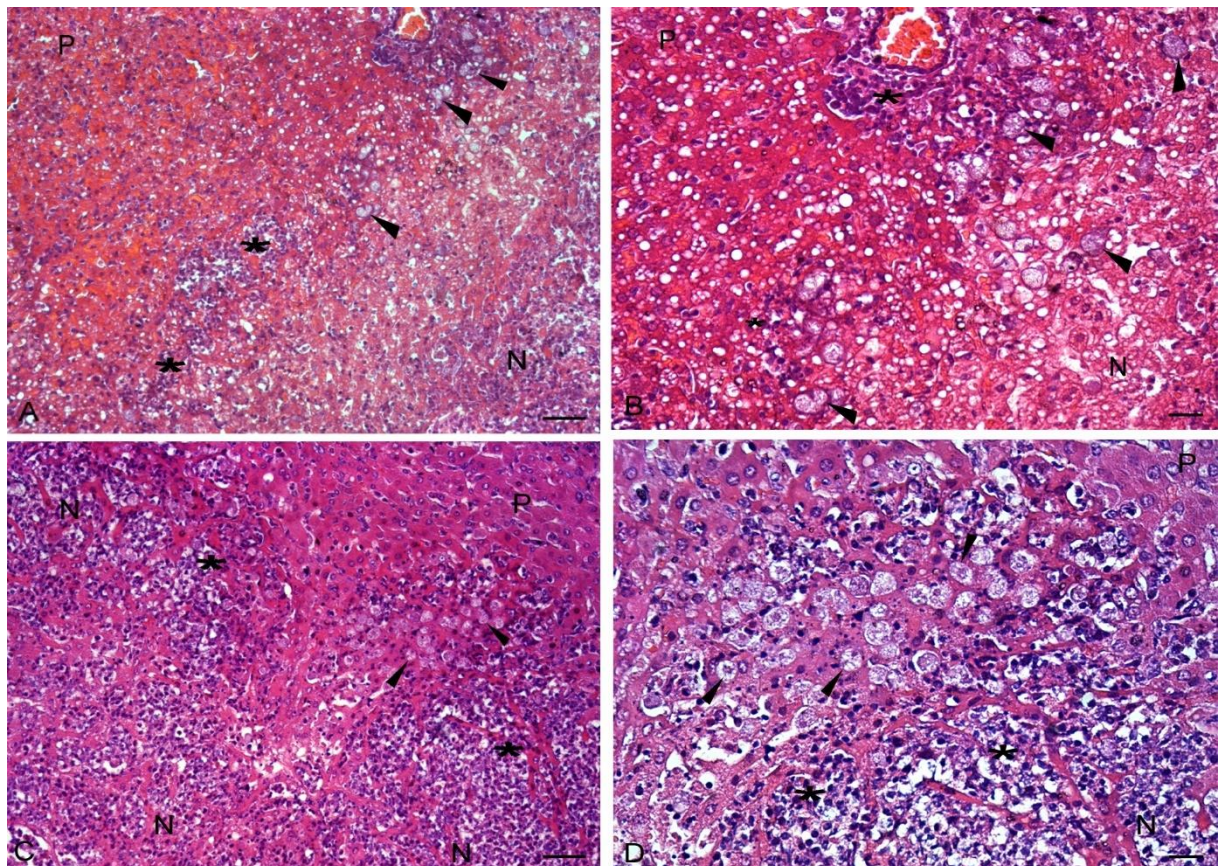


Figura 1. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; análises histopatológicas. (A) Borda do Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*, constituído por faixa de debris celulares e infiltrado inflamatório (*), zona central de necrose (N), bem como por grande número de trofozoítos (cabeças de seta), delimitada por parênquima hepático não necrosado (P). Barra = 50 μ m; (B) Maior aumento da figura anterior. Barra = 20 μ m; (C) AHA induzido por *E. dispar* com as mesmas lesões e estruturas. Barra = 50 μ m; (D) Maior aumento da figura anterior. Barra 20 = μ m. Hematoxilina & Eosina.

3.2 Investigação de apoptose em *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* e pelo ensaio de TUNEL

Para investigar a ocorrência de apoptose no AHA dos hamsters inoculados com as cepas ACFN de *E. dispar* e EGG de *E. histolytica*, realizamos o ensaio de TUNEL em seções histológicas de fragmentos de fígado. Nas análises qualitativas das amostras observamos em todas as lâminas analisadas, coloração TUNEL positiva, caracterizada por coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos (Figura 4 A-D). Em menor quantidade, marcações positivas também foram observadas em áreas do parênquima hepático não necrosado (Figura 2 A-B).

