

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

Vivian Moura de Oliveira

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Escherichia coli* Nissle NA  
COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte – MG

2025

VIVIAN MOURA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Escherichia coli* Nissle NA  
COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Parasitologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Aparecida Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins

Belo Horizonte – MG

2025

043

Oliveira, Vivian Moura de.

Avaliação do potencial probiótico de *Escherichia coli* Nissle na colite amebiana experimental [manuscrito] / Vivian Moura de Oliveira. – 2025.  
115 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Aparecida Gomes. Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira. Coorientador: Prof. Dr. Flaviano dos Santos Martins.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Entamoeba histolytica. 3. Escherichia coli. 4. Probióticos. 5. Amebíase. I. Gomes, Maria Aparecida. II. Oliveira, Fabrício Marcus Silva. III. Martins, Flaviano dos Santos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**TÍTULO DA TESE:**

**"AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE ESCHERICHIA COLI NISSLE NA COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL"**

**ALUNO: VIVIAN MOURA DE OLIVEIRA**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROTOZOOLOGIA**

**TESE 377/2025/11**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e sete de agosto de 2025**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

**Helena Lúcia Carneiro Santos**

Membro externo - IOC/FIOCRUZ - RJ

**Ruth Elizabeth Cruz**

Membro externo - Anhanguera-Pitágoras-BH e Newton Paiva

**Adriana Oliveira Costa**

Membro interno - UFMG

**Marcelo Vidigal Caliar**

Membro interno - UFMG

**Flaviano dos Santos Martins**

Coorientador - UFMG

**Maria Aparecida Gomes**

Orientadora - UFMG

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Maria Aparecida Gomes, Servidor(a)**, em 27/08/2025, às 13:54, 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 **Adriana Oliveira Costa, Professora do Magistério Superior**, em 28/08/2025, às 16:12, 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 **Marcelo Vidigal Caliari, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 10:18, 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 **Ruth Elizabeth Cruz, Usuária Externa**, em 29/08/2025, às 10:59, 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 **Flaviano dos Santos Martins, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 12:38, 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 **Helena Lucia Carneiro Santos, Usuário Externo**, em 18/09/2025, às 12:16, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 4463448 e o código CRC B43B9947.

À minha filha, Indra Araujo Moura, sua presença ao longo desta jornada me deu forças para enfrentar os desafios e celebrar as conquistas. Cada sorriso seu é um lembrete constante da importância de nunca desistir e de que o amor e a determinação são as forças que nos sustentam nos momentos mais desafiadores.

## AGRADECIMENTO

À Deus primeiramente, meu modelo e guia.

À minha orientadora, Maria Aparecida Gomes, por sua orientação, paciência e apoio ao longo desta jornada. Sua dedicação, expertise e olhar cuidadoso foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Além de uma mentora acadêmica, você foi uma inspiração, sempre me desafiando a ultrapassar limites e a buscar excelência. Sou imensamente grato por todas as conversas, pela confiança depositada em mim e pelo incentivo constante, especialmente nos momentos mais desafiadores. Muito obrigado por acreditar neste projeto e em mim.

Ao meu coorientador, Fabrício Marcus Silva Oliveira, por suas valiosas contribuições durante esta jornada. Seu conhecimento, suas sugestões e sua disponibilidade foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por sempre oferecer perspectivas enriquecedoras e pela dedicação em compartilhar seu tempo e sua experiência. Sua orientação foi fundamental para aprimorar as ideias e superar os desafios ao longo do percurso.

Ao meu coorientador, Flaviano dos Santos Martins, agradeço pelo apoio e pela disposição em acompanhar este trabalho. Sua presença contribuiu para esta trajetória, e sua orientação agregou valor ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao técnico de laboratório, Orlando, por todo o auxílio nos momentos em que mais precisei. Seja na preparação de meios, no cuidado com os animais, no transporte dos animais para outros prédios, na busca de materiais em outros departamentos, seu apoio foi indispensável ao longo desta jornada.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, minha mais sincera gratidão. Seja com palavras de incentivo, auxílio prático ou compartilhando conhecimentos e experiências, cada contribuição foi fundamental para que este projeto se concretizasse.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho. O suporte proporcionado pelo CNPq foi fundamental para o desenvolvimento deste projeto, permitindo a realização das atividades de pesquisa e contribuindo para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, registro minha profunda gratidão pelo acolhimento e pelo suporte oferecido ao longo desta jornada acadêmica.

À minha família, meu mais profundo agradecimento pelo amor, paciência e apoio incondicional ao longo desta jornada. Vocês foram minha maior fonte de força e inspiração, tornando possível enfrentar os desafios com coragem e determinação. Agradeço por cada momento de compreensão, pelos sacrifícios feitos e por sempre estarem ao meu lado, celebrando as conquistas e dando suporte nos momentos difíceis. Este trabalho também é para vocês, que são e sempre serão minha maior motivação.

“Persiste e não desanimes, pois a vitória é construída com esforço contínuo e paciência. Não cultives o pessimismo nem te deixes vencer pelo medo ou pelos erros do caminho. Trabalha, edifica, perdoa, e não permitas que as dificuldades ou ofensas apaguem tua esperança. Reajusta tua visão quando necessário, busca aprender sempre, auxilia sem apego e mantém o hábito da oração para que a luz te guie. Com fé, amor e determinação, vencerás.”

(Emmanuel)

## RESUMO

*Entamoeba histolytica* é um protozoário entérico patogênico e constitui uma das principais causas de morbimortalidade em países subdesenvolvidos, configurando um grave problema de saúde pública. Esse parasito é o agente etiológico da amebíase intestinal, cuja manifestação clínica mais frequente é a colite, podendo evoluir para formas extraintestinais, como o abscesso hepático amebiano. O tratamento convencional baseia-se no uso do metronidazol (MTZ); entretanto, relatos clínicos têm apontado falhas terapêuticas e persistência da infecção mesmo após a intervenção farmacológica, o que evidencia a necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas. Neste estudo, investigamos o potencial da bactéria *Escherichia coli* Nissle como probiótico e alternativa terapêutica no combate à amebíase intestinal. Inicialmente, realizamos ensaios *in vitro*, os quais demonstraram que *E. coli* Nissle é capaz de induzir alterações morfológicas nos trofozoítos e inibir seu crescimento. Esse efeito inibitório tornou-se mais pronunciado após 18 horas de incubação com a concentração de  $10^9$  UFC/mL, sendo mediado principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), em especial o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Na etapa seguinte, conduzimos experimentos *in vivo* utilizando gerbils como modelo experimental de infecção por *E. histolytica*. A análise histopatológica revelou que a infecção provocou intenso infiltrado inflamatório na mucosa cecal. No entanto, no grupo infectado e tratado com *E. coli* Nissle, observou-se uma redução significativa do infiltrado inflamatório, bem como regeneração parcial da arquitetura tecidual. Por sua vez, os animais que receberam apenas o probiótico apresentaram mucosa cecal com características morfológicas semelhantes às do grupo controle não infectado, sem evidências de alterações significativas. A análise morfométrica da produção de muco indicou que a infecção por *E. histolytica* induziu um aumento na secreção de muco. Em contrapartida, o grupo tratado com *E. coli* Nissle exibiu redução na produção de muco, sugerindo que a presença da bactéria interfere na resposta mucosa associada à infecção. O grupo que recebeu apenas o probiótico não apresentou diferença significativa na produção de muco em relação ao controle. Coletivamente, os resultados obtidos nos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que *E. coli* Nissle possui potencial terapêutico promissor como agente probiótico adjuvante no tratamento da amebíase causada por *E. histolytica*.

Palavras-Chave: *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli* Nissle, Probiotico, Amebíase.

## ABSTRACT

*Entamoeba histolytica* is a pathogenic enteric protozoan and represents one of the leading causes of morbidity and mortality in developing countries, constituting a serious public health concern. This parasite is the etiological agent of amebiasis, whose most common clinical manifestation is colitis, which may progress to extraintestinal forms such as amebic liver abscess. Conventional treatment relies on the use of metronidazole (MTZ); however, clinical reports have documented therapeutic failures and persistence of infection even after pharmacological intervention, highlighting the urgent need for novel therapeutic approaches. In this study, we investigated the potential of the bacterium *Escherichia coli* Nissle as a probiotic and therapeutic alternative for combating intestinal amebiasis. Initially, we performed *in vitro* assays, which demonstrated that *E. coli* Nissle is capable of inducing morphological alterations in trophozoites and inhibiting their growth. This inhibitory effect became more pronounced after 18 hours of incubation with a concentration of  $10^9$  CFU/mL, being primarily mediated by the production of reactive oxygen species (ROS), particularly hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Subsequently, we conducted *in vivo* experiments using gerbils as an experimental model of *E. histolytica* infection. Histopathological analysis revealed that infection triggered a marked inflammatory infiltrate in the cecal mucosa. However, in the group infected and treated with *E. coli* Nissle, a significant reduction in inflammatory infiltration was observed, along with partial regeneration of tissue architecture. Conversely, animals that received only the probiotic displayed cecal mucosa with morphological features comparable to the uninfected control group, without evidence of significant alterations. Morphometric analysis of mucus production indicated that *E. histolytica* infection induced an increase in mucus secretion. In contrast, the group treated with *E. coli* Nissle exhibited a reduction in mucus production, suggesting that the presence of the bacterium modulates the mucosal response associated with infection. Meanwhile, the group that received only the probiotic showed no significant difference in mucus production compared with the control. Collectively, the results obtained from both *in vitro* and *in vivo* studies demonstrate that *E. coli* Nissle holds promising therapeutic potential as an adjuvant probiotic agent in the treatment of amebiasis caused by *E. histolytica*.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli* Nissle, Probiotic, Amebiasis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida do parasito <i>E. histolytica</i> .....	22
Figura 2. Infecção extraintestinal por <i>Entamoeba histolytica</i> , destacando o mecanismo de interação Gal/GalNAc na invasão da mucosa.....	24
Figura 3. Adesão do trofozoíto <i>Entamoeba histolytica</i> à membrana plasmática da célula hospedeira através de lectina Gal/GalNAc. ....	27
Figura 4. Mecanismos de ação utilizados pelo trofozoíto de <i>Entamoeba histolytica</i> para evasão do sistema imune.....	31
Figura 5. Mecanismos de ação das bactérias probióticas.....	39
Figura 6. Avaliação morfológica dos trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	56
Figura 7. Quantificação do número de células viáveis e da porcentagem de inibição do crescimento de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	57
Figura 8. Produção de ROS avaliada por fluorescência de DHE e DCF em trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> tratados com <i>Escherichia coli</i> Nissle. ....	58
Figura 9. Produção de ROS avaliada por fluorescência DCFH-DA em trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> tratados com <i>Escherichia coli</i> Nissle. ....	59
Figura 10. Ceco de Gerbils infectados com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i> e tratados ou não com <i>Escherichia coli</i> Nissle. ....	61
Figura 11. Análise do infiltrado inflamatório presente no ceco de Gerbils.....	62
Figura 12. Cortes histológicos do ceco de Gerbils corados com PAS.....	63
Figura 13. Análise morfométrica da área PAS+ no ceco de Gerbils infectados e tratados ou não com <i>Escherichia coli</i> Nissle.....	64
Figura 14. Avaliação da permeabilidade intestinal em gerbils nos diferentes grupos experimentais.....	65
Figura 15. Expressão relativa do mRNA de citocinas nos diferentes grupos tratados ou não com <i>Escherichia coli</i> Nissle.....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos de gerbils e procedimentos experimentais.....	50
Tabela 2. Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas obtidas em amostras do ceco de gerbils infectados com <i>E. histolytica</i> e tratados ou não com <i>Escherichia coli</i> Nissle. ....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

AHA – Abcesso Hepático Amebiano

ATP – Adenosina Trifosfato

DHE – Dihydroethidium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

*E. dispar* - *Entamoeba dispar*

*E. histolytica* - *Entamoeba histolytica*

EcN – *Escherichia coli* Nissle

Gal/GalNAC - Galactose e N-acetil galactosamina

H2-DCF-DA – dihydrodichloro-fluorescein diacetate

HE – Hematoxilina e Eosina

IEC – Células epiteliais intestinais

IFN- $\gamma$  – interferon gama

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL – interleucina

iNKT - Células Naturais Killer T invariante

LPS – Lipopolissacarídeo

MPO – Sistema Mieloperoxidase

MTZ – Metronidazol

MUC-2 - Mucina 2

NETs – Armadilhas extracelular de neutrófilos

NF- $\kappa$ B – Fator Nuclear kappa

NKT – Células Naturais Killer T

NKT Células Natural Killer

ON – Óxido Nítrico

PAMs – Peptídeos antimicrobianos

PAS - Ácido periódico de Schiff

PCR – Reação em cadeia da Polimerase

RNA – Ácido ribonucleico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SCFAs – Ácidos Graxos de Cadeia Curta

SNC – Sistema Nervoso Central

Th 2 - T *helper* tipo 2

Th1 - T *helper* tipo 1

TLR – Receptores Tool-like

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

Treg – Linfócitos T reguladores

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
1.1. Amebíase.....	18
1.2. Ciclo de vida e morfologia de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	21
1.3. Mecanismos de patogenicidade e virulência de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	26
1.4. Aspectos imunológicos de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	29
1.4.1. Resposta Imune Inata .....	30
1.4.2. Resposta Imune Adaptativa .....	32
1.5. Tratamento da amebíase .....	33
1.6. Probióticos e microbiota intestinal.....	35
1.7. Mecanismos de ação dos probióticos .....	38
1.8. <i>Escherichia coli</i> Nissle .....	41
1.8.1. Eficácia e segurança de <i>Escherichia coli</i> Nissle .....	42
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>44</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
3.1. Geral .....	45
3.2. Específicos.....	45
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
4.1. Cepa de <i>Entamoeba histolytica</i> e manutenção do parasito .....	46
4.2. Cepa de <i>Escherichia coli</i> Nissle.....	46
4.3. Associação <i>in vitro</i> parasito vs EcN .....	47
4.3.1. Avaliação da permeabilidade intestinal .....	48
4.3.2. Análise morfométrica dos trofozoítos .....	48
4.3.3. Avaliação da produção de EROs pela EcN associada com <i>E. histolytica</i> .....	49
4.4. Experimento <i>in vivo</i> .....	50
4.4.1. Inoculação de <i>E. histolytica</i> .....	51
4.4.2. Eutanásia, coleta de material .....	51
4.4.3. Análises histopatológicas .....	52
4.4.4. Extração de RNA.....	53
4.4.4.1. Amplificação do cDNA .....	54
4.4.4.2. Análise de reação em cadeia (RT-qPCR).....	54
4.5. Análise estatística .....	55

<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
5.1. Resultados <i>in vitro</i> .....	56
5.1.1. Eficácia da associação <i>in vitro</i> do probiótico com <i>E. histolytica</i> .....	56
5.1.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	57
5.2. Resultados <i>in vivo</i> .....	60
5.2.1. Análise histopatológica e morfometria das alterações presentes no ceco.....	60
5.2.2. Análise histopatológica e morfométrica da área de muco.....	62
5.2.4. Expressão de mRNA de Citocinas nos Grupos Experimentais .....	66
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>7. Conclusão</b> .....	<b>76</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>77</b>
<b>9. ANEXOS</b> .....	<b>93</b>
9.1. Artigos publicados .....	93
9.1.1. Probiotics as a Therapeutic alternative in amoebiasis. Where are we?.....	93
9.1.2. Amebicidal Activity of <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 Against <i>Entamoeba histolytica</i> .....	103
9.2. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	114

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Amebíase

Trofozoitos amebianos foram descritos pela primeira no ano de 1875 por Friedrich Lösch (1875, citado por Jackson, 1998), o qual descreveu o caso de um jovem agricultor internado em sua clínica, que apresentava disenteria crônica. Lösch identificou uma grande quantidade de amebas nas fezes do paciente e concluiu que elas eram responsáveis pela doença, inicialmente nomeando o organismo de *Amoeba coli*. Posteriormente, Schaudinn (1903, citado por Clark, 1998), ao observar sua notável capacidade de lise celular, renomeou-o como *Entamoeba histolytica* (GORMAN; CHADEE, 2019).

*E. histolytica* é um protozoário eucariótico unicelular, anaeróbico, pertencente ao gênero *Entamoeba* e à família Entamoebidae, sendo o agente etiológico da amebíase. Há diversas espécies de *Entamoeba* que colonizam a microbiota intestinal humana, porém não são consideradas patogênicas. Entre elas estão *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba chattoni*, *Dientamoeba fragilis*, *Iodamoeba butschlii* e *Endolimax nana* (DUDLOVÁ et al., 2018; SARD et al., 2011).

A amebíase pode ser assintomática ou manifestar-se por infecções graves, como colite amebiana e abscesso hepático amebiano, sendo este último a forma mais comum de amebíase extra-intestinal. Em países em desenvolvimento, a diarreia permanece como a terceira principal causa de morte em crianças menores de cinco anos (LOZANO et al., 2012), e a amebíase está entre as 15 principais causas (SHIRLEY et al., 2018). Tanto a colite amebiana quanto o abscesso hepático amebiano são condições potencialmente letais se não forem diagnosticadas e tratadas de forma adequada. Estima-se que o abscesso hepático amebiano ocorra em cerca de 2% a 5% dos casos sintomáticos de amebíase (ARELLANO-AGUILAR et al., 2017), sendo considerado um indicador importante da gravidade da doença em uma determinada região.