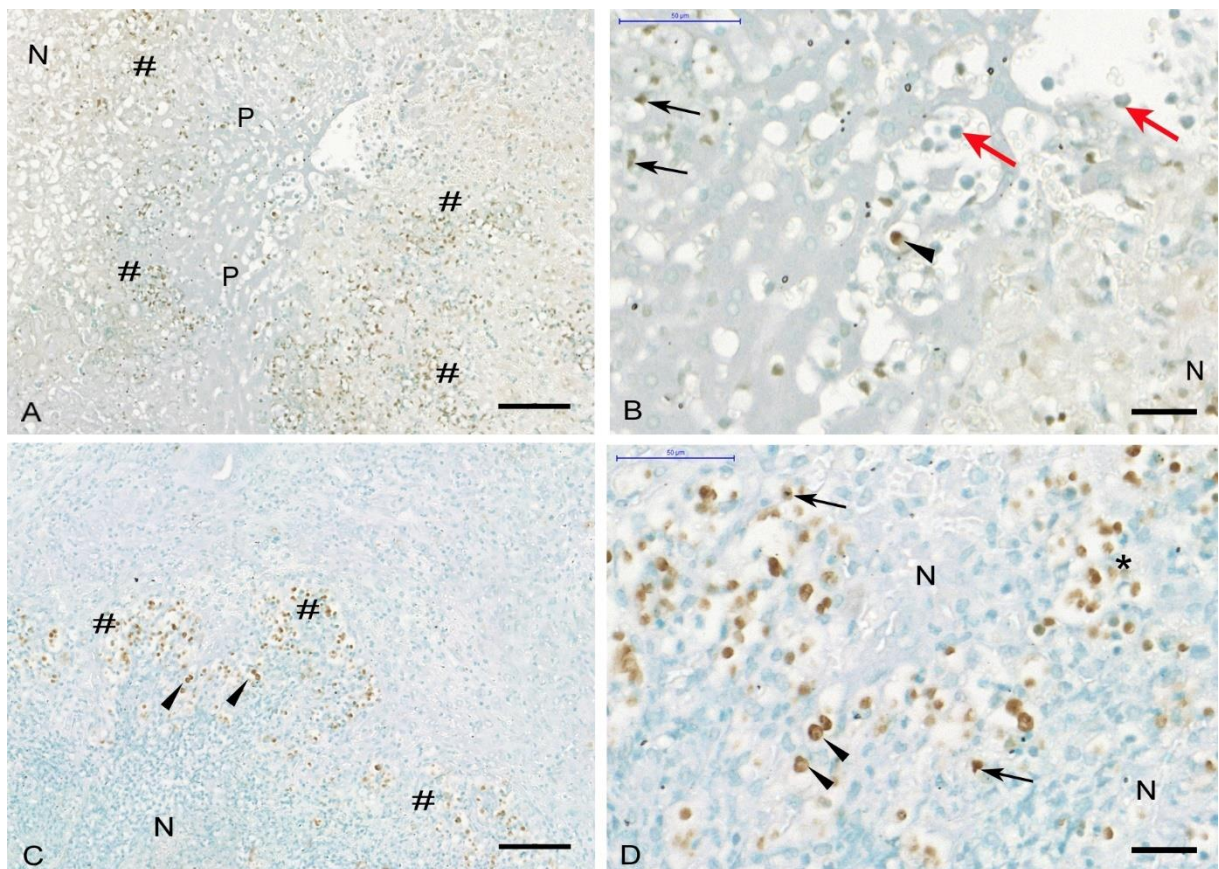


Figura 2. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*, ensaio de TUNEL. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Notar a presença de várias marcações TUNEL⁺, visualizadas como precipitados marrom-escuros, principalmente nas áreas de necrose (#) e, em menor quantidade, no parênquima hepático não necrosado (P); (B) Maior aumento da figura anterior. Trofozoíto TUNEL⁺ (cabeça de seta) e maior número de trofozoítos TUNEL⁻ (setas vermelhas). Reações TUNEL⁺ em prováveis células inflamatórias (setas); (C) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. dispar*. Grande quantidade de marcações TUNEL⁺ de coloração marrom-escuro na borda do AHA (#), quantidade menor destas marcações na área central de necrose (N) e escassas marcações no parênquima hepático não necrosado (P); (D) Maior aumento da figura anterior mostrando trofozoítos TUNEL⁺ com anoiquia e picnose (Cabeças de setas). Reações TUNEL⁺ em prováveis células inflamatórias (setas). TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*). Barra = 50 µm.

3.3 Análises morfométricas das áreas Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ nos AHA's induzidos por *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

3.3.1 Caspase 3 clivada⁺

Em todas as lâminas analisadas foram observadas marcações Caspase 3 clivada⁺ em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos, caracterizadas pela coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB. Tal marcação indicou o desenvolvimento de apoptose nestas células dos AHA's de ambos os grupos de Hamsters (Figura 3 A-D), corroborando com os achados no ensaio de TUNEL. A substituição do anticorpo 1º por PBS produziu reação negativa (Figura 3 E). A análise qualitativa destas reações imuno-histoquímicas demonstrou maior área de marcação nos hamsters do Grupo EH quando comparado ao grupo ED.

A análise morfométrica demonstrou maior área Caspase 3 clivada⁺ no AHA induzido pela *E. histolytica*, em comparação com o produzido pela *E. dispar*, indicando maiores níveis de apoptose (p=0,0056) (Figura 3 F). Não foi observada diferença na DO entre os dois grupos de hamsters (Figura 3 G).

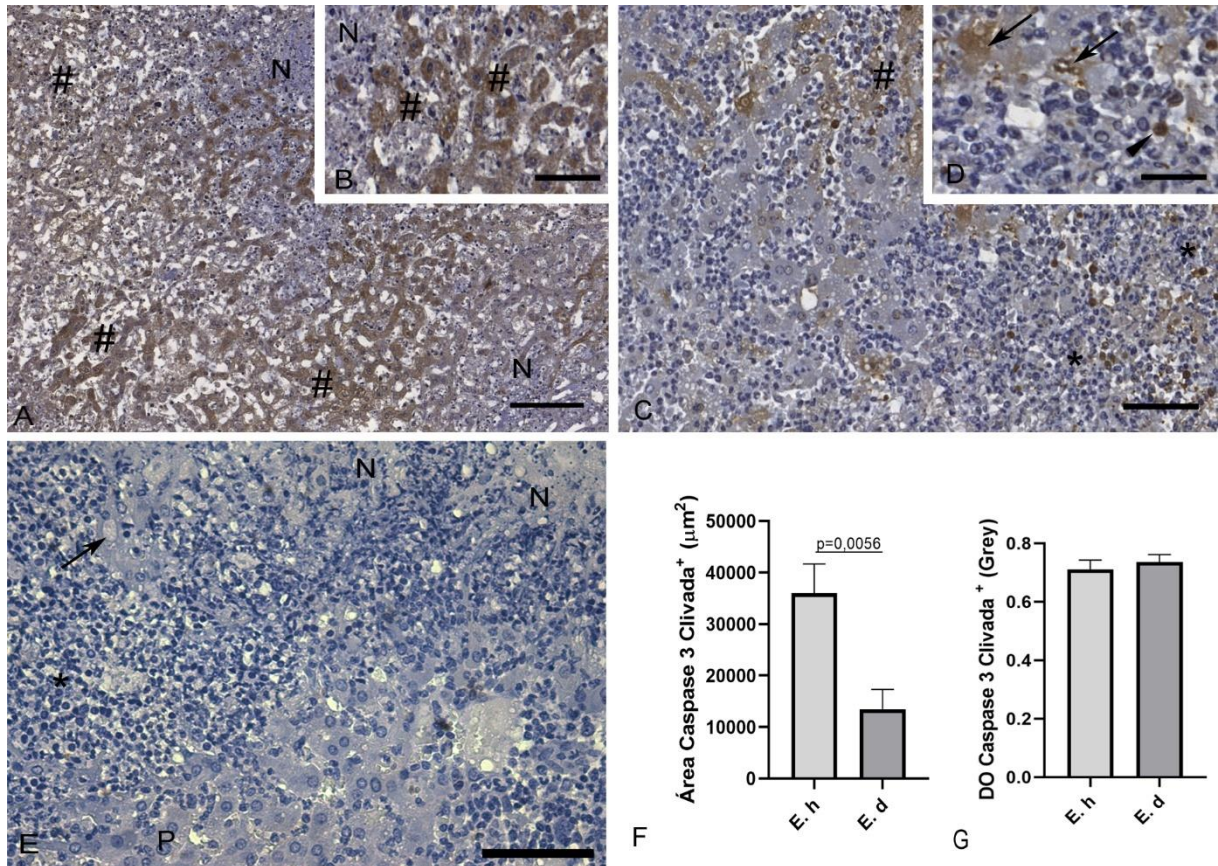


Figura 3. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; imuno-histoquímica caspase 3 clivada. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Amplas áreas Caspase 3 clivada⁺ (#). Barra = 50 μm ; (B) Detalhe da figura anterior mostrando hepatócitos Caspase 3 clivada⁺ (#). Barra = 20 μm ; (C) AHA induzido por *E. dispar*. Menor área Caspase 3 clivada⁺ (#) em comparação com o grupo EH. Barra = 50 μm ; (D) Detalhe da figura anterior hepatócitos (setas) e célula inflamatória (cabeça de seta) Caspase 3 clivada⁺. Barra = 20 μm ; (E) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Caspase 3 clivada. Notar a ausência de marcações positivas. Trofozoíto negativo (seta). Barra = 50 μm . Debris celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Contracoloração por Hematoxilina. (F) Área caspase 3 clivada⁺ (μm^2), $p=0,0056$, teste T de Student não-pareado; (G) Densidade óptica (DO) das áreas caspase 3 clivada⁺ (Grey), teste *t* de Student não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média \pm S.E.M, n = 8. NOS.