A amebíase apresenta distribuição mundial, mas é mais prevalente em países em desenvolvimento, especialmente em locais com infraestrutura inadequada para tratamento de água e uso de água contaminada para irrigação de alimentos. Apesar de ser uma infecção predominantemente humana, foram registrados casos em macacos, cães e porcos, embora esses animais não desempenhem papel significativo no ciclo epidemiológico da doença (FRADI *et al.*, 2017). O homem permanece como o principal mantenedor e disseminador da infecção (CARRERO *et al.*, 2020).

No Brasil, a prevalência e as manifestações da amebíase variam consideravelmente entre as regiões. Nas regiões Sul e Sudeste, a prevalência de *E. histolytica/dispar* varia entre 2,5% e 11%; Na Região Amazônica, chega a 19%; enquanto nas demais regiões é de aproximadamente 10%. Em Manaus, a taxa de infecção no grupo analisado é de cerca de 21,5%, e em Belém, 25,2% (SILVA *et al.*, 2005). Um estudo entre 2015–2021 apontou 9.508 internações por amebíase no SUS, com taxa de mortalidade de 1,15%. Apesar da redução de 71,5% no número de internações, a mortalidade subiu 71,3%. A região Norte apresentou a maior taxa de internação (21,37 por 100.000 hab.), enquanto o Sudeste teve a menor (0,76). A mortalidade foi maior entre mulheres (1,36%) e idosos, especialmente acima de 80 anos, com taxa de 7,84%. (DE CORDOVA; MELO, 2022).

Globalmente, ocorrem pelo menos 50 milhões de casos de infecção invasiva por *E. histolytica* anualmente, resultando em aproximadamente 100.000 mortes (XIMENEZ *et al.*, 2009; SETSHEDI; THOMSON, 2019). A prevalência varia entre 10% e 50% em todo o mundo, embora se acredite que esses números sejam subestimados, uma vez que infecções assintomáticas podem ser causadas tanto por *E. dispar* quanto por *E. histolytica*.

Na década de 1980, *Entamoeba dispar* foi reconhecida como espécie distinta de *E. histolytica*. Essa aceitação visou explicar o grande número de indivíduos assintomáticos em casos de amebíase, algo que desafiava a compreensão da doença até então. Apesar de serem morfologicamente idênticas ao microscópio, estudos têm demonstrado que *E. dispar* difere de *E. histolytica* em aspectos cruciais, principalmente no que diz respeito às moléculas associadas à virulência como por exemplo *E. histolytica* tem maior número e expressão de genes de cisteína proteases ajudando na lise tecidual (COSTA *et al.*, 2010; KONIG *et al.*, 2021). Os

genes que codificam essas moléculas podem estar ausentes, sofrer modificações ou apresentar menor amplificação na variante menos virulenta (*E. dispar*), o que explica sua incapacidade de causar infecções invasivas de forma semelhante à *E. histolytica* (FERNANDES *et al.*, 2014; FREITAS *et al.*, 2009).

Essa distinção trouxe implicações importantes, tanto para a epidemiologia quanto para o tratamento da amebíase. Com a identificação de *E. dispar* como espécie não patogênica, tornou-se evidente que não se pode estimar com precisão a prevalência de *E. histolytica* sem técnicas de diagnóstico molecular específicas. Além disso, a abordagem terapêutica foi impactada, especialmente em casos assintomáticos. Nesses casos, o tratamento com imidazólicos, como o metronidazol, não é recomendado, uma vez que esses fármacos são menos eficazes para erradicar organismos no lúmen intestinal.

A infecção assintomática por *E. histolytica* requer o uso exclusivo de agentes luminiais, devido à preocupação com o risco de progressão para a forma ativa da doença e aos potenciais consequências para a saúde pública. Embora o metronidazol seja amplamente utilizado, ele não deve ser administrado isoladamente em infecções assintomáticas, pois apresenta falhas na erradicação completa dos parasitas no lúmen intestinal (NELSON, 2018). A Paromomicina é considerada a primeira escolha para erradicar cistos em infecção assintomática (SHIRLEY *et al.*, 2018). Por outro lado, em infecções sintomáticas, especialmente aquelas em que o parasita invade a mucosa e submucosa intestinal, os imidazólicos, como o metronidazol, continuam sendo a primeira linha de tratamento devido à sua ampla distribuição nos tecidos e eficácia na eliminação das amebas.

Apesar de sua eficácia, os imidazólicos, incluindo o metronidazol, apresentam limitações associadas a seus efeitos adversos, que podem levar à interrupção precoce do tratamento. Esse cenário é preocupante, pois a descontinuação da terapia pode resultar na persistência da infecção, agravamento do quadro clínico e potencial desenvolvimento de resistência medicamentosa.

Nos casos mais graves de amebíase, como a forma invasiva, o tratamento exige uma abordagem combinada, utilizando metronidazol ou tinidazol em associação com um agente luminal, como o furoato de diloxanida, paromomicina ou diiodo-hidroxiquina. Essa estratégia é necessária porque os imidazólicos isoladamente não eliminam a colonização intestinal em até 50% dos pacientes, o

que os deixa suscetíveis a recidivas meses após o término do tratamento (HAMANO, 2017). Assim, a combinação terapêutica não apenas aumenta a eficácia do tratamento, mas também reduz o risco de complicações futuras e de falha terapêutica.

Portanto, a diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* não é apenas uma questão de classificação taxonômica, mas um avanço crucial que molda a forma como entendemos, diagnosticamos e tratamos a amebíase, garantindo maior precisão na abordagem clínica e melhores desfechos para os pacientes.

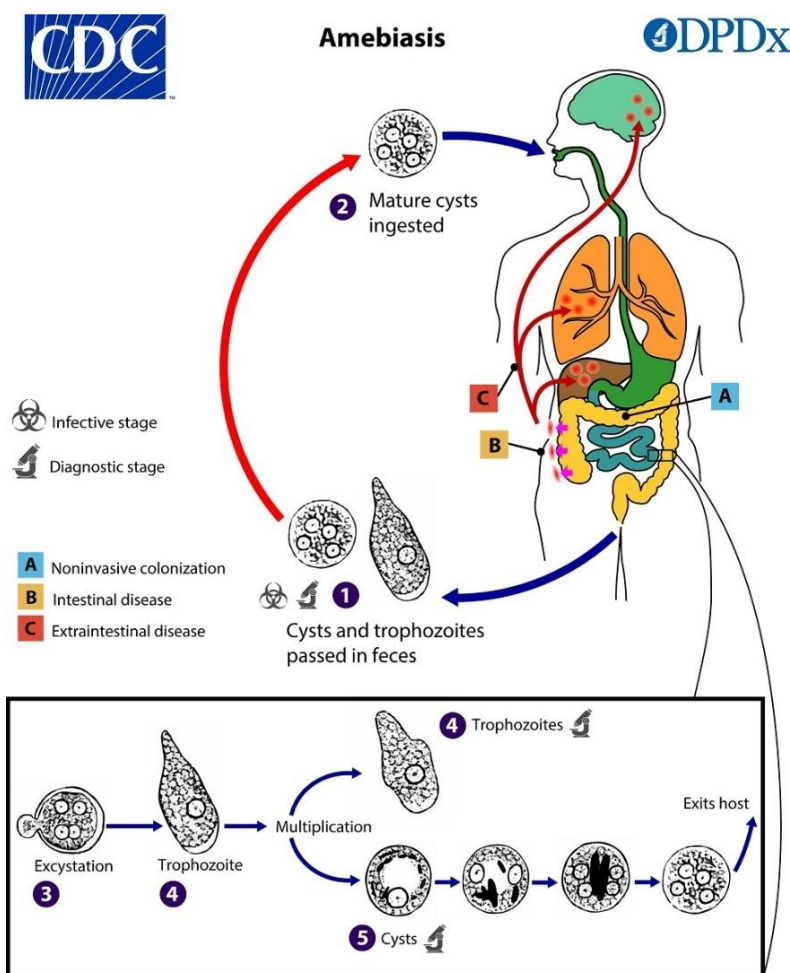
## **1.2. Ciclo de vida e morfologia de *Entamoeba histolytica***

O ciclo de vida de *E. histolytica* é relativamente simples, apresentando dois estágios principais: o cisto dormente e o trofozoíto, que corresponde à forma vegetativa ativa (Figura 1). Os cistos maduros representam a forma infecciosa do parasita e são eliminados juntos as fezes. Eles são altamente resistentes às condições ambientais, permitindo sua sobrevivência fora do corpo humano e facilitando a transmissão fecal-oral. Após a ingestão de alimentos ou água contaminados com cistos maduros, estes chegam ao trato gastrointestinal, onde sofrem desencistamento no ambiente do intestino delgado, liberando trofozoítos (FAUST; GUILLEN, 2012).

Os trofozoítos são a forma ativa e invasiva do parasita, responsáveis pelos danos teciduais associados à amebíase. Eles colonizam o intestino grosso, onde podem permanecer livres na luz intestinal ou aderir à mucosa, promovendo inflamação local e, em casos mais graves, invasão tecidual. Ocasionalmente, os trofozoítos são eliminados em fezes diarreicas, mas, diferentemente dos cistos, eles não sobrevivem por longos períodos fora do hospedeiro. A capacidade de diferenciação entre os estágios de cisto e trofozoíto é fundamental para o sucesso do ciclo de vida do parasita e para sua disseminação no ambiente, o que contribui para a perpetuação da amebíase em regiões com condições sanitárias inadequadas (NAGARAJA; ANKRI, 2019).

Após serem ingeridos por meio de alimentos ou água contaminados com fezes contendo cistos infecciosos de *E. histolytica*, estes atravessam o ambiente hostil do estômago e chegam ao íleo terminal, onde ocorre o desencistamento. Nesse processo, os cistos liberam trofozoítos, que, amadurecidos, colonizam o

intestino grosso. No cólon, os trofozoítos aderem às mucinas presentes na barreira epitelial e alimentam-se de bactérias da microbiota intestinal, desempenhando inicialmente um papel comensal (HUSTON; HAQUE; PETRI, 1999; FAUST; GUILLEN, 2012).



**Figura 1.** Ciclo de vida do parasito *E. histolytica*. Os Cistos e trofozoítos são eliminados nas fezes (1). Os cistos são normalmente encontrados nas fezes formadas, enquanto os trofozoítos são normalmente encontrados nas fezes diarreicas. A infecção por *Entamoeba histolytica* (e *E. dispar*) ocorre através da ingestão de cistos maduros (2) de alimentos, água ou mãos contaminadas com fezes. Também pode ocorrer exposição a cistos infecciosos e trofozoítos na matéria fecal durante o contato sexual. O desencistamento (3) ocorre no intestino delgado e nos trofozoítos (4) são liberados, que migram para o intestino grosso. Os trofozoítos podem permanecer confinados ao lúmen intestinal (A: infecção não invasiva) e os indivíduos continuam a eliminar cistos nas fezes (portadores assintomáticos). Os trofozoítos podem invadir a mucosa intestinal (B: doença intestinal) ou vasos sanguíneos, atingindo locais extraintestinais como fígado, cérebro e pulmões (C: doença extraintestinal). Os trofozoítos se multiplicam por fissão binária e produzem cistos (5), e ambos os estágios são eliminados nas fezes (1). Os cistos podem sobreviver de dias a semanas no ambiente externo e permanecer 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.

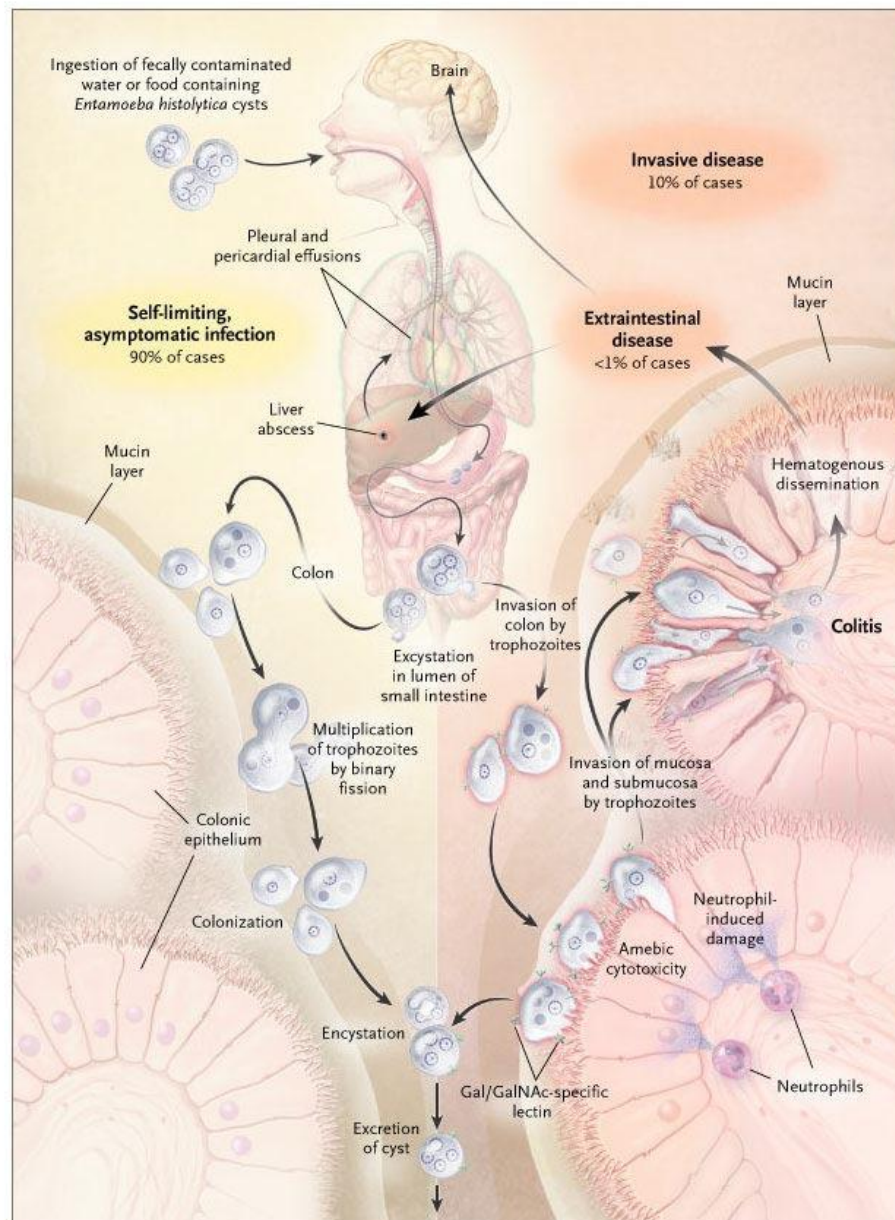
Fonte: <https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>

No entanto, sob determinadas condições, esses trofozoítos tornam-se invasivos, passando a degradar a barreira mucosa e epitelial. Esse comportamento resulta na destruição de células hospedeiras, superprodução de muco e ativação de uma resposta inflamatória que culmina em disenteria. Durante essa fase, as populações de trofozoítos podem alcançar densidades elevadas e formar agregados. Esse agrupamento de parasitas é associado ao início do processo de encistamento, marcando a transição do crescimento exponencial para a formação de cistos (SCHAAP; SCHILDE, 2018).

Em casos mais graves, os trofozoítos podem atravessar a barreira intestinal e acessar a corrente sanguínea, alcançando a veia porta e migrando para o fígado, onde podem formar abscessos hepáticos, a principal manifestação extraintestinal da doença. Em situações raras, os trofozoítos podem disseminar-se para outros órgãos, como pulmões e cérebro, especialmente em pacientes imunocomprometidos, resultando em infecções potencialmente fatais (CARRERO *et al.*, 2020).

Diferentemente de muitos outros parasitas, *E. histolytica* não depende de vetores para sua transmissão. O ciclo de vida do parasita é perpetuado por meio da disseminação fecal-oral, que os cistos são excretados nas fezes e podem contaminar alimentos, água e superfícies. Adicionalmente, a transmissão por contato direto, como práticas orogenitais e oroanais, também foi relatada, principalmente entre indivíduos com higiene inadequada e em populações específicas, como homens que fazem sexo com homens (Figura 2) (HUNG *et al.*, 2008).

No ciclo de vida de *E. histolytica*, o parasita assume diferentes formas: trofozoítos, pré-cistos, cistos, metacistos e trofozoítos metacísticos. O trofozoíto, com dimensões variando de 10 a 60  $\mu\text{m}$ , possui citoplasma granular e um núcleo esférico, caracterizado por cromatina agregada na membrana nuclear e um cariossomo centralizado. Essa é a forma ativa do parasita, que se movimenta, alimenta e se divide. As amebas são organismos anaeróbios obrigatórios, desprovidos de mitocôndrias (SHIRLEY *et al.*, 2018).



**Figura 2.** Infecção extraintestinal por *Entamoeba histolytica*, destacando o mecanismo de interação Gal/GalNAc na invasão da mucosa. A infecção normalmente é iniciada pela ingestão de água contaminada com fezes ou alimentos contendo cistos de *E. histolytica*. A forma cística infecciosa do parasita sobrevive à passagem pelo estômago e intestino delgado. O desencistamento ocorre no lúmen intestinal, onde se formam trofozoítos móveis e potencialmente invasivos. Na maioria das infecções, os trofozoítos agregam-se na camada de mucina intestinal e formam novos cistos, resultando em infecção autolimitada e assintomática. Em alguns casos, entretanto, a adesão e a lise do epitélio colônico, mediada pela galactose e *N*-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) – lectina específica, inicia a invasão do cólon por trofozoítos. Os neutrófilos que respondem à invasão contribuem para o dano celular no local da invasão. Uma vez que o epitélio intestinal é invadido, pode ocorrer disseminação extraintestinal para o peritônio, fígado e outros locais. Os fatores que controlam a invasão, em oposição ao encistamento, provavelmente incluem o “quorum sensing” do parasita sinalizado pela lectina específica de Gal/GalNAc, interações de amebas com a microbiota bacteriana do intestino e respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro.

Fonte: Haque et al., 2003.

A atividade patogênica dos trofozoítos é evidente em sua capacidade de fagocitar hemácias, comportamento exclusivo das amebas patogênicas. As formas não patogênicas limitam-se a consumir bactérias da microbiota e outros componentes do conteúdo intestinal. Quando presentes em fezes diarreicas frescas, os trofozoítos exibem movimento ativo, deslocando-se por meio de pseudópodes, projeções digitiformes do ectoplasma que direcionam o citoplasma e impulsionam o corpo celular na direção do movimento (SHIRLEY *et al.*, 2018).

Essa dinâmica complexa entre as formas comensais e invasivas do parasita, bem como sua capacidade de adaptação ao ambiente intestinal e de sobrevivência fora do hospedeiro, é fundamental para a disseminação e manutenção do ciclo de vida de *E. histolytica*.

O encistamento de *E. histolytica* é um processo adaptativo essencial para sua sobrevivência fora do hospedeiro e continuidade do ciclo de vida. Esse processo ocorre predominantemente no ambiente complexo do cólon humano, onde os trofozoítos se proliferam ativamente. Durante o encistamento, destacam-se quatro características principais: aquisição de uma forma esférica, resistência a detergentes, acúmulo de quitina na parede celular e tetranucleação. Esses eventos ocorrem simultaneamente às condições que promovem a proliferação de trofozoítos no cólon (GUILLÉN, 2022).

Inicialmente, os trofozoítos passam por modificações estruturais e funcionais para se transformar em pré-cistos. Estes apresentam corpos cromatóides, coleções de ribossomos em forma de charuto, e vacúolos alimentares ricos em glicogênio. À medida que o processo de encistamento avança, essas estruturas são progressivamente eliminadas, e a célula encolhe, dando origem ao cisto maduro. Durante a maturação, o núcleo do cisto realiza duas divisões mitóticas, resultando em uma forma tetranucleada (SHIRLEY *et al.*, 2018; GUILLÉN, 2022).

Os cistos maduros de *E. histolytica* apresentam forma redonda, medindo aproximadamente 10–15 µm de diâmetro, e são envoltos por uma parede quitinosa que confere resistência a condições adversas, como a acidez gástrica. Internamente, os cistos contêm quatro núcleos, depósitos de glicogênio e corpos cromatóides, os quais desempenham funções essenciais no ciclo de vida do parasita. Esses cistos são eliminados nas fezes, podendo sobreviver no ambiente

externo por longos períodos, o que facilita sua transmissão fecal-oral (STANLEY, 2003).

Microscopicamente, os cistos exibem características distintas. Quando observados em preparações simples ao microscópio óptico, aparecem como pequenas esferas hialinas ou levemente amareladas, com uma parede delgada e refringente. Em preparações com colorações específicas, como hematoxilina férrica, observa-se um contorno duplo bem delineado, que auxilia na identificação dessa estrutura.

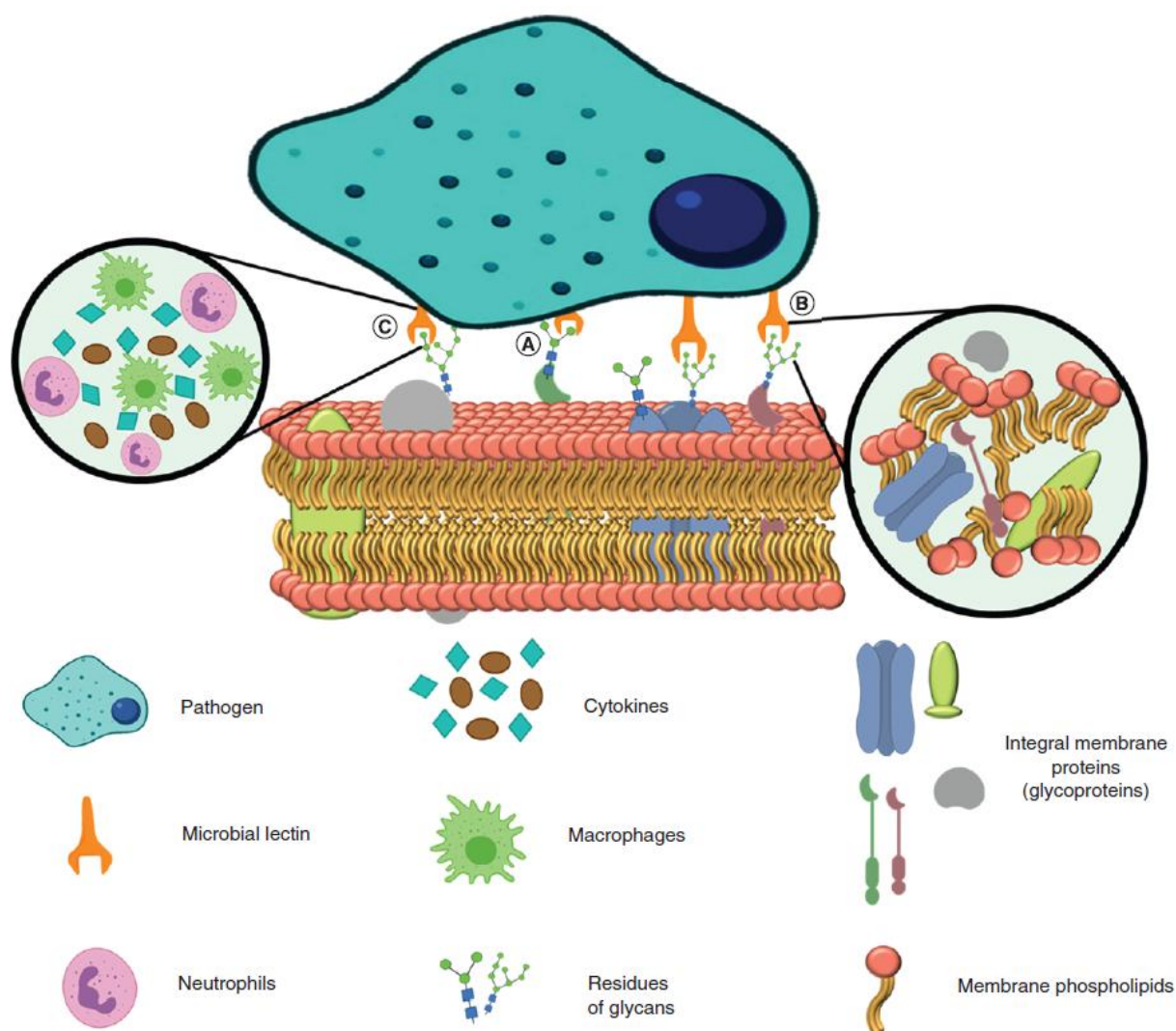
Esse processo de encistamento desempenha um papel crucial na perpetuação do ciclo de vida do parasita, garantindo sua sobrevivência em ambientes hostis e permitindo que ele resista às condições do trato gastrointestinal do novo hospedeiro. Além disso, a robustez dos cistos e sua capacidade de transmissão são fatores determinantes para a disseminação da amebíase, especialmente em regiões com condições sanitárias inadequadas.

### **1.3. Mecanismos de patogenicidade e virulência de *Entamoeba histolytica***

Quando *E. histolytica* infecta um indivíduo saudável com a barreira intestinal íntegra, as amebas inicialmente se instalam na camada externa de muco, sem atingir diretamente o epitélio intestinal. Esse muco desempenha um papel crucial na manutenção do equilíbrio entre o microbioma intestinal e potenciais patógenos, agindo como uma barreira física e funcional. Essa camada é um ambiente dinâmico onde microorganismos competem por locais de ligação, desempenhando uma função protetora essencial contra infecções (PELASEYED *et al.*, 2014; SPERANDIO *et al.*, 2015).

A adesão inicial de *E. histolytica* à camada de muco é mediada por uma lectina de superfície, específica para oligossacarídeos de galactose (Gal) e N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), que se ligam às mucinas, componentes estruturais do muco (Figura 3) (GUZMÁN-TÉLLEZ *et al.*, 2019; BIRCHENOUGH *et al.*, 2015). Durante a infecção inicial, observa-se o espessamento da camada mucosa, que representa uma resposta protetora do hospedeiro para impedir que o patógeno alcance o epitélio. Contudo, as amebas produzem glicosidases e proteinases que degradam a mucina, expondo as células epiteliais intestinais (LIDELL *et al.*, 2006; MONCADA *et al.*, 2005). Na ausência dessa camada de proteção, a lectina

Gal/GalNAc da ameba liga-se diretamente às células epiteliais intestinais (IECs), desencadeando o início da infecção invasiva.



**Figura 3.** Adesão do trofozoíto *Entamoeba histolytica* à membrana plasmática da célula hospedeira através de lectina Gal/GalNAc. (A) As lectinas dos protozoários são glicoproteínas com alto nível de especificidade de associação a carboidratos. Essa ligação permite o reconhecimento da célula hospedeira e a adesão do microrganismo à superfície da célula-alvo. (B) Quando a ligação da lectina é estabelecida do patógeno à célula-alvo, diversos mecanismos de patogenicidade dos microrganismos são acionados, levando a danos importantes ao tecido. (C) A interação das lectinas microbianas com a superfície celular ativa uma resposta imune na tentativa de eliminar o parasito.

Fonte: <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0275>

A progressão da doença está associada a uma série de eventos patológicos, como a perda de mucina, destruição das células epiteliais, infiltração de neutrófilos e rompimento das junções intercelulares. Esses danos resultam em comprometimento do transporte iônico intestinal, o que contribui para a ocorrência de diarreia. Estudos demonstram que em modelos de camundongos deficientes em mucina, *E. histolytica* liga-se diretamente às células epiteliais, causando maior lesão, ruptura da barreira epitelial e indução de respostas pró-inflamatórias (KISSOON-SINGH *et al.*, 2013). A progressão para estágios avançados pode resultar em úlceras características em forma de frasco, contendo trofozoítos e células inflamatórias. A partir dessas úlceras, os trofozoítos podem invadir vasos sanguíneos sanguínea, frequentemente disseminando-se para o fígado e causando abscessos hepáticos (HAQUE *et al.*, 2003).

A virulência de um determinado isolado depende das propriedades intrínsecas dos trofozoítos, das condições de crescimento e do sistema de teste utilizado para avaliar sua patogenicidade *in vivo* ou *in vitro*. A virulência tem sido estudada principalmente cultivando *E. histolytica* patogênica em meio axênico de Diamond e testando a capacidade das amebas de induzir abscessos quando injetadas diretamente no fígado de hamsters recém-nascidos ou de um a dois meses de idade (GITLER; MIRELMAN, 1986). Sob essas condições, as amebas possuem de baixa a moderadamente virulência. As amebas podem apresentar virulência aumentada que, em passagem prévia pelo hospedeiro animal, pode ser bastante significativa. Assim, o termo altamente virulento é reservado para amebas que foram recentemente isoladas do hospedeiro ou que foram mantidas em condições que preservam a virulência original. Um modelo animal que se aproxime mais das condições de crescimento e infectividade no intestino e uma metodologia para obtenção de cistos de *E. histolytica* dissipariam grande parte da incerteza dos atuais estudos (GITLER; MIRELMAN, 1986).

Por muitos anos foi sugerido que as amebas patogênicas usam três fatores de virulência principais; lectina Gal/GalNAc, amebaporo e cisteína proteases, que estão envolvidas na adesão, imunoevasão, colonização e invasão, muitas vezes responsáveis por causar as lesões (RAMOS-MARTÍNEZ, 2009; IRMER *et al.*, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2008). A fim de se estabelecer e sobreviver no ambiente intestinal, as amebas são capazes de realizar várias atividades biológicas celulares

diferentes. Essas atividades que foram determinadas em nível experimental incluem: adesão, efeitos citopáticos, atividade citotóxica, indução de apoptose, eritrofagocitose, atividade hemolítica, lise celular, morte celular dependente de contato, digestão intracelular de células, resistência ao complemento e produção de lesões experimentais em animais no intestino grosso ou no fígado (FRADE et al., 2017; BAXT et al., 2010; BILLER et al., 2009; MIRELMAN et al., 2008).

Fatores ambientais e características do hospedeiro, como o estado nutricional, o microbioma intestinal e a resposta imunológica, também influenciam diretamente a virulência amebiana e os desfechos clínicos. Variáveis como resistência genética ou suscetibilidade à infecção desempenham papéis importantes na progressão da doença (LEJEUNE et al., 2009). Mudanças nas condições de cultivo in vitro ou passagem pelo hospedeiro animal podem alterar significativamente os fatores de virulência e a patogenicidade da ameba (MENDOZA-MACÍAS et al., 2009).

Por fim, ao enfrentar os mecanismos de defesa inespecíficos do hospedeiro, *E. histolytica* adapta-se a condições adversas, como o estresse oxidativo e a disponibilidade variável de nutrientes. Sua alta plasticidade metabólica e capacidade de resistência às espécies reativas de oxigênio garantem sua sobrevivência. Assim, a combinação de determinantes de virulência e estratégias adaptativas oferece ao parasita uma vantagem significativa, frequentemente em detrimento do hospedeiro, promovendo o desenvolvimento da doença (LORENZI et al., 2010; OLIVOS-GARCÍA et al., 2009).

#### **1.4. Aspectos imunológicos de *Entamoeba histolytica***

Após o contato inicial com a ameba e a subsequente invasão do epitélio intestinal, o hospedeiro ativa uma série de respostas imunes para se defender contra o parasita. Essas respostas envolvem a ativação de diferentes células do sistema imunológico, como macrófagos, neutrófilos e linfócitos, além da liberação de citocinas inflamatórias, com o objetivo de reconhecer e eliminar *E. histolytica* (Figura 4). No entanto, a ameba desenvolveu diversos mecanismos de evasão imunológica, que lhe permitem resistir a essas respostas do hospedeiro e continuar sua sobrevivência e patogênese. Esses mecanismos são fundamentais para que o

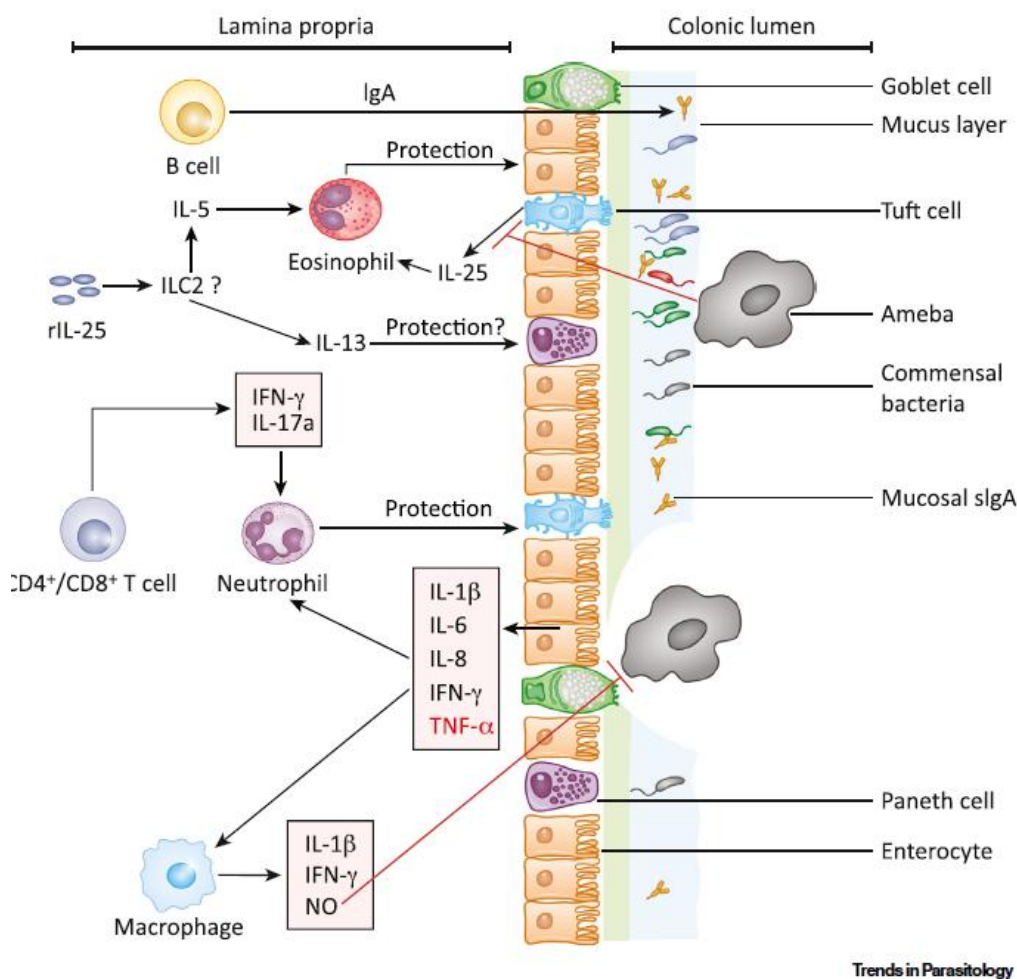
parasita consiga persistir no organismo, mesmo diante da defesa imunológica do hospedeiro.