3.3.2 Bax⁺

Marcações Bax⁺ coradas com tons de marrom foram detectadas em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos em todas as lâminas (Figura 4 A-D). A substituição do anticorpo 1^o por PBS produziu reação negativa (Figura 4 E).

Foi observada redução da DO de Bax⁺ no AHA induzido pela *E. histolytica*, indicando aumento da intensidade de marcação imuno-histoquímica e maior expressão da proteína (Figura 4 G) ($p=0,0271$). A maior expressão de Bax⁺ no grupo EH sugere a participação da mesma na indução de maiores níveis de apoptose neste grupo.

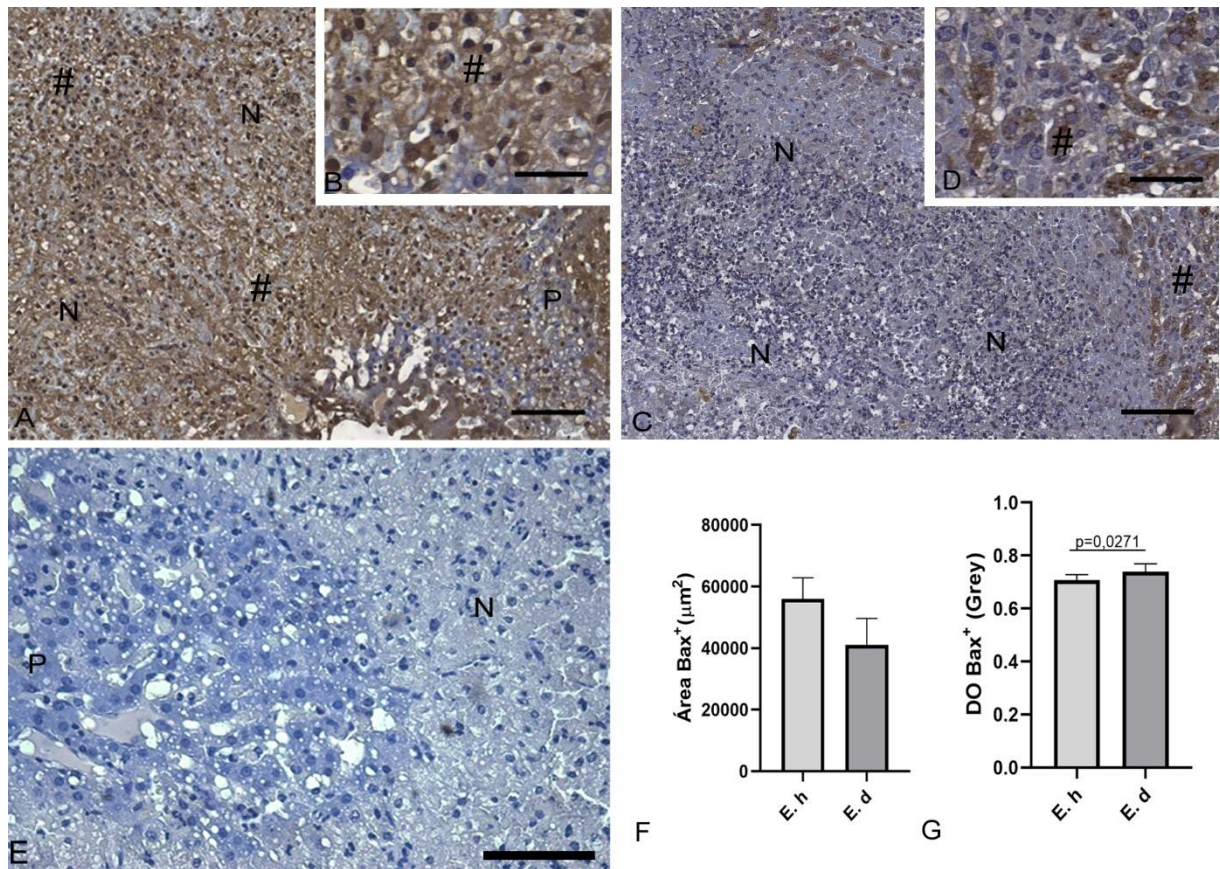


Figura 4. Figura 6. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; imuno-histoquímica Bax. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Amplas áreas Bax⁺ (#). Barra = 50 μm ; (B) Detalhe da figura anterior mostrando hepatócitos Bax⁺ (#). Barra = 20 μm ; (C) Menor área Bax⁺ (#) em comparação com o grupo EH. Escassos hepatócitos Bax⁺ (cabeças de seta). Barra = 50 μm ; (D) Detalhe da figura anterior mostrando alguns hepatócitos Bax⁺ (setas). Barra = 20 μm ; (E) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Bax. Notar a ausência de marcações positivas. Barra = 50 μm . Debris celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Contracoloração por Hematoxilina. (F) Bax⁺ (μm^2); (G) Densidade óptica (DO) das áreas Bax⁺ (Grey), $p = 0,0271$, teste t de Student não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média \pm S.E.M, $n = 8$.

3.3.3 Bcl-2⁺

Todas as lâminas analisadas dos dois grupos de hamsters apresentaram marcações Bcl-2⁺ em hepatócitos, células inflamatórias e em trofozoítos, caracterizadas pela coloração marrom obtida por revelação pelo cromógeno DAB (Figura 5 A-D). A substituição do anticorpo 1° por PBS produziu reação negativa (Figura 5 E). Qualitativamente foi observada maior marcação imuno-histoquímica no grupo ED em relação ao grupo EH.

A análise morfométrica demonstrou maior área BCL2⁺ no AHA induzido pela *E. dispar* ($p=0,0001$), em comparação com o produzido pela *E. histolytica*, assim como menor densidade

óptica de Bcl-2 no AHA induzido pela *E. dispar* ($p=0,0217$), indicando aumento da intensidade de marcação imuno-histoquímica e maior expressão da proteína (Figura 5 F-G). Em conjunto estes dados mostraram que a maior expressão de Bcl-2 parece ter contribuído para os menores níveis de apoptose no AHA do grupo ED.