#### 1.4.1. Resposta Imune Inata

Inicialmente, quando as amebas invasoras entram em contato com o organismo, elas enfrentam as defesas imunes inatas do hospedeiro. No estômago, o ácido gástrico é um agente antimicrobiano eficaz, mas os cistos de *E. histolytica* são notavelmente resistentes a ele. No intestino, uma espessa camada de muco protege as células epiteliais intestinais. As mucinas, especialmente a MUC2, formam um gel protetor que reveste o epitélio intestinal. Trofozoítos de *E. histolytica* conseguem degradar essas mucinas por meio de cisteína proteinases, facilitando sua penetração no epitélio (LI et al., 2021). Esse processo representa um dos primeiros eventos de evasão do sistema de barreira mucosa.

As células NKT, especialmente as células T invariantes (iNKT), ligam-se a glicolipídeos do parasita via moléculas CD1d e produzem IFN- $\gamma$ . Também exercem citotoxicidade contra células infectadas e ajudam a regular a inflamação em abscessos hepáticos (LOTTER et al., 2009; ADB et al., 2010). Além disso, *E. histolytica* utiliza mecanismos de evasão como a degradação de anticorpos e citocinas, a inibição de IL-12 e IL-18 e a indução de IL-10 por Treg, dificultando a resposta protetora do hospedeiro (LOTTER et al., 2009).

Entretanto, uma vez que as amebas alcançam o epitélio, as células epiteliais do intestino têm a capacidade de detectar a lectina Gal/GalNAc da ameba através dos receptores Toll-like (TLR)-2 e TLR-4 (MOONAH et al., 2013; GALVÁN-MOROYOQUI et al., 2011). O envolvimento desses TLRs resulta na ativação de NF- $\kappa$ B, o que desencadeia a produção de diversas citocinas inflamatórias, como interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). Essas citocinas, por sua vez, promovem a inflamação e regulam as funções das células imunes do hospedeiro, intensificando a resposta imunológica contra o parasita (GUO et al., 2007; SHARMA et al., 2008).



**Figura 4.** Mecanismos de ação utilizados pelo trofozoíto de *Entamoeba histolytica* para evasão do sistema imune. A camada epitelial é coberta por uma película de muco bicamada. A camada externa de muco contém microbiota comensal e IgA solúvel. A camada de muco, combinada com a microbiota comensal e a IgA, atua como a primeira linha de defesa contra a infecção amebiana. A ameba pode destruir a camada de muco usando cisteína proteases e se ligar às células epiteliais pela lectina de superfície Gal/GalNAc. Uma vez ligadas, as amebas podem danificar a camada epitelial e iniciar uma resposta inflamatória robusta como a produção de interleucina IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). A citocina TNF- $\alpha$  de cor vermelha induz a progressão da doença. Citocinas e quimiocinas inflamatórias recrutam células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos. Ao liberar espécies reativas de oxigênio (ERO), óxido nítrico (NO) e citocinas inflamatórias, os neutrófilos e macrófagos tentam eliminar os trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. As células do tufo intestinal são conhecidas por serem a principal fonte de IL-25. A infecção amebiana pode reduzir a produção de IL-25. O tratamento com IL-25 recombinante exógena pode proteger por meio da indução de uma resposta imune do T helper do tipo 2 seguida de secreção de eosinófilos. A exposição à infecção primária pode induzir a produção de IgA no muco, específico para a ameba (pelas células B), IFN- $\gamma$  e IL-17A (pelas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), na tentativa de proteger contra infecções amebianas subsequentes.

Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.09.015>

Durante a invasão dos tecidos pelos trofozoítos de *E. histolytica*, observa-se uma forte reação inflamatória tanto no intestino quanto em outros órgãos, como o fígado. Os neutrófilos, que são os leucócitos mais abundantes no sangue, migram rapidamente para os locais de infecção e desempenham uma série de funções antimicrobianas. Entre essas funções estão a fagocitose, a degranulação, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a formação de NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos). A presença de neutrófilos ao redor das amebas sugere que esses leucócitos desempenham um papel ativo na tentativa de controlar a infecção amebiana (ROSALES; URIBE-QUEROL, 2017; CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2016; MAYADAS et al., 2014; NAUSEEF; BORREGAARD, 2014; RAMOS-MARTÍNEZ et al., 2009).

Um dos principais mecanismos de defesa dos neutrófilos contra patógenos é o sistema mieloperoxidase (MPO), que produz moléculas altamente oxidativas, como o ácido hipocloroso. A MPO pode se ligar à superfície das amebas, promovendo alterações que levam à morte do parasita. Trofozoítos de *E. histolytica* também induzem a liberação de NETs, que capturam os parasitas e reduzem sua motilidade (DÍAZ-GODÍNEZ; CARRERO, 2019; CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Além dos neutrófilos, os macrófagos desempenham um papel central ao reconhecer *E. histolytica* por TLR-2 e TLR-4 e produzir citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12). Macrófagos ativados tentam inibir os trofozoítos das amebas por meio da liberação de óxido nítrico (ON), cuja produção depende da ação do IFN- $\gamma$ . No entanto, as amebas liberam fatores que inibem a produção de ON e expressam arginase para desviar o substrato L-arginina, reduzindo a ação do óxido nítrico (MORTIMER; CHADEE, 2010; RAMOS et al., 2007).

#### **1.4.2. Resposta Imune Adaptativa**

Os linfócitos T e B são cruciais na tentativa de conter a infecção e regular a inflamação. A subpopulação Th1 é a principal responsável pela proteção, por meio da produção de IFN- $\gamma$ , que ativa macrófagos. Os linfócitos Th2 favorecem a produção de anticorpos, mas são menos eficazes na eliminação do parasita. Os linfócitos T reguladores (Treg) suprimem a atividade Th1, podendo ser explorados

pela ameba para evadir o sistema imune (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016; BEGUM et al., 2015).

A resposta imune humoral desempenha um papel relevante como a segunda linha de defesa contra *E. histolytica*. No contexto do sistema imunológico intestinal, as imunoglobulinas da mucosa representam o principal mecanismo de proteção. Durante a infecção, indivíduos expostos a *E. histolytica* podem desenvolver anticorpos específicos da classe IgG. No entanto, esses anticorpos, apesar de serem detectáveis, frequentemente não são eficazes na prevenção de amebíase invasiva ou de infecções recorrentes. A eficácia dessa resposta parece depender da subclasse específica de IgG gerada em resposta ao parasita, indicando que nem todas as subclasses exercem funções protetoras (MARIE; WILLIAM, 2014).

Em contraste, a imunoglobulina A (IgA), predominante no lúmen intestinal, apresenta uma função protetora mais robusta contra a colonização por trofozoítos. Estudos demonstram que anticorpos IgA específicos contra a lectina Gal/GalNAc são capazes de reduzir significativamente a colonização das amebas no cólon (HAQUE et al., 2006). Evidências adicionais foram observadas em pacientes que se recuperaram de abscessos hepáticos amebianos (AHA), nos quais um aumento nos níveis de anticorpos IgA anti-Gal/GalNAc foi associado à eliminação de infecções subsequentes (ABD-ALLA et al., 2006; RAVDIN et al., 2003).

Apesar da relevância da IgA na proteção contra *E. histolytica*, o parasita dispõe de mecanismos que interferem na resposta imune humoral, destacando-se as cisteína proteinases. Essas enzimas secretadas pelas amebas degradam IgA e IgG, comprometendo sua eficácia (GARCIA-NIETO et al., 2008).

### **1.5. Tratamento da amebíase**

A amebíase é tratada com medicamentos amebicidas, cuja escolha depende da gravidade e extensão da infecção. Esses fármacos atuam em dois níveis principais: no nível luminal, onde agem no lúmen intestinal para tratar casos de colite amebiana não disentérica, e no nível sistêmico, onde são absorvidos pelo sangue e exercem efeito nos tecidos. Alguns medicamentos possuem ação tanto no lúmen quanto nos tecidos e na amebíase extraintestinal, ampliando sua aplicação terapêutica. Diversos fármacos são empregados no manejo da amebíase, incluindo

teclozan, paromomicina, iodoquinol, metronidazol e tinidazol (MARTINEZ-CASTILLO *et al.*, 2018). Uma lista detalhada com informações sobre os medicamentos, utilizados para tratar a amebíase intestinal está detalhada no apêndice 1.

Historicamente, a emetina foi o primeiro composto a demonstrar atividade amebicida, em 1912, mas seu uso é atualmente limitado devido à alta toxicidade (UPCROFT; UPCROFT, 2001). Nos anos 1950, a introdução de fármacos nitroheterocíclicos marcou um avanço significativo no tratamento de infecções causadas por protozoários e bactérias (BUSATTI *et al.*, 2006). Entre esses medicamentos, o metronidazol (MTZ) se consolidou como a principal escolha terapêutica no tratamento da amebíase.

A descoberta do MTZ ocorreu de forma indireta, quando pesquisadores da empresa Rhône-Poulenc, na França, buscavam desenvolver um fármaco eficaz contra a tricomoníase, causada por *Trichomonas vaginalis*. Durante os testes, observou-se que o metronidazol também apresentava atividade contra protozoários anaeróbios como *E. histolytica* e *Giardia lamblia*, o que expandiu rapidamente seu uso clínico (PETRI *et al.*, 2005).

Embora o metronidazol seja amplamente utilizado e considerado seguro, ele pode causar efeitos colaterais como náusea, dor abdominal, gosto metálico, diarreia, entre outros. Casos raros, porém, graves, de neurotoxicidade, incluindo neuropatia óptica, neuropatia periférica e encefalopatia, também foram relatados, embora os mecanismos envolvidos não estejam completamente esclarecidos (CERUELOS *et al.*, 2019). Esses efeitos colaterais são causas frequentes de interrupção do tratamento, o que pode levar ao agravamento da doença, à continuidade da transmissão e ao aumento da resistência do parasita.

Diante dessas limitações, a busca por alternativas terapêuticas com maior segurança, eficácia e menor potencial para efeitos adversos e resistência se torna crucial. Nesse contexto, os probióticos surgem como uma alternativa promissora, com potencial aplicação curativa ou profilática no manejo da amebíase.

## 1.6. Probióticos e microbiota intestinal

Há mais de um século, Elie Metchnikoff propôs que as bactérias do ácido láctico poderiam trazer benefícios à saúde, promovendo maior longevidade. Ele sugeriu que a "autointoxicação intestinal" e o envelhecimento associado poderiam ser prevenidos ao modificar a microbiota intestinal, substituindo micróbios proteolíticos por bactérias benéficas. Em suas investigações, Metchnikoff desenvolveu uma dieta baseada em leite fermentado com uma bactéria que ele denominou "bacilo búlgaro" (CREMON *et al.*, 2018).

De forma complementar, Henry Tissier foi pioneiro na aplicação terapêutica de bactérias bífidas para tratar distúrbios intestinais. Ele acreditava que essas bactérias tinham a capacidade de desalojar microrganismos putrefativos, frequentemente associados a problemas gastrointestinais, ao mesmo tempo em que se estabeleciam como organismos predominantes no intestino (apud MISHRA; ACHARYA, 2021). O gênero *Bifidobacterium*, composto por mais de 50 espécies e diversas subespécies, expande-se anualmente com novas descobertas (HIDALGO-CANTABRANA *et al.*, 2018). Os benefícios proporcionados por *Bifidobacterium* resultam de uma interação dinâmica entre essas bactérias, a microbiota intestinal e o hospedeiro humano (RUIZ *et al.*, 2014). Cada espécie apresenta efeitos imunológicos distintos, destacando-se *B. bifidum* pela sua capacidade de expandir a resposta reguladora das células T, uma característica relevante em doenças inflamatórias crônicas (LÓPEZ *et al.*, 2012).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. Eles têm demonstrado eficácia em condições como síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias intestinais, prevenção de diarreias infecciosas e inibição de enterocolite necrosante (SANDERS *et al.*, 2013). Para serem considerados eficazes, probióticos devem atender a critérios específicos, incluindo: sobrevivência ao trato digestivo superior; resistência a ácidos e sais biliares; segurança para consumo humano; capacidade de produzir substâncias antimicrobianas como bacteriocinas; adesão ao revestimento intestinal; colonização do intestino; e benefícios claros ao hospedeiro (MONTALBAN-ARQUES *et al.*, 2015; SARAO *et al.*, 2017).

O corpo humano pode ser considerado um superorganismo, funcionando em harmonia com trilhões de bactérias simbióticas e células eucarióticas. Estudos como o Projeto do Microbioma Humano e do Metagenoma do Trato Intestinal Humano revolucionaram a compreensão das interações hospedeiro-micróbio. A microbiota humana é composta por 10 a 100 trilhões de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, protozoários e fungos, sendo as bactérias predominantes, com uma densidade de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  células/ml (MARCHESI *et al.*, 2016; LLOYD-PRICE *et al.*, 2019). O microbioma, que representa o conjunto de genes da microbiota, é 150 vezes maior que o genoma humano (BACKHED *et al.*, 2015).

No intestino humano, a microbiota é majoritariamente formada por bactérias dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, que representam mais de 90% da população total. Alterações na proporção *Firmicutes/Bacteroidetes* estão associadas a disbiose, frequentemente observada em doenças inflamatórias intestinais (STOJANOV, 2020). A microbiota desempenha funções, protetoras, estruturais, metabólicas e neurológicas no corpo humano. No ambiente protetor, a camada de muco intestinal, composta por glicoproteínas de mucina, atua como barreira contra a fixação de micróbios no epitélio, além de facilitar o transporte do conteúdo luminal sem danificar o revestimento intestinal (JOHANSSON *et al.*, 2008). Algumas bactérias patogênicas, como *Helicobacter pylori*, possuem estratégias para atravessar essa barreira, incluindo a produção de urease para alterar o pH e diminuir a viscosidade do muco, facilitando sua entrada (CELLI *et al.*, 2009).

Estruturalmente, a microbiota é indispensável para a manutenção da barreira intestinal, reforçando as junções entre as células epiteliais e estimulando a produção de muco, o que protege contra a invasão de patógenos e previne inflamações crônicas. Ela também influencia o desenvolvimento e a maturação do sistema imunológico, promovendo a tolerância imunológica e regulando as respostas contra agentes externos, o que é vital para prevenir doenças autoimunes e infecções. Metabolicamente, a microbiota desempenha um papel crucial na digestão e absorção de nutrientes, fermentando fibras alimentares para produzir ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como butirato, propionato e acetato, que fornecem energia às células intestinais e regulam processos como o metabolismo glicêmico e lipídico. Além disso, ela contribui para a síntese de vitaminas, como a vitamina K e algumas do complexo B, fundamentais para a saúde sistêmica. No campo neurológico, a

microbiota conecta o intestino ao sistema nervoso central (SNC) por meio do eixo intestino-cérebro, uma rede bidirecional que envolve sinalização neural (como pelo nervo vago), imunológica e endócrina. Metabólitos bacterianos e neurotransmissores produzidos pela microbiota, como serotonina e GABA, influenciam o desenvolvimento cerebral, a neurogênese e a regulação de emoções e comportamentos. Alterações na microbiota (disbiose) têm sido associadas a doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, além de transtornos psiquiátricos, incluindo ansiedade e depressão (KASARELLO, CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA; CZARZASTA, 2023; SCHACHTLE; ROSSHART, 2021; RUTSCH, KANTSJÖ; RONCHI, 2020).

Os peptídeos antimicrobianos (PAMs) representam outro componente essencial da defesa intestinal. Secretados por células epiteliais como enterócitos, células caliciformes e de Paneth, os PAMs restringem a proximidade de comensais e patógenos com o epitélio. Incluem moléculas como defensinas, catelicidinas e lectinas do tipo C, que atuam destruindo membranas microbianas ou atacando a parede celular bacteriana (PUTSEP *et al.*, 2000).

Adicionalmente, a imunoglobulina A secretora (IgA) desempenha um papel crucial na proteção do epitélio intestinal contra toxinas e microrganismos patogênicos. A IgA promove tolerância imunológica e neutraliza toxinas e patógenos ao aprisioná-los no muco, bloqueando o acesso ao epitélio e facilitando sua eliminação por movimentos peristálticos e mecanismos mucociliares (MACPHERSON; UGR *et al.*, 2004). Esses processos refletem a complexidade e a eficácia das interações entre microbiota e sistema imunológico na manutenção da saúde intestinal.

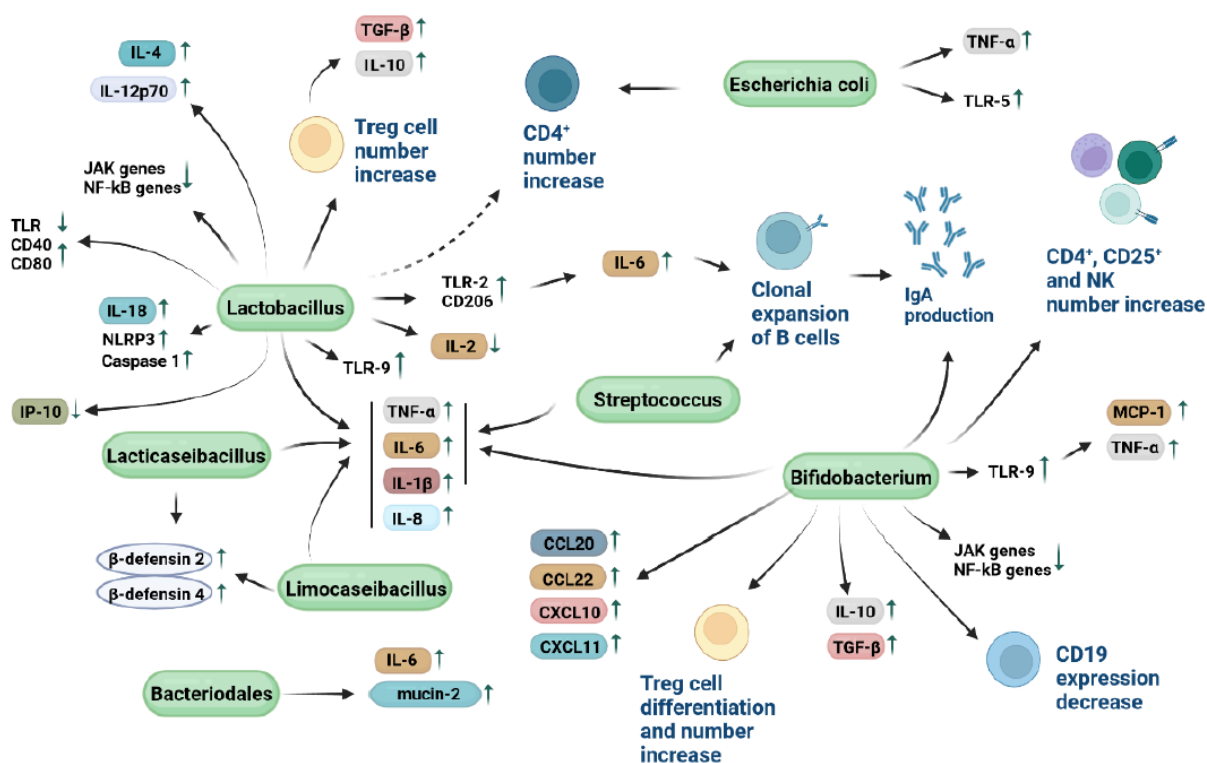
### 1.7. Mecanismos de ação dos probióticos

Os probióticos apresentam diversos mecanismos de ação que conferem potenciais benefícios ao trato gastrointestinal, conforme demonstrado por Sherman; Ossa; Johnson-Henry (2009). Ao colonizarem transitoriamente o intestino, esses microrganismos contribuem para corrigir a disbiose, um desequilíbrio na microbiota intestinal que pode estar associado ao desenvolvimento de doenças. Segundo Tamboli *et al.* (2004), a teoria da disbiose sugere que um rompimento no equilíbrio entre espécies protetoras e nocivas de bactérias intestinais pode levar à inflamação crônica do intestino. Esse desequilíbrio também pode ser influenciado pela resistência à colonização, definida como a capacidade de certas bactérias em interagir com células epiteliais para impedir a adesão de patógenos entéricos aos receptores epiteliais.

Os probióticos colonizadores podem exercer efeitos antimicrobianos diretos ao produzirem substâncias como bacteriocinas, que inibem o crescimento e a virulência de patógenos. Além disso, algumas cepas probióticas têm a capacidade de estimular a liberação de defensinas – peptídeos antibacterianos secretados por células de Paneth – fortalecendo a defesa imunológica local. Probióticos produtores de ácido lático, como as espécies *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, também reduzem o pH luminal intestinal, criando um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de patógenos. Adicionalmente, algumas cepas interferem na detecção de quórum, um mecanismo usado por bactérias para coordenar comportamentos como a expressão de fatores de virulência (ASAD; OPAL, 2008).

A interação dos probióticos com o sistema imunológico é complexa e difícil de generalizar, pois as respostas podem variar dependendo da cepa, do hospedeiro e do método de administração. Uma mesma cepa pode estimular a atividade antimicrobiana por meio da resposta Th1, bem como aumentar a resposta anti-inflamatória Th2 ou a atividade imunorregulatória, dependendo do contexto (IRVINE *et al.*, 2010; BISANZ *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014). Por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* GG possui múltiplos mecanismos para interagir com o hospedeiro, que, por sua vez, pode responder de várias maneiras a essas interações (SEGERS; LEBEER, 2014).

Os efeitos dos probióticos estendem-se a diferentes aspectos do ambiente intestinal, como a síntese do muco, o fortalecimento da barreira epitelial e a regulação do sistema imunológico da mucosa (Figura 5). Esses microrganismos influenciam diversos tipos celulares envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa, incluindo células epiteliais, células dendríticas, monócitos/macrófagos, células B, células T (particularmente células T reguladoras) e células NK.



**Figura 5.** Mecanismos de ação das bactérias probióticas. *Lactobacillus* pode (i) estimular células T reguladoras (Treg) a produzir TGF- $\beta$ , interleucina-10 (IL-10) e IL-8, (ii) aumentar os níveis de IL-6 secretada de forma dependente do receptor Toll-like (TLR-2), induzindo assim a expansão clonal de todas as células B produtoras de IgA, ao mesmo tempo que estimula a expressão do receptor de manose de macrófagos CD206, (iii) inibir a expressão dos genes Janus quinase (JAK) e fator nuclear kappa (NF- $\kappa$ B), (iv) aumentar a liberação de IL-12p70 e IL-4, (v) reduzir a expressão de TLR e aumentar as expressões de CD40 e CD80, (vi) degradar a proteína 10 induzível por IFN- $\gamma$  da quimiocina pró-inflamatória (IP-10), (vii) aumentar a expressão de TLR-9, que (viii) favorecem a expressão da proteína receptora semelhante ao domínio oligomérico de ligação a nucleotídeos 3 (NLRP3), da cisteína proteinase-1 (Caspase-1) e da IL-18. *Lacticaseibacillus* e *Limocaseibacillus* podem induzir a expressão de  $\beta$ -defensinas 2 e 4 e IL-8. Estudos distintos relataram dados conflitantes sobre a expressão de TLR. *Bifidobacterium* pode (i) inibir a expressão dos genes JAK e NF- $\kappa$ B, (ii) favorecer a superexpressão de IL-10 e TGF- $\beta$ , enquanto, ao mesmo tempo, estimula a produção de IgAs, (iii) favorecer a diferenciação de células Treg, (iv) aumentar o total de linfócitos T auxiliares (CD4+) e ativados (CD25+) e células NK, (v) reduzir a expressão de CD19 em células B, (vi) induzir a produção de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e TNF- $\alpha$  através da

estimulação de TLR-9, e (vii) aumentar o número de células T reguladoras Foxp3(+) e a liberação de CCL20, CCL22, CXCL10 e CXCL11. *Escherichia coli* pode induzir a expressão de TLR-5 e TNF- $\alpha$ , bem como aumentar o número de células CD4+. Bacteroidales estimula a liberação de IL-6, acompanhada pela expressão de mucina-2 e claudina-1. *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Limocaseibacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* podem favorecer a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . *Streptococcus* pode induzir expansão clonal de células B estimuladas a liberar IgAs. Seta tracejada: dados conflitantes foram relatados sobre o efeito de lactobacilos no aumento do número de células T CD4+.

Fonte: <https://doi.org/10.3390/cells12010184>

Os probióticos influenciam o muco intestinal principalmente ao fortalecer a função de barreira da mucosa e modular sua composição. Esses microrganismos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, têm o potencial de melhorar a produção e as propriedades protetoras da camada de muco. Eles competem com patógenos por locais de adesão nas células epiteliais, impedindo sua fixação e reduzindo a inflamação local. Além disso, os probióticos podem estimular a secreção de mucinas, que são componentes essenciais do muco, protegendo a integridade do epitélio intestinal contra danos e toxinas (DONGARRÀ, *et al.*, 2013).

Um mecanismo adicional é a produção de metabólitos, como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que promovem o ambiente necessário para a proliferação de células epiteliais e melhoram a homeostase intestinal. Esses AGCC também ajudam a reduzir a permeabilidade intestinal ao reforçar as junções celulares, minimizando o risco de endotoxinas e patógenos translocarem para a circulação sistêmica. Estudos indicam que essa regulação contribui para a redução de marcadores inflamatórios, como TNF- $\alpha$  e IL-6, beneficiando a saúde intestinal de maneira ampla (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2017; THANANIMIT, *et al.*, 2022).

Os efeitos dos probióticos sobre o muco intestinal estão intrinsecamente relacionados à sua capacidade de modular a resposta imunológica. Os mecanismos de imunomodulação promovidos por essas cepas microbianas incluem, principalmente, a ativação de macrófagos por meio de vias de sinalização específicas, o estímulo à diferenciação e ativação de células produtoras de IgA e neutrófilos, bem como a indução da produção periférica de imunoglobulinas e de muco. Adicionalmente, os probióticos exercem efeito anti-inflamatório por meio da

inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e da indução de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10).

Esses efeitos resultam na ampliação da resposta imune de mucosa, com destaque para o aumento da produção de IgA secretória, conferindo maior proteção epitelial. Em conjunto, esses mecanismos sustentam o uso de probióticos como uma estratégia terapêutica promissora no tratamento de doenças inflamatórias intestinais e de outras condições associadas ao comprometimento da integridade da barreira mucosa (ZHENG, *et al.*, 2023).

### 1.8. *Escherichia coli* Nissle

A cepa *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) constitui o componente ativo da preparação farmacêutica Mutaflor®, um medicamento microbiano licenciado para uso em medicina humana na Alemanha e em outros países europeus. Desde 1917, este produto tem sido tradicionalmente utilizado no tratamento de diversas doenças e disfunções intestinais (NISSLE, 1925; SCHULTZ, 2008). A história do Mutaflor® remonta ao início do século XX, quando o médico e bacteriologista Alfred Nissle, de Freiburg, Alemanha, iniciou estudos sobre cepas intestinais humanas de *E. coli* que apresentavam atividade inibitória contra patógenos como *Salmonella*, *Shigella* e outras enterobactérias virulentas.

Durante a Primeira Guerra Mundial, Nissle isolou a cepa EcN a partir das fezes de um soldado que, ao contrário de seus companheiros, não desenvolveu diarreia infecciosa enquanto estava na península balcânica, uma região conhecida na época pela alta contaminação por enteropatógenos. Nissle presumiu que essa resistência se devia à presença de uma cepa intestinal de *E. coli* altamente antagonística que atuava como barreira protetora contra infecções diarreicas (NISSLE, 1918; NISSLE, 1925). Essa observação foi a base para a proposta de uso terapêutico de cepas antagonísticas de *E. coli* para o controle de enteropatologias.

Sorologicamente, EcN pertence ao grupo *E. coli* O6 e ao sorotipo O6:K5. Trata-se de uma enterobactéria Gram-negativa típica, que contém lipopolissacarídeo (LPS) como componente estrutural de sua membrana externa. O antígeno de superfície O6, parte externa do LPS, apresenta características específicas que contribuem para a funcionalidade da cepa (BLUM *et al.*, 1995;). Além disso, EcN

forma uma cápsula extracelular do sorotipo K5, uma característica rara observada em apenas 1% dos isolados de *E. coli*. A síntese dessa cápsula é codificada por loci gênicos no DNA cromossômico, identificados por meio de sondas específicas para os genes da cápsula K5 (OTT *et al.*, 1991).

Outra peculiaridade da cepa é sua elevada motilidade, conferida pelos flagelos do sorotipo H1. Essa estrutura não apenas auxilia no deslocamento ativo através da camada de muco intestinal, mas também desempenha papel crucial no metabolismo aeróbico, facilitando o acesso a fontes de oxigênio próximas à mucosa intestinal. Adicionalmente, os flagelos desempenham funções sensoriais e interagem diretamente com o epitélio intestinal, atuando como sensores bacterianos de umidade e mediadores no crosstalk bacteriano-epitelial (WOLF, 1997).

Essas propriedades tornam a EcN uma cepa única, amplamente estudada e utilizada como ferramenta terapêutica no tratamento de distúrbios intestinais, sendo um exemplo clássico de como a microbiota pode ser modulada para promover a saúde intestinal.

### **1.8.1. Eficácia e segurança de *Escherichia coli* Nissle**

Bactérias probióticas desempenham um papel fundamental na manutenção de mecanismos antimicrobianos frente a patógenos recém-chegados ou estabelecidos, utilizando estratégias diversas como a produção de bacteriocinas, redução do ATP intracelular, aumento da permeabilidade da membrana, sensibilização das membranas bacterianas à ação lítica, comprometimento da motilidade flagelar e bloqueio da internalização bacteriana (TREBICHAVSKY *et al.*, 2010). *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) destaca-se por sua capacidade de produzir duas microcinas e por operar pelo menos seis sistemas distintos de captação de ferro, conferindo-lhe vantagens competitivas contra outros patógenos intestinais (GROBE *et al.*, 2006).

Recentemente, estudos demonstraram que a flagelina da EcN apresenta propriedades simbióticas notáveis em condições inflamatórias, como a colite induzida por sulfato de sódio e dextrano. Essa propriedade deve-se a uma região hipervariável mais longa na flagelina da EcN em comparação com outras cepas de *E. coli*. Essa estrutura específica ativa de forma mais robusta o receptor Toll-like 5

(TLR5), promovendo uma resposta imune mediada por interleucina-22 (IL-22), crucial na regeneração do epitélio intestinal e na manutenção da homeostase (STEIMLE *et al.*, 2019).

Além disso, a EcN mostrou-se um imunoestimulante mais potente do que o probiótico gram-positivo *Lactobacillus rhamnosus* GG em estimular respostas imunológicas mucosas e sistêmicas, especialmente pela indução de altos níveis de IgA. Essa resposta aumenta a troca de classe de anticorpos, especialmente contra patógenos como o rotavírus, evidenciando seu papel na proteção e na imunomodulação (KANDASAMY *et al.*, 2017).

A segurança e a eficácia da EcN como probiótico têm sido amplamente estudadas. Um estudo de Krammer *et al.* (2006), analisou seu uso em 3.807 pacientes para tratar mais de 20 condições clínicas, sendo que 3.511 desses pacientes apresentavam queixas gastrointestinais. Entre eles, 1.067 sofriam de diarreia crônica recorrente (728 casos) ou diarreia prolongada (339 casos), 415 tinham doenças inflamatórias intestinais crônicas, 679 apresentavam síndrome do intestino irritável, e 253 relatavam constipação crônica. A eficácia global foi avaliada como boa ou muito boa por 81,4% dos terapeutas. Observou-se melhora na frequência e consistência das evacuações, além de redução nos sintomas de meteorismo e dor abdominal.

Outro estudo conduzido por HENKER *et al.* (2007) investigou a eficácia e segurança de uma suspensão de EcN em bebês e crianças pequenas com diarreia aguda. O estudo incluiu 113 crianças entre 2 e 47 meses. A análise revelou que o tempo médio para o início da resposta ao tratamento foi significativamente mais curto no grupo que recebeu a solução de EcN (2,5 dias) em comparação ao grupo placebo (4,8 dias). Concluiu-se que a EcN é um probiótico seguro e bem tolerado em crianças, evidenciando sua aplicabilidade em pediatria para o manejo de doenças intestinais agudas.

Esses resultados reforçam o potencial terapêutico da EcN em diversas condições gastrointestinais, consolidando-a como uma ferramenta valiosa na modulação da microbiota e no suporte à saúde intestinal.

## 2. JUSTIFICATIVA

O uso de probióticos tem se mostrado promissor no manejo de diversas infecções, devido à sua capacidade de contribuir para a restauração da microbiota intestinal, frequentemente comprometida durante processos infecciosos. Além disso, os probióticos dispõem de mecanismos de ação variados contra patógenos, incluindo a produção de substâncias antimicrobianas, o bloqueio da adesão de microrganismos patogênicos ao epitélio intestinal e a modulação do sistema imunológico do hospedeiro.

No caso da amebíase, embora os tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis sejam, em geral, eficazes, há relatos de resistência em algumas situações clínicas. Essa resistência ocorre quando o parasita *E. histolytica* não é completamente eliminado pelo medicamento, mesmo após a administração de um regime terapêutico adequado. Além disso, os efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais podem impactar a adesão dos pacientes, resultando em abandono terapêutico e aumento do risco de complicações.

Apesar do potencial terapêutico dos probióticos em doenças intestinais, ainda são escassos os estudos que avaliam sua eficácia no manejo da infecção por *E. histolytica* e muitas dúvidas em relação a eficácia e como usar os probióticos ainda precisam ser esclarecidas. Nosso grupo tem dedicado a avaliar o efeito de possíveis candidatos a probióticos para o tratamento da amebíase. Acreditamos que os probióticos podem oferecer uma abordagem alternativa ou complementar para o tratamento da amebíase.

Entre as bactérias caracterizadas como probióticos, destaca a cepa *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), amplamente reconhecida por sua segurança e eficácia no manejo de distúrbios intestinais. Esta cepa possui propriedades antimicrobianas e imunomoduladoras robustas, além de ser bem tolerada por diferentes faixas etárias, o que reforça sua indicação em um contexto terapêutico inovador para a amebíase. Acreditamos que o uso da EcN pode oferecer um benefício significativo na redução da carga parasitária, na minimização dos sintomas clínicos e na restauração da homeostase intestinal, contribuindo para avanços no manejo desta importante parasitose.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

- Avaliar os efeitos *in vitro* e *in vivo* da bactéria *Escherichia coli* Nissle sobre trofozoítos de *Entamoeba histolytica*.