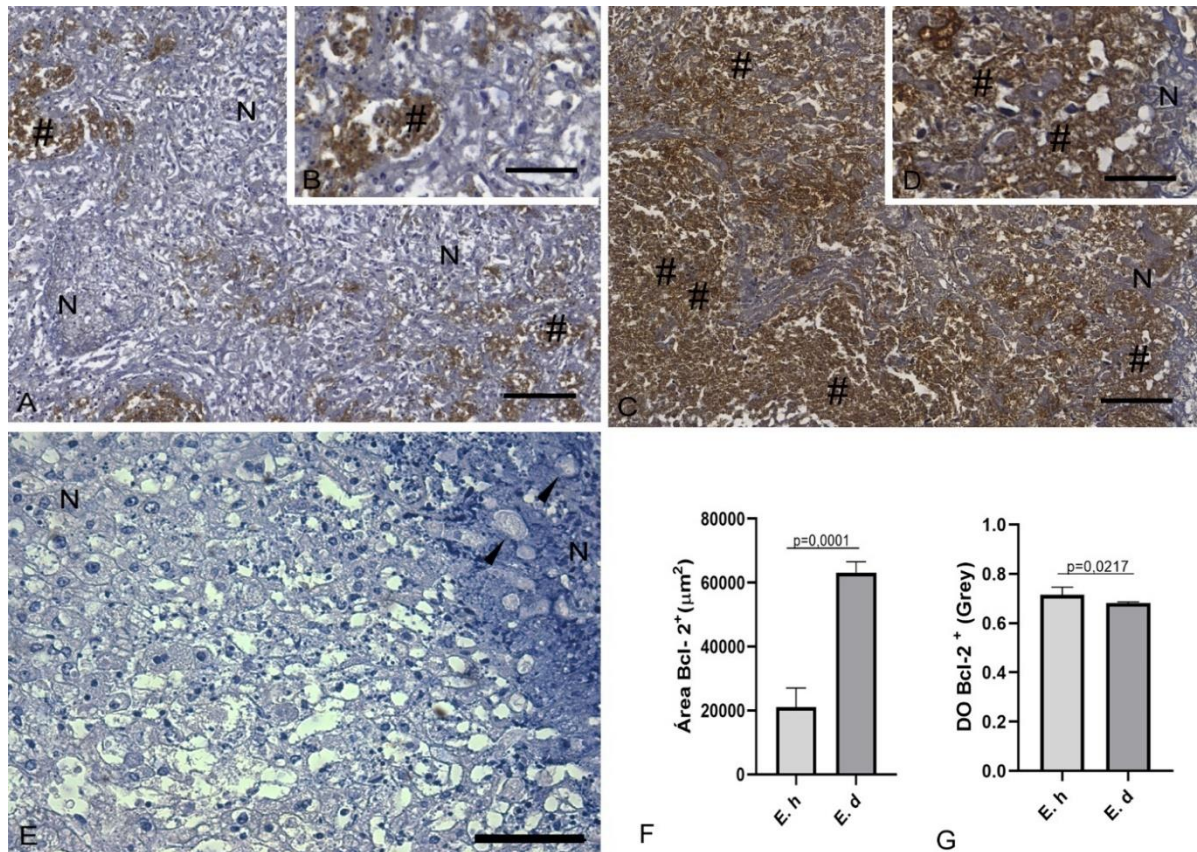


Figura 5. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*; imuno-histoquímica Bcl-2. (A) Abscesso Hepático Amebiano (AHA) induzido por *E. histolytica*. Reduzidas áreas Bcl-2⁺ em comparação com o grupo ED (#). Barra = 50 μm; (B) Detalhe da figura anterior mostrando áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 20 μm; (C) Extensas áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 50 μm; (D) Detalhe da figura anterior mostrando áreas Bcl-2⁺ (#). Barra = 20 μm; (E) Controle negativo de reação imuno-histoquímica para Bcl-2. Notar a ausência de marcações positivas. Trofozoítos negativos (cabeças de setas). Necrose (N). Contracoloração por Hematoxilina. (F) Área Bcl-2⁺ (μm²), $p = 0,0001$, teste T de Student não-pareado; (G) Densidade óptica (DO) das áreas Bcl-2⁺ (Grey), $p = (p=0,0217)$, teste t de Student não-pareado. Os dados são representados nos gráficos como média ± S.E.M, $n = 8$.

3.4 Análise semiquantitativa dos trofozoítos Caspase 3 clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ no abscesso hepático amebiano induzido por *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*

Em todas as amostras analisadas foi possível observar a presença de trofozoítos Caspase 3⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺ na borda do AHA, zona central de necrose e nos capilares sinusóides do parênquima hepático não necrosado. Conforme mencionado na metodologia, para a análise

semiquantitativa foram criadas três categorias de parasitismo na borda do AHA : discreto, moderado e intenso.

Tanto os trofozoítos caspase 3 clivada⁺ (p= 0,0256) quanto aqueles Bax⁺ (p = 0,0150) relacionados ao desenvolvimento de apoptose, foram encontrados em maior quantidade na borda do AHA do grupo ED, tendo sido classificados como parasitismo moderado (Figura 6 A-F). Já em relação aos trofozoítos Bcl-2⁺, que estão menos propensos a sofrer apoptose, foram observados em maior quantidade na borda do AHA do grupo EH (p= 0,0130), sendo categorizados como causadores de um parasitismo intenso (Figura 6 G-I). Analisando estes dados em conjunto, podemos afirmar que os trofozoítos da cepa ACFN de *E. dispar* mostraram-se menos resistentes a sofrer apoptose do que aqueles da cepa EGG de *E. histolytica* e que estes últimos foram capazes de manter maiores níveis de sobrevivência.

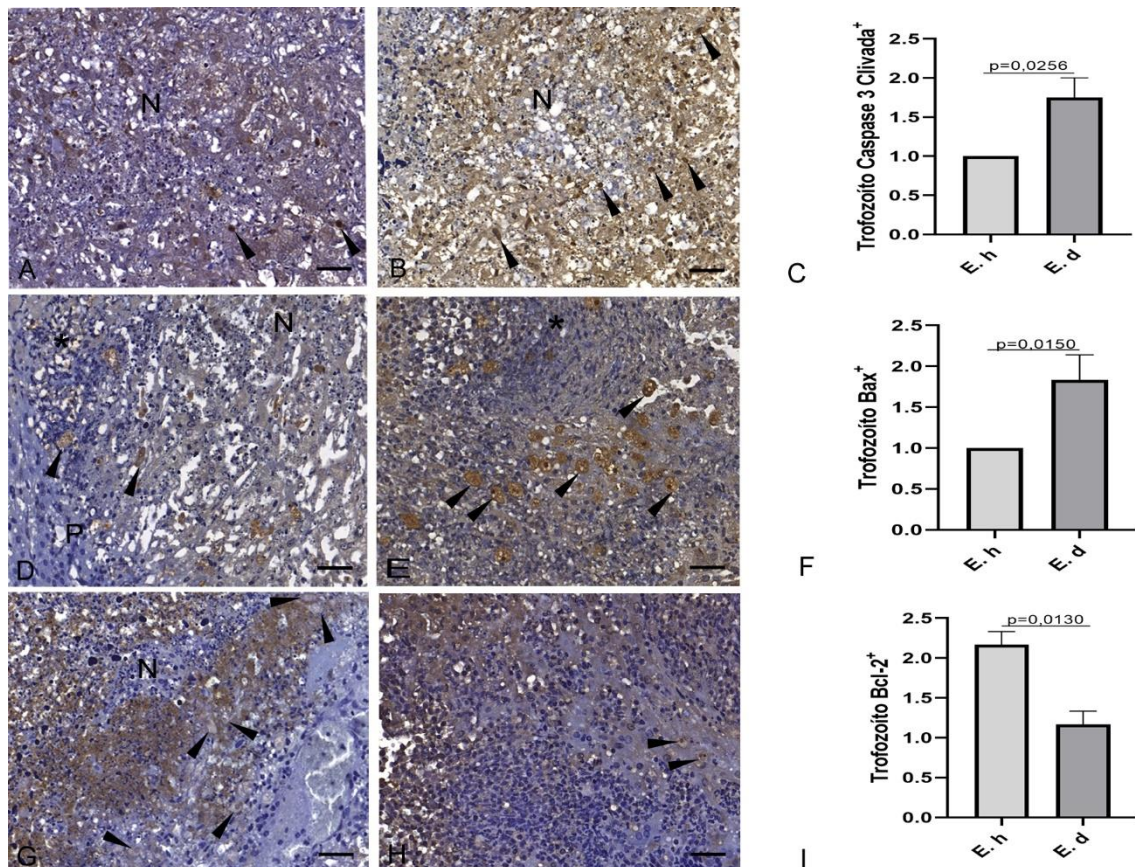


Figura 6. Fígado de Hamster inoculado com *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*, trofozoítos caspase clivada⁺, Bax⁺ e Bcl-2⁺. (A) Escassos trofozoítos caspase 3 clivada⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo EH; (B) Grande quantidade de trofozoítos caspase 3 clivada⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo ED; (C) Análise semiquantitativa dos trofozoítos caspase 3 clivada⁺; (D) Pequeno número de trofozoítos Bax⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo EH; (E) Grande número de trofozoítos Bax⁺ (cabeças de seta) no AHA do grupo ED; (F) Análise semiquantitativa dos trofozoítos Bax⁺; (G) Grande quantidade de trofozoítos Bcl-2⁺ no AHA do grupo EH; (H) Escassos trofozoítos Bcl-2⁺ no AHA do grupo ED; (I) Análise semiquantitativa dos trofozoítos Bcl-2⁺. Debris

celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Contracoloração por Hematoxilina. Barra = 20 µm. Teste *Mann - Whitney*.

4. DISCUSSÃO

O AHA é a forma extraintestinal mais comum de manifestação da amebíase e está associada com altas taxas de morbidade e mortalidade. Levantamento realizado entre 2011 e 2015 confirmou que o AHA continua sendo uma importante complicação da amebíase em alguns países asiáticos, africanos e latinos, particularmente em populações pobres, analfabetas e com elevado índice de alcoolismo (MARTÍNEZ-PALOMO *et al.*, 2017). Diante disso, torna-se necessária a realização de estudos para melhor compreensão de seus mecanismos de desenvolvimento e evolução. A totalidade dos autores sempre considerou que a necrose liquefativa experimental produzida na infecção amebiana era a principal responsável pela destruição do parênquima hepático (TSUTSUMI *et al.*, 1984). Contudo, pela primeira vez, este estudo demonstrou elevados níveis de apoptose no AHA induzido por *E. histolytica*, mediante detecção de elevada expressão de caspase 3 clivada e Bax, maiores do que o observado no AHA produzido por *E. dispar*. Além disso, também demonstramos que ambas as espécies expressaram caspase 3 clivada, Bax e Bcl-2 e que, *E. dispar* foi mais susceptível de sofrer apoptose do que *E. histolytica*, mediante maior expressão de caspase 3 clivada e bax e, menor expressão de BCL2. Tais dados em conjunto demonstraram a menor capacidade da *E. dispar* em sobreviver no AHA. Este trabalho preenche uma importante lacuna na pesquisa em amebíase, que é a grande escassez de estudos a respeito da apoptose no AHA.

A utilização experimental de modelos animais in vivo contribuiu significativamente para o conhecimento da amebíase. Embora não exista um modelo animal que contemple todo o ciclo da doença, o uso de diferentes técnicas e de animais de laboratório tem proporcionado uma melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) e gerbils (*Meriones unguiculatus*) são animais susceptíveis para o desenvolvimento da amebíase, sendo que o hamster foi o modelo que mais têm reproduzindo satisfatoriamente o AHA (TSUTSUMI E SHIBAYAMA, 2006). Nosso grupo de pesquisa tem reproduzido o AHA experimental, tanto por *E. histolytica* quanto por *E. dispar*, de forma semelhante ao observado na doença humana (GOMES *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010a; COSTA *et al.*, 2010b; COSTA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2021).

Estudos de cinética da amebíase no AHA, tanto os induzidos por *E. histolytica* (TSUTSUMI *et al.*, 1984), quanto por *E. dispar* (COSTA *et al.*, 2010a), demonstraram que na

fase inicial da infecção, são encontrados trofozoítos nos espaços porta, capilares sinusóides e veias centrais. A invasão do parênquima hepático pelos trofozoítos ocorre mediante a liberação de seus produtos tóxicos, ocorrendo a ativação da resposta inflamatória e recrutamento principalmente de neutrófilos e macrófagos. Há então a formação de microabscessos ricos em neutrófilos, que envolvem os trofozoítos na tentativa de eliminá-los. Contudo, os trofozoítos resistentes à resposta imune se dividem e os focos inflamatórios vão aumentando, coalescendo e levando a formação do AHA (COSTA *et al.*, 2010a; SANTI-ROCCA, 2009; RIGOTHIER *et al.*, 2002). O AHA é caracterizado por extensas áreas de hepatócitos mortos que formam cavidades circunscritas por debris celulares, células inflamatórias e trofozoítos, principalmente presentes nas bordas e no centro do AHA, (SEYDEL e STANLEY, 1998). O aumento do AHA parece ser devido especialmente pelos produtos secretados pelos trofozoítos e, em menor grau, pelas células do sistema imune do hospedeiro (COSTA *et al.*, 2010b). O AHA produzido pela cepa ACFN de *E. dispar* foi semelhante ao produzido pela cepa EGG de *E. histolytica*, confirmando o seu potencial patogênico e corroborando com os dados de Silva e colaboradores (2021).

O estabelecimento da infecção amebiana depende da capacidade dos trofozoítos em destruir os tecidos do hospedeiro e de fagocitar suas células e restos celulares (HUSTON *et al.*, 2003). Para isso, o parasito se utiliza de seus fatores de virulência, capazes de lisar células hospedeiras, destruir proteínas da matriz extracelular, moléculas imunes e também de induzir apoptose (HAQUE *et al.*, 2003; HUSTON, 2004).

Em nosso estudo foi possível observar a fragmentação do DNA pelo ensaio de TUNEL, através da visualização de células marcadas em tons de marrom e com características morfológicas de apoptose, tanto na borda do AHA quanto em sua zona central, demonstrando que a infecção pelas cepas EGG de *E. histolytica* e ACFN de *E. dispar* foram capazes de induzir apoptose em hepatócitos e células inflamatórias no fígado de hamster, corroborando dados do estudo que utilizou a cepa HM1:IMSS de *E. histolytica* (SEYDEL & STANLEY, 1998). Evidências obtidas por outros autores também demonstraram que a apoptose também pode contribuir para o dano tecidual. Inibidores de adesão dos trofozoítos como a D-galactose reduziram significativamente os índices de apoptose no epitélio intestinal de camundongos inoculados com *E. histolytica*, mediante ação da lectina GAL/GALNAc que promoveu ativação da caspase 3, independente de caspases 8 e 9 (HUSTON *et al.*, 2000).