#### 3.2. Específicos

- Padronizar o cultivo *in vitro* de *Escherichia coli* Nissle associada à trofozoítos de *E. histolytica*;
- Avaliar a atividade amebicida da *Escherichia coli* Nissle *in vitro*;
- Avaliar a intensidade da inflamação da mucosa cecal nos gerbils infectados com *E. histolytica* e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a produção de muco no ceco de gerbils infectados com *E. histolytica* e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle;
- Avaliar a permeabilidade intestinal no ceco de gerbils infectados com *E. histolytica* e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle;
- Avaliar a expressão de IL-4, IL-5, IL-10, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  na mucosa cecal de gerbils infectados com *E. histolytica* e tratados não com *Escherichia coli* Nissle.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Cepa de *Entamoeba histolytica* e manutenção do parasito

A cepa axênica EGG de *E. histolytica* usada neste estudo foi isolada no Laboratório de Amebíase e Parasitose Intestinal do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, de um paciente apresentando colite disentérica com sorologia, zimodema e PCR positiva para *E. histolytica* (Gomes *et al*, 1999; Martinez *et al*, 1996).

Os trofozoítos foram cultivados em tubos de vidro (Pyrex®; 16x125mm) contendo 13 mL de meio YI-S-32 (CLARK; DIAMOND, 2002) e incubados em estufa a 37° C. As culturas foram observadas em microscópio invertido, avaliando seu crescimento, viabilidade e aderência à parede do tubo. Antes do repique, os tubos que possuíam bom crescimento foram mantidos no gelo por 12 minutos e invertidos várias vezes para facilitar o desprendimento dos parasitos. Após a inversão dos tubos, um volume de aproximadamente 0,5mL da suspensão foi transferido para um novo tubo contendo meio de cultura fresco. Após o repique, os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37°C. Os repiques foram feitos entre 48 e 72 horas para garantir a utilização dos parasitos sempre em fase exponencial de crescimento.

### 4.2. Cepa de *Escherichia coli* Nissle

O probiótico EcN (Mutaflor; Ardeypharm) foi adquirido como produto farmacêutico disponível no Canadá. EcN foi isolado do produto e crescimento em caldo de infusão cérebro-coração (Acumedia, Neogen) sob condições aeróbicas por um período de 24 horas a 37 °C. Os repiques foram realizados a cada 24 horas garantindo assim sua utilização sempre em fase log de crescimento.

### 4.3. Associação *in vitro* parasito vs EcN

Para avaliar a associação de *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) à cultura amebiana, inicialmente foram realizados testes de viabilidade e crescimento da bactéria no meio TYI-S-33, tradicionalmente utilizado para o cultivo da cepa EGGa de *Entamoeba histolytica*. O meio TYI-S-33 é composto por extrato de levedo, fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monopotássico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), cloreto de sódio (NaCl), glicose, L-cisteína (aminoácido), ácido ascórbico, citrato férrico, soro bovino e água destilada (DIAMOND *et al.*, 1978). Por se tratar de um meio nutricionalmente enriquecido e contendo glicose como fonte de carbono, a EcN demonstrou boa adaptação e capacidade de colonização, mantendo-se viável a 37 °C em estufa, sem a necessidade de suplementações adicionais ou ajustes na formulação do meio.

Paralelamente, foi realizada uma avaliação preliminar do crescimento de *E. histolytica* em placas de 96 poços, com o objetivo de determinar as proporções ideais de meio para garantir a estabilidade do cultivo. Foram testadas diferentes combinações de volumes de meio TYI-S-33 (190 µl, 160 µl e 140 µl, 120µl) com volumes complementares contendo trofozoítos de *E. histolytica* (110 µl, 140 µl, 160 µl e 180 µl respectivamente). Após a distribuição, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C e o crescimento do parasito foi monitorado e comparado entre as diferentes proporções testadas. A combinação de 200 µL de meio com 100 µL de do volume com *E. histolytica* foi a que apresentou melhor desempenho, mantendo crescimento estável e boa viabilidade celular mesmo após 24 horas de incubação.

Estabelecido o protocolo de cultivo em placas, utilizou-se uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  trofozoítos/mL de *E. histolytica*, os quais foram previamente distribuídos nos poços das placas de 96 poços. Após uma hora de incubação a 37 °C para garantir a adesão celular, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, e os poços foram tratados com o probiótico *E. coli* Nissle em concentrações variando entre  $10^9$  e  $10^2$  UFC/mL, com volume final de 300 µl. As placas foram então reincubadas a 37 °C por períodos de 6, 12 e 18 horas. Ao final de cada período, a viabilidade das células parasitárias foi determinada por contagem direta em hemocítômetro, utilizando a coloração com azul de tripano, que permite discriminar células viáveis (exclusão do corante) de células mortas (coradas).

#### 4.3.1. Avaliação da permeabilidade intestinal

Tradicionalmente, a permeabilidade intestinal é investigada *in vivo* por medidas da concentração urinária ou sanguínea de substâncias administradas oralmente (BJARNASON et al., 1995). O <sup>99m</sup>Tc-DTPA (Ácido dietilenotriaminopentacético marcado com <sup>99m</sup>Tecnécio) é uma macromolécula que raramente atravessa a barreira intestinal. Entretanto, quando a permeabilidade intestinal está aumentada devido à lesão da mucosa, a presença de DTPA na corrente sanguínea pode ser detectada (JORGENSEN et al., 2006).

Assim, os animais receberam por gavagem 0,1 mL de solução de <sup>99m</sup>Tc-DTPA contendo 18,5 MBq de atividade. O padrão de dose, que corresponde a uma alíquota de igual volume de <sup>99m</sup>Tc-DTPA oferecido aos animais foi utilizado para correção do decaimento radioativo do <sup>99m</sup>Tc e teve a radioatividade determinada simultaneamente aos demais tubos. Quatro horas após a gavagem, 500 µL do sangue foi coletado da veia cava inferior para contagem da radioatividade em contador de radiação gama (Perkinelmer Wallac, 1480 Wizard 3). A permeabilidade intestinal foi calculada com a seguinte fórmula: % dose = (cpm no sangue /cpm do padrão) ×100 onde cpm representa contagens por minuto.

#### 4.3.2. Análise morfométrica dos trofozoítos

Para a análise morfométrica do tamanho dos trofozoítos, foi considerada a área ocupada, uma vez que trofozoítos vivos poderiam assumir a forma ameboide. As amostras foram analisadas a fresco, tanto do grupo controle após o tratamento com o probiótico. Imagens de 15 trofozoítos vivos e 15 trofozoítos mortos foram capturadas usando uma microcâmera (QColor3 Olympus America inc), sob uma objetiva de 40× para digitalização. A área ocupada por cada trofozoíto foi medida usando o software QuPath versão 0.5.1 (<https://qupath.github.io>, acessado em 19 de fevereiro de 2025).

### 4.3.3. Avaliação da produção de EROs pela EcN associada com *E. histolytica*

Para avaliarmos a produção intracelular de espécie reativa de oxigênio (EROs), superóxido e peróxido de hidrogênio, foram utilizadas sondas intracelulares fluorescentes. Após os tratamentos, as células foram lavadas com PBS e carregadas com as sondas fluorescentes intracelulares para o superóxido (dihydroethidium, DHE, 5  $\mu$ M; Invitrogen, USA) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (dihydrodichloro-fluorescein diacetate, H2-DCF-DA 5 $\mu$ M; Invitrogen, USA) por 30 minutos e sonda DAPI por 5 minutos para marcação do núcleo, no escuro e posteriormente foram lavadas com PBS. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% para serem digitalizadas em microscópio de fluorescência nos comprimentos 490/530nm de emissão/excitação para as sondas H2-DCF-DA e 510/580nm para a sonda DHE, para posterior análise de aquisição de fluorescência.

Para fluorescência, os trofozoítos de *E. histolytica* foram distribuídos em uma placa de 24 poços na concentração de  $2,5 \times 10^5$  em cada poço. Antes de distribuir as amebas nos poços uma lamínula redonda de 13 mm foi colocada em cada poço. Em seguida, a placa foi incubada por 1h a 37 °C para garantir a fixação das amebas na placa. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as bactérias probióticas foram diluídas em série em meio TYI-S-33 estéril. Nos poços contendo *E. histolytica* foi adicionado 270  $\mu$ l do meio TYI-S-33 e 30  $\mu$ l das células probióticas. O volume de cultura final de 300  $\mu$ l continha de  $10^3$ – $10^9$  UFC. A placa foi incubada novamente com as concentrações e períodos diferentes de 6h, 12h, 18h e 24h a 37 °C sob condições anaeróbicas. Nenhum antibiótico foi usado durante o experimento de associação no meio. Por fim, com o auxílio de uma pinça, as lamínulas foram retiradas da placa e fixadas na lâmina para análise de fluorescência.

As imagens foram obtidas por meio da objetiva de 20x de microscópio de fluorescência Axiovision 3.1 (Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha). As células imunorreativas foram identificadas pela coloração do citoplasma e núcleos. Fotos de campos contendo 5 a 10 células foram digitalizadas para cada tratamento experimental em dois canais fluorescentes: verde e vermelho.

#### 4.4. Experimento *in vivo*

Neste estudo foram utilizados 28 gerbils macho e fêmeas, com idade aproximada entre 6 e 8 semanas. Os animais foram distribuídos em 4 grupos, compostos por 7 animais cada (Tabela 2), mantidos em gaiolas coletivas, sob temperatura controlada de 23 °C, com um ciclo de 12 horas de luz, administrado água filtrada e ração balanceada por "*ad libitum*". Todos os gerbils foram submetidos a tratamento prévio com Ivermectina a 1% (Ivomec, Merial do Brasil, Campinas, Brasil) para eliminar qualquer parasito indesejado. Após a desparasitação, os gerbils passaram por um período de quarentena de 15 dias. Ao término desse período, foi realizado um exame parasitológico de fezes para confirmar a ausência de parasitas intestinais. Após essa etapa, os experimentos foram iniciados. A distribuição dos grupos experimentais e os procedimentos realizados, bem como *time-points*, estão detalhados na tabela 1.

**Tabela 1. Grupos de gerbils e procedimentos experimentais.**

Grupos experimentais	Procedimentos
CT	Gerbil não infectados e não tratados com o probiótico e laparomizados após 7 dias.
Prob	Gerbil gavados com 200 µl de <i>E. coli</i> Nissle durante 7 dias.
Infec	Gerbil infectados com <i>E. histolytica</i> e não tratados com probiótico durante 7 dias.
Trat	Gerbil infectados com <i>E. histolytica</i> e tratado com o probiótico por 7 dias.

#### 4.4.1. Inoculação de *E. histolytica*

Previamente, os animais foram anestesiados com xilazina a 2% (10 mg/kg) e cetamina a 5% (200 mg/kg). Em seguida, foi realizada uma laparotomia mediana sagital de aproximadamente um centímetro para exposição do ceco. Na porção final do ceco, com o auxílio de uma seringa e agulha, foram inoculados  $1 \times 10^6$  trofozoítos diluídos em Phosphate Buffered Saline (PBS) 1× em cada animal dos grupos experimentais Infec e Trat. O volume total do inóculo em cada animal foi de 100µl. Os gerbils pertencentes aos grupos probiótico e controle foram submetidos aos mesmos procedimentos; no entanto, foram inoculados apenas 100µl de PBS 1×.

#### 4.4.2. Eutanásia, coleta de material

Para a eutanásia e posterior coleta do ceco os animais foram submetidos a uma injeção intraperitoneal com sobredosagem da associação dos anestésicos Ketamina 5% (200mg/kg) e Xilazina 2% (10mg/kg). Confirmado a ausência estímulo muscular, realizamos a abertura da cavidade peritoneal através de incisão mediana para coleta do material. Os cecos dos ratos foram abertos longitudinalmente, lavados com PBS pH 7,2, colocados em uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (*swiss rolls* ou *rocambole*).

Os rolos foram então amarrados com linhas, com leve pressão. Em seguida foram fixados em formol tamponado 10% pH 7,2 por 5 dias, com adaptações segundo Arantes & Nogueira (1997). Após o período de fixação no formol, foram obtidos de cada ceco, 5 fragmentos que foram desidratados em diluições alcólicas crescentes, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes com 4 µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (HE) e confeccionadas lâminas para análises histopatológicas e descrição das lesões quanto a intensidade inflamatória.

Após a eutanásia, as carcaças foram imediatamente acondicionadas em sacos de lixo branco, identificados como lixo biológico infectante e refrigerados a -20°C em Freezer do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG, exclusivamente utilizado para o armazenamento temporário das carcaças. Posteriormente, os sacos foram coletados como lixo biológico infectante pelo serviço

de limpeza do ICB, direcionados para o abrigo externo específico e recolhidos pela empresa terceirizada para incineração.

#### 4.4.3. Análises histopatológicas

Foram fixadas duas seções do ceco de cada animal, sendo os cortes histológicos com 4-5  $\mu\text{m}$  de espessura, corados com *Hematoxilina e Eosina* (HE) e *Periodic Acid-reactive Schiff* (PAS). As lâminas coradas em HE foram avaliadas com intuito de identificar e classificar as lesões e infiltrado inflamatório no ceco seguido de análises qualitativas e semi-quantitativa. As lâminas foram visualizadas por meio da objetiva de 10x e 20x no microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Germany) e digitalizadas por meio da microcâmara (Qcolor 3, Olympus America Inc). As lâminas foram examinadas, e a intensidade do infiltrado foi classificada de forma semiquantitativa, conforme a seguinte escala:

0 – Sem infiltrado: ausência de células inflamatórias na região analisada.

1 – Infiltrado discreto: presença dispersa de células inflamatórias, distribuídas de forma isolada ou em pequenos grupos.

2 – Infiltrado moderado: presença de número intermediário de células inflamatórias, formando agrupamentos visíveis, porém sem ocupar completamente a área tecidual.

3 – Infiltrado intenso: grande acúmulo de células inflamatórias, ocupando a maior parte da área observada e, por vezes, desorganizando a arquitetura tecidual.

Para o cálculo da área de produção de mucinas ( $\mu\text{m}^2$ ) foram utilizados os cortes histológicos corados com PAS. As lâminas foram visualizadas com objetiva de 20x e 40x em microscópio Axiolab para a digitalização aleatória de imagens intestinais, conforme descrito anteriormente. O imageamento microscópico, a segmentação de imagens, o processamento digital e a definição das condições de morfometria foram realizados em concordância com Caliari (1997).

#### 4.4.4. Extração de RNA

Para extração de RNA, amostras do ceco, mantidas em RNA later, foram homogeneizadas em RNA STAT-60 (1 mL para cada 50–100 mg de tecido) utilizando um homogeneizador de vidro-Teflon ou Polytron. O volume da amostra não excedeu 10% do volume de RNA STAT-60 utilizado na homogeneização. Após esse processo, o homogeneizado foi mantido por 5 minutos em temperatura ambiente para permitir a dissociação completa dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio por mL de RNA STAT-60. As amostras foram tampadas e agitadas vigorosamente por 15 segundos, permanecendo depois em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos.

A separação das fases foi realizada por centrifugação a  $12.000 \times g$  por 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , resultando na formação de três fases: uma fase inferior (fenol vermelho), a interfase e a fase aquosa superior (incolor). O RNA ficou retido exclusivamente na fase aquosa, enquanto o DNA e as proteínas permaneceram na interfase e na fase orgânica. O clorofórmio utilizado não continha álcool isoamílico nem outros aditivos. A centrifugação para separação de fases foi conduzida em temperatura controlada ( $4\text{--}10^\circ\text{C}$ ), pois temperaturas elevadas podem resultar na contaminação da fase aquosa com resíduos de DNA, o que comprometeria análises subsequentes como PCR, embora o RNA ainda pudesse ser utilizado em técnicas como Northern blot.

A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, enquanto a interfase e a fase orgânica foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  para posterior isolamento de DNA e proteínas. A precipitação do RNA foi realizada com adição de isopropanol (500  $\mu$ L por mL de RNA STAT-60 utilizado na homogeneização), seguida por incubação em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos e centrifugação a  $12.000 \times g$  por 8 minutos a uma temperatura entre  $4$  e  $25^\circ\text{C}$ . O RNA precipitado, geralmente invisível antes da centrifugação, formou um pellet branco semelhante a um gel, localizado na lateral e no fundo do tubo.

Após a remoção do sobrenadante, o pellet de RNA foi lavado com etanol a 75%, seguido de centrifugação a  $7.500 \times g$  por 5 minutos a  $4\text{--}25^\circ\text{C}$ . Utilizou-se pelo menos 1 mL de etanol por mL de RNA STAT-60 empregado na homogeneização inicial. Caso o pellet apresentasse tendência a flutuar ou aderir às paredes do tubo,

foi realizada uma centrifugação adicional a  $12.000 \times g$ . O procedimento de lavagem foi repetido uma vez.

Finalizada a lavagem, o etanol foi removido, e o pellet de RNA foi seco ao ar por 3 a 5 minutos, evitando-se a secagem completa para preservar sua solubilidade. O RNA não foi seco por centrifugação a vácuo. A solubilização foi realizada em 30  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase (tratada com dietilpirocarbonato – DEPC), por meio da passagem da solução através de uma ponteira de pipeta e incubação a  $55\text{--}60^\circ\text{C}$  por 10 a 15 minutos.