O ensaio de TUNEL é usado para detectar a fragmentação de DNA associada à morte celular (terminais 3'-OH do DNA) por endonucleases. A molécula de DNA é a única que pode ser reparada, contudo, não pode ser ressintetizada após o dano. A fragmentação ou a destruição

do DNA é um dos estágios finais nas várias etapas do processo de morte celular e marcador preciso deste tipo de lesão irreversível (HENGARTNER, 2001; BASNAKIAN et al, 2017; MOORE et al, 2021). Além do ensaio de TUNEL, a fragmentação do DNA associada à morte celular pode ser detectada por outras técnicas, tais como *DNA ladder assay* e *Comet assay* (MAJTNEROVA; ROUSAR, 2018; MOORE et al, 2021).

A apoptose é mediada por uma família de proteases de cisteína (Caspases) que desempenham papel na iniciação, regulação e execução dos eventos proteolíticos que ocorrem durante a apoptose. A ativação de caspases é um dos indicadores mais específicos do processo apoptótico (DUAN *et al*, 2003). Nesse contexto, após a confirmação da presença de apoptose nos dois grupos de hamsters pelo TUNEL, investigamos a expressão de caspase 3 clivada, enzima esta utilizada como marcador de ativação da apoptose.

A reação imuno-histoquímica para caspase-3 clivada, bem como para os outros marcadores utilizados neste estudo, funcionou perfeitamente nos cortes histológicos de todas as amostras, que foram fixadas em formalina tamponada, embebidas e emblocadas em parafina e, que estavam arquivadas há muitos anos. Tais achados corroboram com o estudo de DUAN e colaboradores (2003), sobre a detecção de apoptose em cortes histológicos por meio da imunohistoquímica de caspase-3 clivada.

Observamos marcação caspase 3 clivada⁺, tanto no grupo EH quanto no ED, em hepatócitos e células inflamatórias, com alterações morfológicas indicativas de apoptose, bem como em células de aspecto morfológico normal. Tal observação pode representar uma população de células nos estágios iniciais de apoptose. A análise morfométrica comprovou maior área caspase 3 clivada⁺ no grupo EH. Diante da presença de maiores áreas de reação positiva no grupo EH em comparação ao grupo ED, podemos concluir que a *E. Histolytica* produziu maiores níveis de apoptose do que a *E. dispar* no AHA experimental.

Estudos demonstraram que *E. histolytica* causa apoptose independente da via Fas/FasL (SEYDEL; STANLEY, 1998). Esse protozoário destrói as células-alvo em um processo sequencial de adesão à célula-alvo através da lectina de superfície Gal/GALNac, influxo de cálcio, desfosforilação da tirosina e, conseqüentemente, ativação da caspase 3 (RALSTON & PETRI, 2011). Na seqüência, ocorre liberação de outros fatores de virulência, tais como amebaporos e cisteína-proteinases, induzindo a morte da célula hospedeira e sua fagocitose. De fato, estudo “*in vivo*” demonstrou que o bloqueio de caspases foi capaz de reduzir o tamanho do AHA em camundongos (YAN; STANLEY, 2001).

A família Bcl-2 compreende os agentes mediadores de apoptose que, embora seus membros compartilhem estruturas homólogas, suas funções biológicas se diferenciam em

promotoras de apoptose (Bax e Bak, dentre outras) ou inibidoras de apoptose (Bcl-2, Bcl-xl, dentre outras) (GUO *et al*, 2012). Apesar de nossa análise não ter mostrado diferença nas áreas de marcação para a proteína pró apoptótica Bax entre o grupo EH e o ED, foi verificada redução da DO Bax⁺ no AHA induzido pela *E. Histolytica*. Tal redução mostra ter ocorrido aumento da expressão de Bax em uma mesma área de marcação imuno-histoquímica, conforme metodologia padronizada previamente (COSTA *et al*, 2010b), e sugere a participação desta proteína nos maiores níveis de apoptose no AHA induzido pela *E. histolytica* em comparação ao observado na infecção por *E. dispar*. Estes resultados são corroborados pelas observações de outros autores onde *E. histolytica* foi capaz de produzir maior quantidade e tipos de fatores de virulência do que a *E. dispar*, sendo, portanto, melhor equipada para gerar mais lesões, inclusive a apoptose (NICKEL *et al.*, 1999; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

Quanto à expressão de Bcl-2, verificamos maiores áreas de marcação Bcl-2⁺ e de DO Bcl-2⁺ no AHA do grupo ED quando comparado com o grupo EH. Este dado corrobora o que foi verificado em relação à expressão de caspase 3 clivada, que foi menor. Por ter sofrido menores níveis de apoptose, era esperado que o AHA deste grupo apresentasse maiores níveis de alguma proteína antiapoptótica, conforme observamos em relação à Bcl-2. No entanto, mesmo apresentando maior expressão Bcl-2⁺ do que o grupo EH, vale ressaltar que no AHA produzido pela *E. dispar*, a infecção também foi capaz de induzir apoptose, mesmo que em menores níveis que no grupo EH. Estes resultados são corroborados por um estudo “*in vitro*” onde células mieloides murinas foram induzidas a sofrerem aumento da expressão de Bcl-2. Tal aumento não foi capaz de proteger as células de sofrerem a apoptose por *E. histolytica*, sendo sugerido pelos autores, que a morte celular pode ter sido devida a ação de moléculas semelhantes à granzima, uma vez que essa espécie de ameba pode transportar enzimas para ativar diretamente o mecanismo de morte celular, contornando os controles celulares via Bcl-2 (RAGLAND *et al.*, 1994).

Os fatores de virulência que poderiam contribuir na execução de uma via independente de Bcl-2, seriam as amebaporos, que estão presentes nas duas espécies (NICKEL *et al.*, 1999). Ambas as espécies possuem uma classe de vesículas intracelulares ácidas que possivelmente desempenham papel na citotoxicidade, por meio de um mecanismo análogo ao dos CTLs (linfócitos T citotóxicos), que utilizam proteínas formadoras de poros (perforinas) e proteases (granzimas) (RALSTON; PETRI, 2011). A *E. dispar* apresenta 95% de homologia das amebaporos quando comparada à *E. histolytica*, mas em menor concentração. Apesar disso,

estudos “*in vitro*” mostraram que a *E. dispar* utiliza amebaporos para destruir bactérias fagocitadas (LEIPPE, 1997).

Além de alguns produtos de secreção amebianos serem pró-apoptóticos, é possível também que o processo inflamatório possa ter contribuído para o desenvolvimento de apoptose no AHA. Por outro lado, a escassez de células inflamatórias em relação ao elevado tamanho do AHA, aponta para um provável maior envolvimento dos fatores de virulência amebianos como responsáveis na indução desta apoptose. Nesse sentido, ainda precisam ser realizados mais estudos para se compreender quais são os responsáveis pela indução de apoptose, tanto nas células do hospedeiro quanto nos trofozoítos.

Apesar dos trofozoítos apresentarem alguns mecanismos de evasão do sistema imune, os mesmos podem ser destruídos, por exemplo, por neutrófilos, macrófagos, anticorpos e o sistema complemento. Estudo “*in vivo*” demonstrou que a produção de óxido nítrico pelas células fagocitárias pode estar envolvida na morte celular programada dos trofozoítos de *E. histolytica* (VILLALBA-MAGDALENO *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou a apoptose de trofozoítos expostos a H₂O₂, independente de caspase, com aumento do Ca²⁺ citosólico e expressão de fosfatidilserina no folheto exterior da membrana citoplasmática, com características morfológicas de morte por apoptose (NANDI *et al.*, 2010). Pelo contrário, nosso estudo mostrou a presença de marcação caspase 3 clivada⁺ em vários trofozoítos de *E. Dispar* e *E. histolytica*, muitos com anoiquia e picnose, demonstrando que a apoptose foi caspase 3 clivada dependente. Esse achado foi corroborado pela observação da maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax e, menor da antiapoptótica Bcl-2 no grupo ED, demonstrando a menor capacidade desta espécie em sobreviver no AHA. O fato de Nandi e colaboradores (2010) não terem observado ativação de caspases em seu estudo talvez fosse devido às condições experimentais “*in vitro*” serem bem diferentes ao que é observado em um estudo “*in vivo*”, como foi o realizado por nós.

Outros mecanismos têm sido pesquisados e propostos para explicar a ocorrência de apoptose em *E. histolytica*. Monroy e colaboradores (2010) demonstraram, em um estudo “*in vitro*” sobre a expressão gênica de sinais pró-apoptóticos e antiapoptóticos, que o gene do tipo saposina apresentou uma elevada expressão no início da apoptose. Esse gene expressa uma proteína de características semelhantes à proteína saposina C humana (WINKELMANN *et al.*, 2006). Essa proteína apresenta várias atribuições, dentre elas, a de ativar proteína quinases, proteína fosfatases (KONG *et al.*, 2005), Catepsina D e caspase-3 em células tumorais (De STEFANIS *et al.*, 2002). Em contrapartida, foi observado que as graninas, proteínas do parasito com semelhança estrutural às proteínas de ligação ao cálcio, podem apresentar uma atividade

antiapoptótica (MONROY, 2010). Tal hipótese foi formulada após a verificação de que houve sua superexpressão, demonstrando uma provável atividade compensatória, onde os trofozoítos ativaram mecanismos moleculares para tentar recapturar o cálcio Ca^{2+} intracelular livre e impedir a apoptose. No entanto, maiores estudos são necessários para avaliar a participação destas proteínas na apoptose, tanto na *E. histolytica*, quanto na *E. dispar*.

5. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou pela primeira vez que a apoptose também está presente, e de forma significativa, no AHA induzido experimentalmente pela *E. dispar*. Também, a expressão significativa de caspase 3 clivada no AHA sugeriu o envolvimento da via intrínseca da apoptose e, a expressão de Bax e Bcl-2 demonstrou a importância destas duas proteínas na modulação da apoptose. A infecção pela *E. histolytica* foi capaz de induzir mais apoptose no AHA do que pela *E. dispar*, enquanto esta espécie foi menos eficaz em resistir a indução de apoptose. Bax e Bcl-2 também modularam a apoptose e a sobrevivência dos trofozoítos de ambas as espécies

REFERÊNCIAS

Basnakian, A.G.; Braman, N.; Yin, X.; Kolomeychuk, S.; Apostolov, E.O. Toxicological Analysis Using DNA Fragmentation. In *Encyclopedia of Analyt Chem*; Meyers, R.A., Ed.; John Wiley: Chichester, UK, 2017; pp. 1–2. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9629>

Benetton ML, *et al.* Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/E. *dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 Jul;99(7):532-40. doi: 10.1016/j.trstmh.2004.11.015. PMID: 15869773.

Bohlon SS, Fraser DA, Tenner AJ. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol.* 2007 Jan;44(1-3):33-43. doi: 10.1016/j.molimm.2006.06.021. Epub 2006 Aug 14. PMID: 16908067.

Braga LL, Ninomiya H, McCoy JJ, Eacker S, Wiedmer T, Pham C, Wood S, Sims PJ, Petri WA Jr. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesion of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3):1131-7. doi: 10.1172/JCI115931. PMID: 1381719; PMCID: PMC329975.

Caliari, M.V.; *Princípios de Morfometria Digital: KS300 para iniciantes.* Ed. UFMG. p149, 1997.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Página revista em: 29 de outubro de 2019 . <https://www.cdc.gov/dpdx/intestinalamebae/index.html> . Acesso em 06/07/2020

Costa CAX, Brito KN, Gomes MA, Caliari MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite.* 2007 Dec;14(4):329-34. doi: 10.1051/parasite/2007144329. PMID: 18225422.

Costa CAX, De Brito KN, Gomes MA, Caliari MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem.* 2010a Aug26;54(3):e39. doi: 10.4081/ejh.2010.e39. PMID: 20819776; PMCID: PMC3167314.

Costa CAX, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliari MV. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. *Parasit Vectors.* 2010b Mar26;3(1):23. doi: 10.1186/1756-3305-3-23. PMID: 20338063; PMCID: PMC2861030.

Costa CAX, Fonseca TH, Oliveira FM, Santos JF, Gomes MA, Caliari MV. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: an immunohistochemical and morphometric study. *Parasit Vectors.* 2011 Feb 28;4:27. doi: 10.1186/1756-3305-4-27. PMID: 21356065; PMCID: PMC3058109.

De Stefanis D, Reffo P, Bonelli G, Baccino FM, Sala G, Ghidoni R, Codogno P, Isidoro C. Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of

apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biol Chem.* 2002 Jun;383(6):989-99. doi: 10.1515/BC.2002.106. PMID: 12222689.

Dourado A, Maciel A, Aca Ida S. Ocorrência de *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE [Occurrence of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in ambulatory patients of Recife, PE]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006 Jul-Aug;39(4):388-9. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822006000400015. PMID: 17119758.

Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb;199(2):221-8. https:// doi: 10.1002/path.1289. PMID: 12533835.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007 Jun;35(4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337. PMID: 17562483; PMCID: PMC2117903.

Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev.* 2000 Apr;13(2):318-31. doi: 10.1128/CMR.13.2.318. PMID: 10756002; PMCID: PMC100155.

Gomes, Maria A. *et al.* Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical, and molecular parameters. *Archives of Medical Research*, 2000.

Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med.* 2003 Apr 17;348(16):1565-73. doi: 10.1056/NEJMra022710. PMID: 12700377.

Hengartner MO. Apoptosis. DNA destroyers. *Nature.* 2001 Jul 5;412(6842):27, 29. doi: 10.1038/35083663. PMID: 11452284.

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA Jr. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol.* 2000 Dec;2(6):617-25. doi: 10.1046/j.1462-5822.2000.00085.x. PMID: 11207613.