A quantificação do RNA foi realizada por espectrometria utilizando o equipamento NanoDrop™ 2000c (NanoDrop Thermo Fisher Scientific, spectrophotometers), determinando a razão de absorbância em 260 a 280 nm.

#### **4.4.4.1. Amplificação do cDNA**

A quantidade de 10 $\mu\text{g}$  de RNA total foi usada em reações de transcrição reversa para produção de cDNA usando-se o kit Bio-Rad, seguindo recomendações do fabricante. Para isso foi utilizado iScript™ reverse transcription supermix for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories, Inc. Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Na reação de RT-qPCR foram utilizados 1,5  $\mu\text{L}$  de RNA para cada reação e por amostra. O RNA total foi armazenado a  $-80^\circ\text{C}$  e o cDNA armazenado a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **4.4.4.2. Análise de reação em cadeia (RT-qPCR)**

O cDNA (2  $\mu\text{L}$ ) obtido foi usado para a quantificação da expressão das citocinas usando-se o kit SYBR Green PCR Master Mix 2x Bio-Rad. O gene endógeno constitutivo utilizado foi o GAPDH (Gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase). Os pares de iniciadores (*forward* e *reverse*) foram utilizados na concentração de 10x cada, ou seja, 10  $\mu\text{L}$  de primer + 90  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase. A seleção dos iniciadores garantiu a amplificação específica dos alvos determinados que amplificaram amplicons que variaram de 71 a 122 pares de bases por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT- qPCR), usando o sistema SYBR Green - SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As

sequências dos primers, bem como as eficiências de reação são demonstradas na Tabela 2.

**Tabela 2. Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas obtidas em amostras do ceco de gerbils infectados com *E. histolytica* e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle.**

Gene alvo	Forward: 5' → 3'	Reverse: 5' → 3'
<b>GAPDH</b>	CTGGCATGGCCTTCCGAG	CAGGTTTCTGCAGTCGGC
<b>IL-4</b>	GCAACGAAGAACACCACAGA	GGATGCAGGGTACTGATGCT
<b>IL-5</b>	TACTGACAAGCAACGAGACAGTG	CAGTATGTCTAGCCCCTGAAAGA
<b>IL-10</b>	CATGGGTCTTGGGAAGAG	AATGAAGTGGTTGGAGAATG
<b>TNF-alfa</b>	GCATGGACCTCAGGGACAACCAG	GGCTGACGGTGTGCGTGAGGA
<b>IFN-gama</b>	CAAGCGATTGAGAAGAGCATAA	GCTCATGAACCCATCCTATTTTC

#### 4.5. Análise estatística

Para os dados do experimento *in vitro* foi realizada a ANOVA two-way para as comparações entre os tratamentos (diferentes concentrações de *E. coli* Nissle) e os tempos (6h, 12h e 18h). O teste post hoc de Tukey, para comparações múltiplas, foi empregado para a identificação das diferenças específicas na viabilidade em cada tempo de contagem ( $p < 0,05$ ).

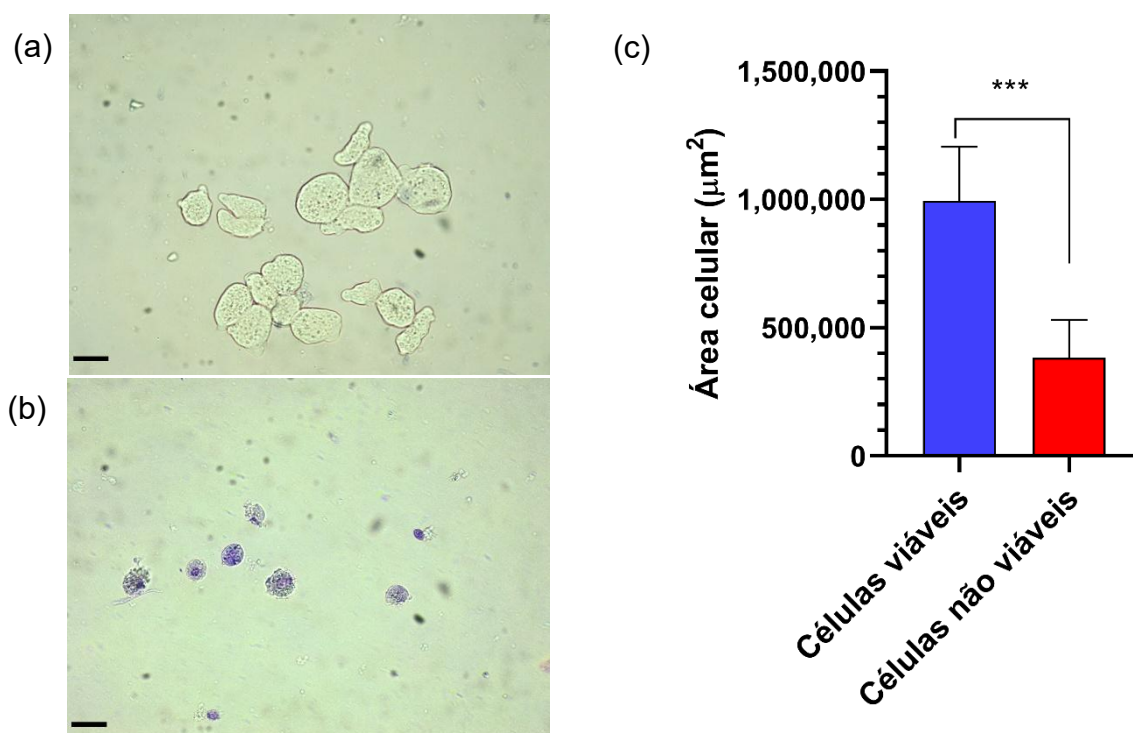
Os dados do experimento *in vivo* foram submetidos ao teste de Grubbs para detecção de outliers e Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade das variáveis. As comparações entre os tratamentos nos animais infectados e nos animais não infectados foram feitas utilizando o teste ANOVA two-way. Foi considerado um nível de significância de 5%. Todos os testes e análises foram realizados no software Prisma 9.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, USA).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Resultados *in vitro*

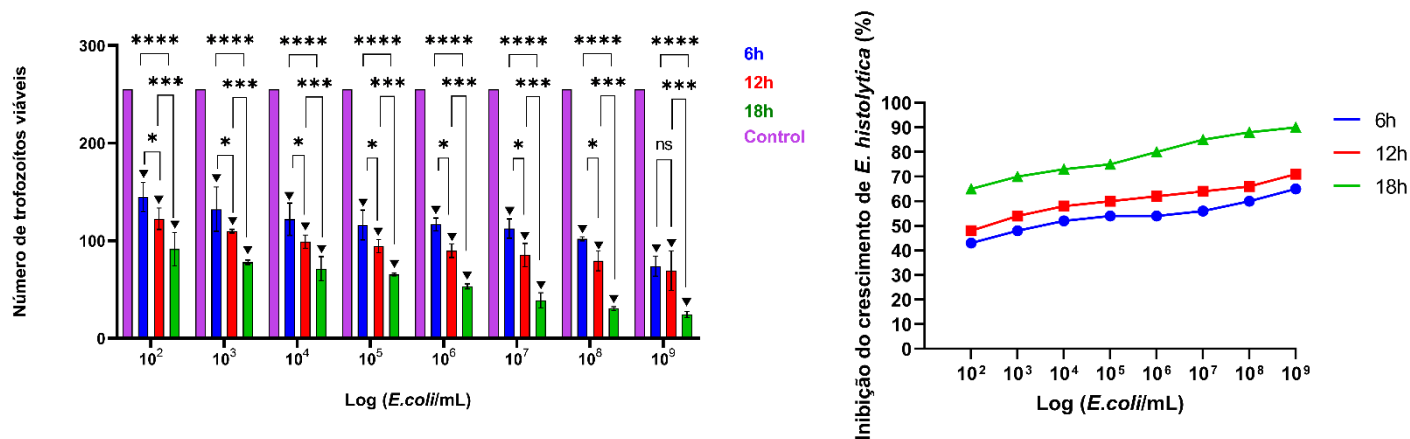
#### 5.1.1. Eficácia da associação *in vitro* do probiótico com *E. histolytica*

A viabilidade de *E. histolytica* após associação com EcN foi avaliada pela contagem de trofozoítos viáveis utilizando um hemocitômetro em intervalos de 6, 12 e 18 h (Figura 6a). Após a exposição ao probiótico, os trofozoítos mortos ou em sofrimento, observados ao microscópio óptico, apresentaram-se corados com azul de tripano e, em geral, apresentavam formato arredondado (Figura 6b). Além disso, eram menores em tamanho em comparação aos trofozoítos viáveis, conforme confirmado pela medição da área ocupada por cada trofozoíto (Figura 6c).



**Figura 6.** Avaliação morfológica dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Controle. Os trofozoítos viáveis apresentam tamanho maior e permanecem sem coloração pelo azul de tripano. (b) Em contraste, os trofozoítos não viáveis apresentam formato arredondado, granularidade citoplasmática aumentada e coloração intensa pelo azul de tripano. (c) Comparação da área celular do trofozoíto entre células viáveis e não viáveis, com diferença significativa ( $p < 0,0007$ ). Barra = 70 µm.

O número de trofozoítos foi quantificado e representado graficamente em relação à variação na concentração de EcN (Figura 7a). A inibição do crescimento de *E. histolytica* foi observada em todos os tempos de incubação e em todas as concentrações de probióticos. Esse efeito inibitório foi mais evidente após 18 h de associação a uma UFC de  $10^9$  células/mL (Figura 7b).



\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; ▼  $p < 0,001$  Diferença significativa quando comparado com grupo controle.

(a)

(b)

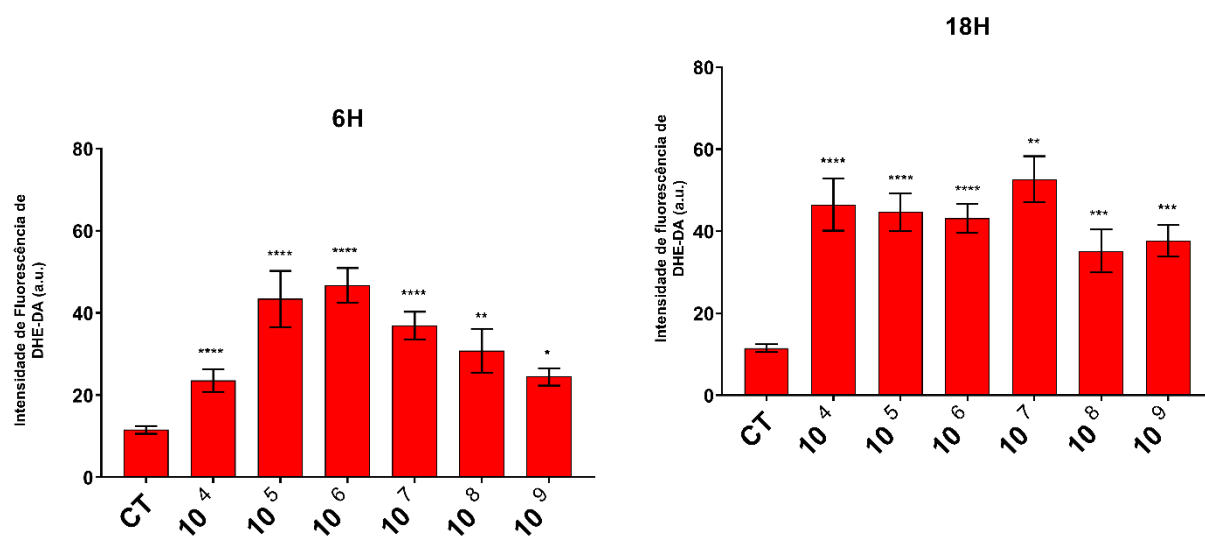
**Figura 7.** Quantificação do número de células viáveis e da porcentagem de inibição do crescimento de *Entamoeba histolytica*. (a) Número de células viáveis após a associação do parasita *E. histolytica* com o probiótico *E. coli* Nissle, submetido a diferentes concentrações ( $10^2$ – $10^9$ ) em vários intervalos de tempo, em uma placa de 96 poços. (b) Impacto dos probióticos na inibição de trofozoítos de *E. histolytica* em diferentes períodos e em concentrações variáveis.

### 5.1.2. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

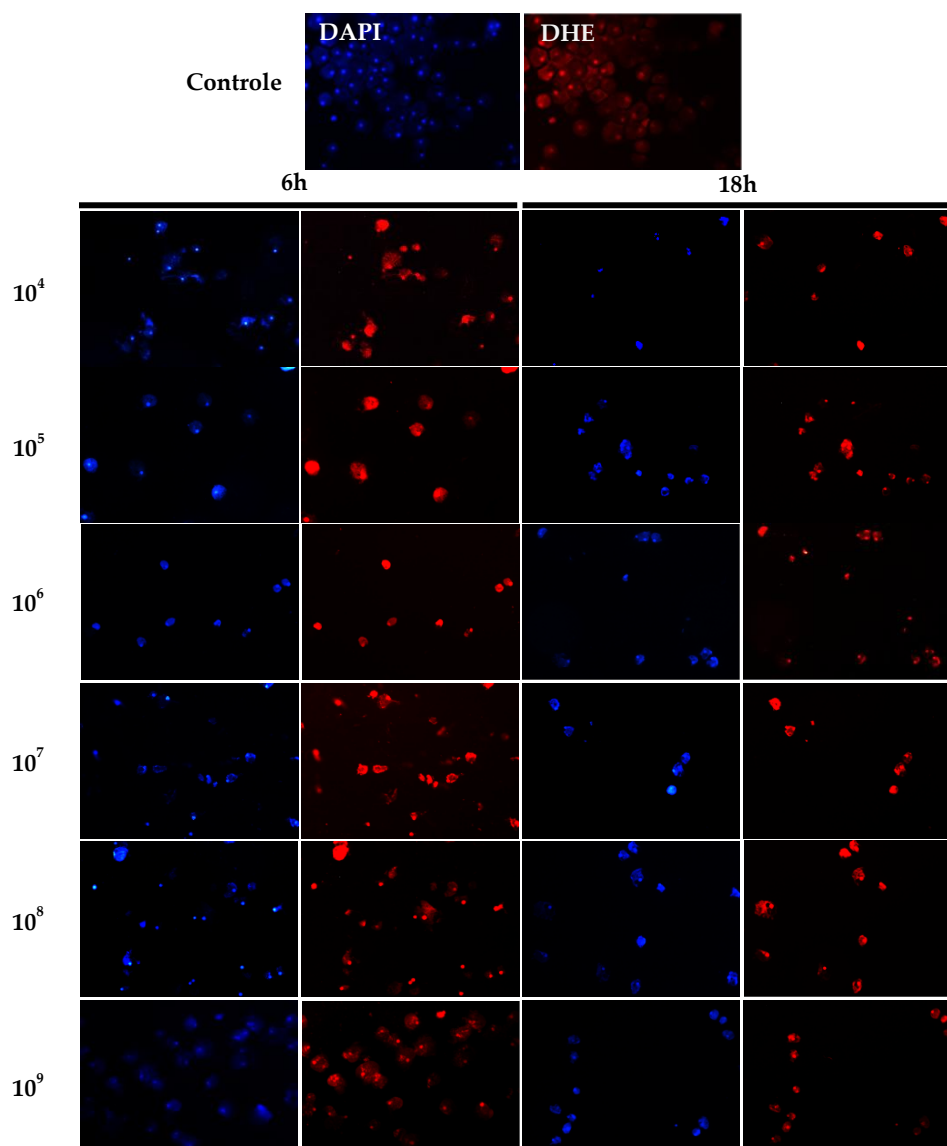
A produção de superóxido e peróxido de hidrogênio foi avaliada na co-cultura de EcN e *E. histolytica*. Focamos a análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em 6 horas e 18 horas. Esses são os dois extremos do nosso delineamento experimental e mostraram diferenças significativas no número de trofozoítos entre eles.

Um aumento na produção de ambos os compostos foi observado em todos os pontos de tempo de associação e concentrações probióticas (Figura 8 e 9).