Huston CD, Boettner DR, Miller-Sims V, Petri WA Jr. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun.* 2003 Feb;71(2):964-72. doi: 10.1128/IAI.71.2.964-972.2003. PMID: 12540579; PMCID: PMC145391.

Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol.* 2004 Jan;20(1):23-6. doi: 10.1016/j.pt.2003.10.013. PMID: 14700586.

Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2005 Oct;278(1-2):39-51. doi: 10.1007/s11010-005-1979-6. PMID: 16180087.

Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today.* 1997 May;13(5):178-83. doi: 10.1016/s0169-4758(97)01038-7. PMID: 15275088.

Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun*. 2006 Jan;74(1):118-24. doi: 10.1128/IAI.74.1.118-124.2006. PMID: 16368964; PMCID: PMC1346632.

Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M, Tsutsumi, G.R.; Tsutsumi, V. Chapter 13 - Amebic Liver Abscess, *Liver Pathophysiology*, Academic Press, 2017, Pages 181-186, ISBN 9780128042748. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804274-8.00013-8>.

Majtnerová P, Roušar T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Mol Biol Rep*. 2018 Oct;45(5):1469-1478. doi: 10.1007/s11033-018-4258-9. Epub 2018 Jul 18. PMID: 30022463.

Monroy VS, Flores MO, Villalba-Magdaleno JD, Garcia CG, Ishiwara DG. *Entamoeba histolytica*: differential gene expression during programmed cell death and identification of early pro- and anti-apoptotic signals. *Exp Parasitol*. 2010 Dec;126(4):497-505. doi: 10.1016/j.exppara.2010.05.027. Epub 2010 May 31. PMID: 20515683.

Moore, C.L.; Savenka, A.V.; Basnakian, A.G. TUNEL Assay: A Powerful Tool for Kidney Injury Evaluation. *Int. J. Mol. Sci*. 2021, 22,412. <https://doi.org/10.3390/ijms22010412>

Nandi N, Sen A, Banerjee R, Kumar S, Kumar V, Ghosh AN, Das P. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Microbiology (Reading)*. 2010 Jul;156(Pt 7):1926-1941. doi: 10.1099/mic.0.034066-0. Epub 2010 Mar 18. PMID: 20299403.

Nickel R, Ott C, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem*. 1999 Nov;265(3):1002-7. doi: 10.1046/j.1432-1327.1999.00807.x. PMID: 10518795.

Oliveira-Costa, J. et al. Prevalência de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais de um laboratório privado na Grande Belo Horizonte. *Semana de Iniciação Científica da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG*, 2006.

Oliveira FM, Horta BC, Prata LO, Santiago AF, Alves AC, Faria AM, Gomes MA, Caliarí MV. Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Infect Dis Rep*. 2012 Apr 27;4(2):e27. doi: 10.4081/idr.2012.e27. PMID: 24470941; PMCID: PMC3892629.

Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo DNA fragmentation which is not blocked by Bcl-2. *Exp Parasitol*. 1994 Nov;79(3):460-7. doi: 10.1006/expr.1994.1107. PMID: 7957763.

Ramos E, Olivos-García A, Nequiz M, Saavedra E, Tello E, Saralegui A, Montfort I, Pérez Tamayo R. *Entamoeba histolytica*: apoptosis induced in vitro by nitric oxide species. *Exp Parasitol*. 2007 Jul;116(3):257-65. doi: 10.1016/j.exppara.2007.01.011. Epub 2007 Jan 26. PMID: 17336295.

Ralston KS, Petri WA. The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays Biochem*. 2011;51:193-210. doi: 10.1042/bse0510193. PMID: 22023450.

Reed SL, Ember JA, Herdman DS, DiScipio RG, Hugli TE, Gigli I. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):266-74. PMID: 7602103.

Rigothier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Huerre M, Guillén N. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun.* 2002 Jun;70(6):3208-15. doi: 10.1128/IAI.70.6.3208-3215.2002. PMID: 12011016; PMCID: PMC128000.

Santi-Rocca J, Rigothier MC, Guillén N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2009 Jan;22(1):65-75, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00029-08. PMID: 19136434; PMCID: PMC2620641.

Santos, Fred Luciano Neves e Soares, Neci Matos Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2008, v. 44, n. 4 pp. 249-261. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000400004>.

Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amoebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alpha-dependent pathway of apoptosis. *Infect Immun.* 1998 Jun;66(6):2980-3. doi: 10.1128/IAI.66.6.2980-2983.1998. PMID: 9596776; PMCID: PMC108298.

Silva CAV, de Oliveira IMC, Cruz RE, Silva Prado GK, Santos FV, Neves NCV, Gomes MA, Silva Oliveira FM, Caliari MV. South American *Entamoeba* dispar strains produce amoebic liver abscesses with different pathogenicities and evolutionary kinetics. *Acta Trop.* 2021 Dec;224:106114. doi: 10.1016/j.actatropica.2021.106114. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34450059.

Souza, Camylla Santos De *et al.* Amebíase no contexto da emergência: análise do perfil de internações e morbimortalidade nos Estados brasileiros em 5 anos. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, v. 17, n. 85, p. 66–70, 2019. <https://www.sbcm.org.br/ojs3/index.php/rsbcm/issue/view/25>

Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet.* 2003 Mar 22;361(9362):1025-34. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12830-9. PMID: 12660071.

Trejos-suárez, Juanita; Castaño-Osorio, Jhon Carlos. Factores de virulencia del patógeno intestinal *Entamoeba histolytica*. *Infectio. Volume 13, Issue 2*, June 2009, Pages 100-110. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(09\)70731-3](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(09)70731-3)

Tsutsumi V, Mena-Lopez R, Anaya-Velazquez F, Martinez-Palomo A. Cellular bases of experimental amoebic liver abscess formation. *Am J Pathol.* 1984 Oct;117(1):81-91. PMID: 6385728; PMCID: PMC1900566.

Tsutsumi V, Shibayama M. Experimental amoebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res.* 2006 Feb;37(2):210-20. doi: 10.1016/j.arcmed.2005.09.011. PMID: 16380321.

Villalba-Magdaleno JD, Pérez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M. In vivo programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amoebic

liver abscess. *Microbiology (Reading)*. 2011 May;157(Pt 5):1489-1499. doi: 10.1099/mic.0.047183-0. Epub 2011 Feb 24. PMID: 21349978.

WHO/PAHO/UNESCO, 1997. Report of a consultation of experts on amoebiasis, in: *Weekly Epidemiological Report of the World Health Organisation*. pp. 97–99.

Winkelmann J, Leippe M, Bruhn H. A novel saposin-like protein of *Entamoeba histolytica* with membrane-fusogenic activity. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 May;147(1):85-94. doi: 10.1016/j.molbiopara.2006.01.010. Epub 2006 Feb 14. PMID: 16529828.

Yan L, Stanley SL Jr. Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun*. 2001 Dec;69(12):7911-4. doi: 10.1128/IAI.69.12.7911-7914.2001. PMID: 11705976; PMCID: PMC98890.