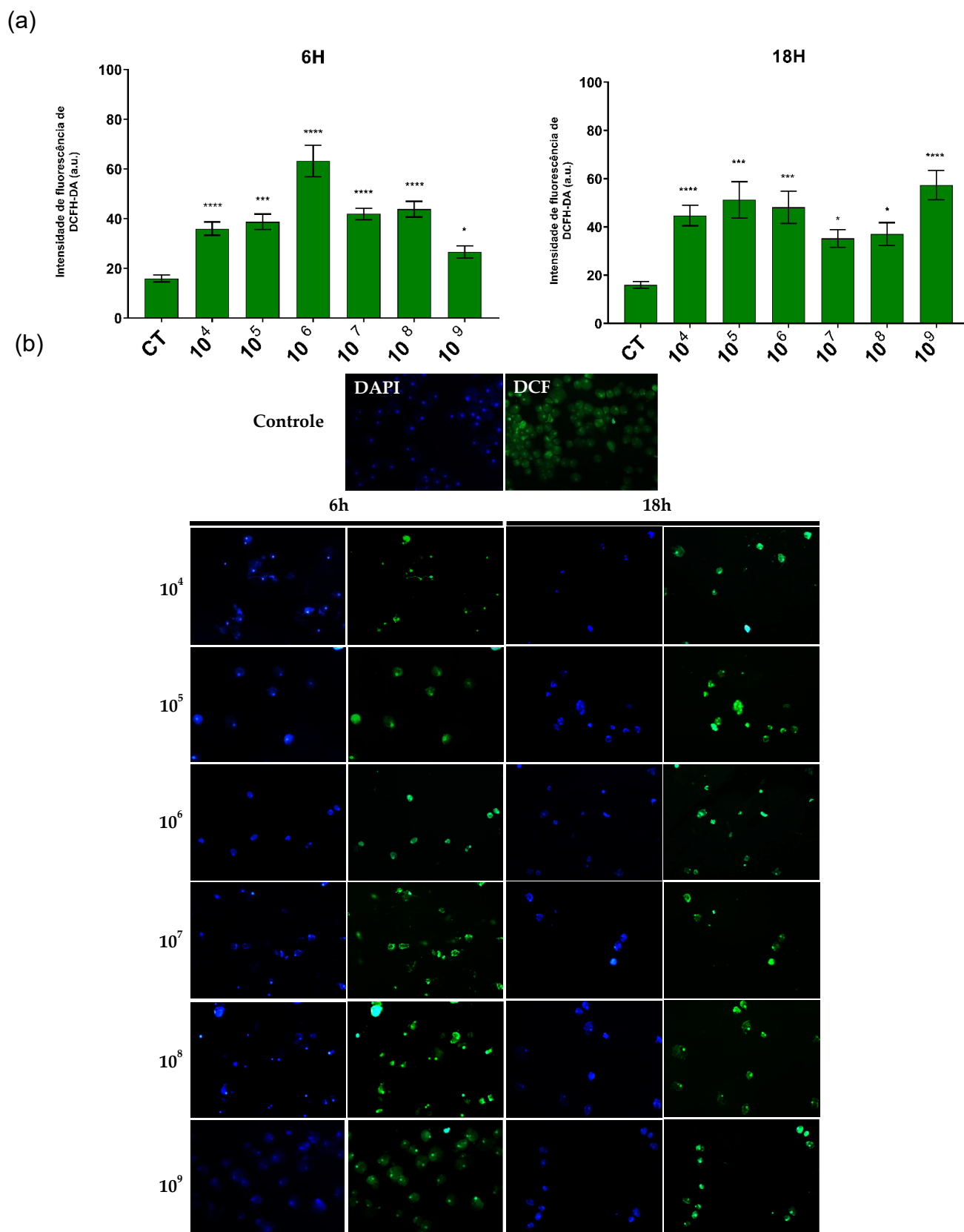
(a)



(b)



**Figura 8.** Produção de ROS avaliada por fluorescência de DHE e DCF em trofozoítos de *Entamoeba histolytica* tratados com *Escherichia coli* Nissle. (a) Quantificação da intensidade de fluorescência de DHE –DA em cada grupo. (b) Imagens microscópicas de fluorescência da produção intracelular de coloração de DHE-DA em *E. histolytica* após interação com o probiótico *E. coli* Nissle em diferentes concentrações ao longo de 6 horas e 18 horas.



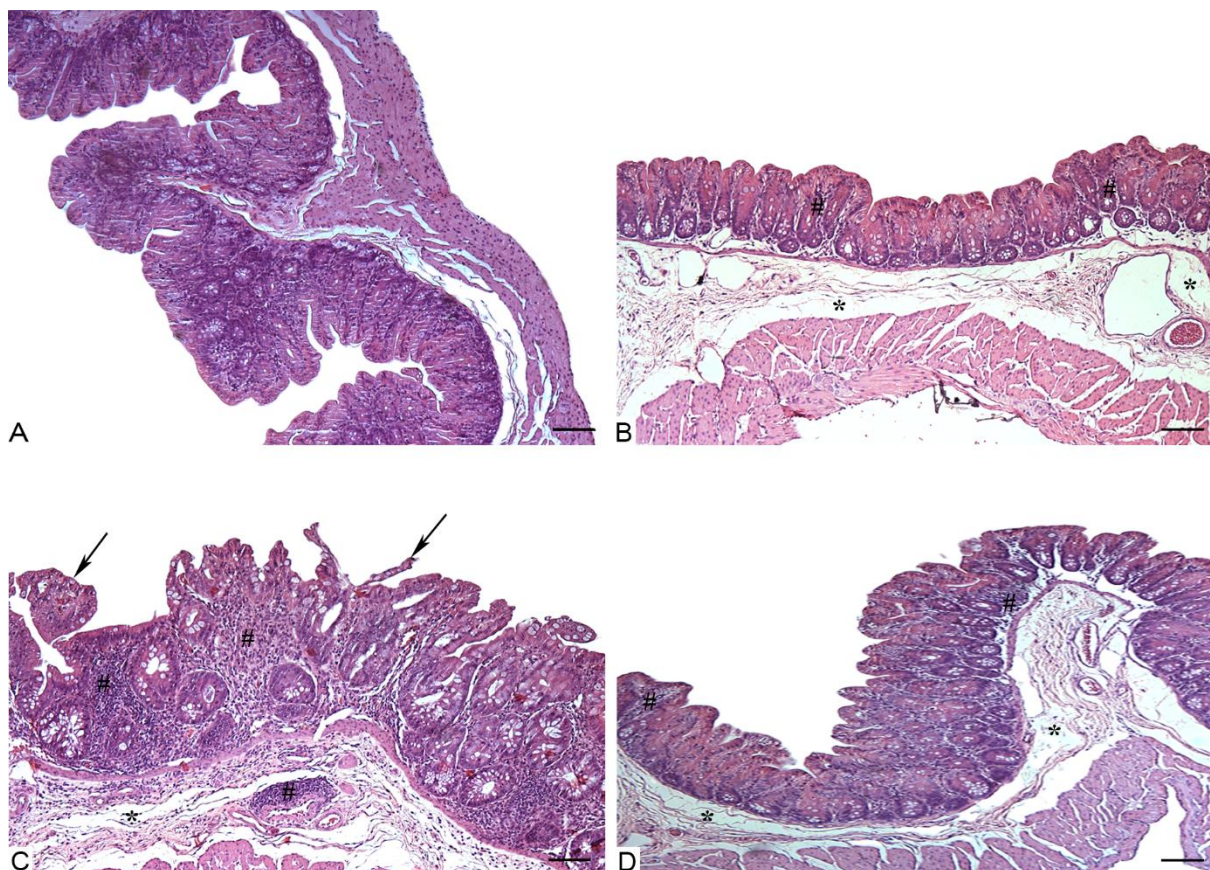
**Figura 9.** Produção de ROS avaliada por fluorescência DCFH-DA em trofozoítos de *Entamoeba histolytica* tratados com *Escherichia coli* Nissle. (a) Quantificação da intensidade de fluorescência DCFH –DA em cada grupo. (b) Imagens microscópicas de fluorescência da produção intracelular de coloração DCFH-DA em *E. histolytica* após interação com o probiótico *E. coli* Nissle em diferentes concentrações ao longo de 6 horas e 18 horas.

## 5.2. Resultados *in vivo*

### 5.2.1. Análise histopatológica e morfometria das alterações presentes no ceco

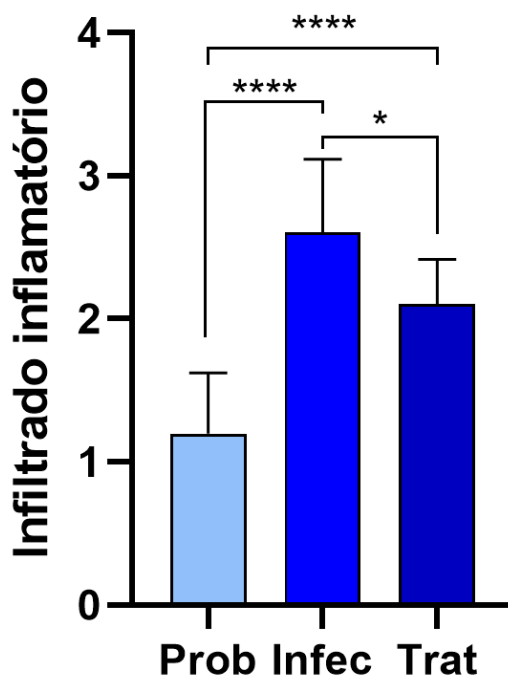
A análise histopatológica revelou no grupo controle (Ct), mucosa com aspecto habitual, exibindo epitélio colunar simples bem preservado, criptas definidas e ausência de infiltrado inflamatório significativo, com arquitetura tecidual organizada e sem evidências de edema ou degeneração (Figura 10A). O grupo probiótico (Prob) manteve características similares ao controle, com preservação da estrutura epitelial, embora se observasse discreto aumento na espessura da mucosa e leve proliferação de células caliciformes, sem alterações inflamatórias relevantes, indicando que a administração isolada do probiótico não promoveu dano tecidual (Figura 10B).

Em contraste, o grupo infectado (Infec) exibiu marcantes alterações morfológicas, incluindo regiões com descamação epitelial, encurtamento das criptas, intenso infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa, atingindo a submucosa, edema da submucosa, além de focos de necrose e erosão mucosa, compatíveis com lesão tecidual induzida pela infecção por *E. histolytica* (Figura 10C). O grupo tratado (Trat) apresentou as mesmas alterações histopatológicas, variando de intensidade, de discretas a moderadas em comparação ao grupo infectado, sendo evidente a redução do infiltrado inflamatório e preservação relativa das criptas, sugerindo efeito terapêutico do probiótico na modulação da resposta à infecção amebiana (Figura 10D).



**Figura 10.** Ceco de Gerbils infectados com trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle. A) Grupo controle; aspecto histológico compatível com o cólon normal. B) Grupo gavado com Probiótico0: (\*) edema da submucosa, (#) infiltrado inflamatório, barra = 100µm; C) Grupo infectado e não tratado com o probiótico: (\*) edema da submucosa, (#) infiltrado inflamatório, (setas) erosão da mucosa cecal barra = 100µm; D) Grupo infectado com *Entamoeba histolytica* e tratado com o probiótico: (\*) edema da submucosa, (#) infiltrado inflamatório, barra = 100µm. Coloração Hematxilina e Eosina.

A análise semi-quantitativa do infiltrado inflamatório revelou diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 11). O grupo Infec apresentou os maiores níveis de infiltrado inflamatório, indicando intensa resposta inflamatória frente à infecção. O grupo Trat, submetido à intervenção terapêutica, exibiu uma redução significativa no infiltrado inflamatório em comparação ao grupo Infec, embora ainda apresentasse níveis superiores ao grupo Prob. Por fim, o grupo Prob demonstrou os menores valores de infiltrado inflamatório. Esses dados sugerem que o tratamento aplicado foi capaz de atenuar, mas não eliminar totalmente, o processo inflamatório induzido pela infecção.

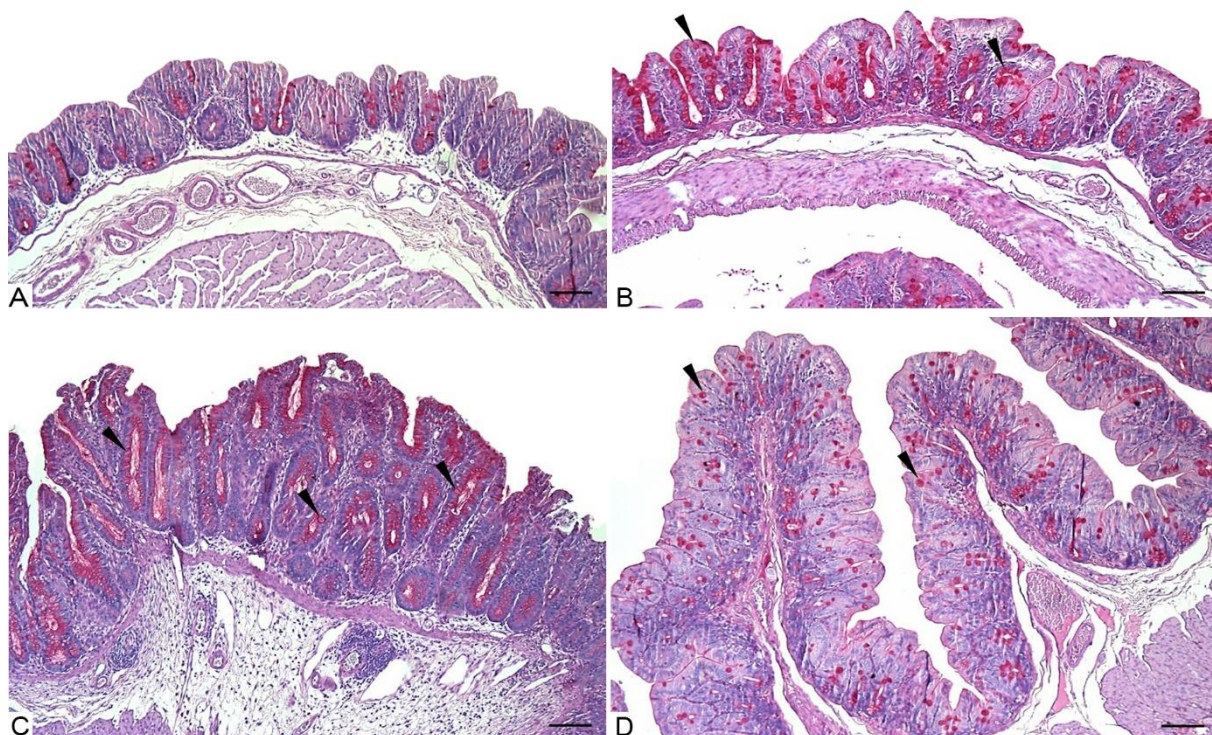


**Figura 11.** Análise do infiltrado inflamatório presente no ceco de Gerbils. O Gráfico demonstra a intensidade da coloração com hematoxilina e eosina (HE) em cortes do ceco de *Meriones unguiculatus* (Gerbil) nos diferentes grupos experimentais: Ct (controle), Prob (tratado com probiótico), Infec (infectado com *Entamoeba histolytica*) e Trat (infectado e tratado com probiótico). O grupo Infec apresentou alterações estruturais significativas na mucosa cecal, enquanto o grupo Trat mostrou preservação parcial das estruturas, evidenciando possível ação terapêutica do probiótico. (\*) =  $p < 0,0176$ ; (\*\*\*\*) =  $p < 0,0001$ .

### 5.2.2. Análise histopatológica e morfométrica da área de muco

A análise histopatológica revelou que os gerbils pertencentes ao grupo controle (Ct), apresentava presença de células caliciformes distribuídas uniformemente ao longo da mucosa cecal, com criptas bem organizadas e padrão regular de deposição de mucinas, compatível com aspecto habitual da mucosa cecal em animais saudáveis (Figura 12A). O grupo probiótico (Prob) apresentou leve aumento da área PAS+, caracterizado por maior densidade de células caliciformes e acúmulo mais evidente de muco no lúmen das criptas (Figura 12B). O grupo infectado (Infec) exibiu aumento acentuado da área PAS+, com aumento evidente do número de células caliciformes, ocorrendo paralelo a perda da integridade da mucosa, alteração essa consistente com o dano epitelial induzido pela infecção

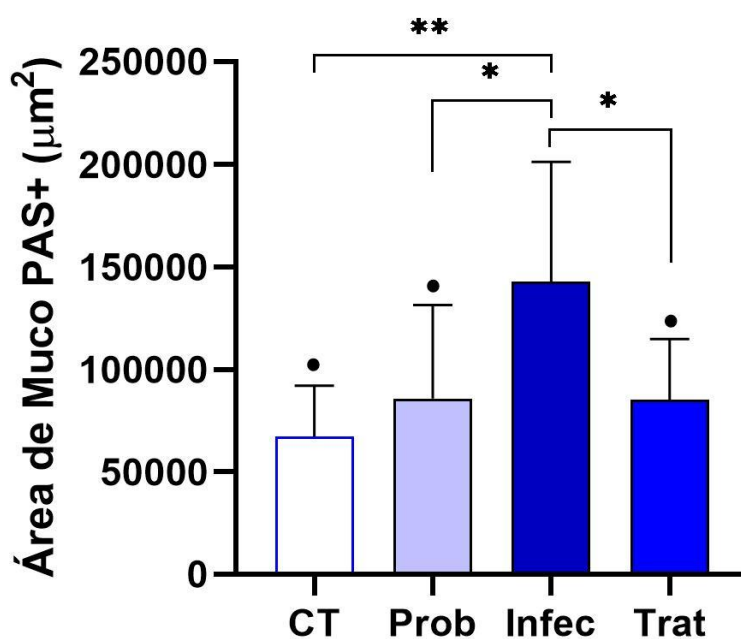
por *E. histolytica* (Figura 12C). O grupo tratado (Trat) apresentou redução da área PAS+, evidenciada pela redução do número de células caliciformes, indicando que o tratamento com EcN modulou a secreção de muco durante a infecção (Figura 12D).



**Figura 12.** Cortes histológicos do ceco de Gerbils corados com PAS. A) Grupo controle; B) Grupo tratado com Probiótico: células caliciformes abarrotadas de muco (cabeça de seta), barra = 100 $\mu$ m; C) Grupo infectado e não tratado com probiótico: células caliciformes abarrotadas de muco (cabeça de seta), barra = 100 $\mu$ m; D) Grupo infectado com *Entamoeba histolytica* e tratado com o probiótico: mostrando redução do número de células caliciformes (cabeça de seta), barra = 100 $\mu$ m. Coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS).

A análise morfométrica da área PAS<sup>+</sup> ( $\mu\text{m}^2$ ) entre os grupos experimentais revelou que o grupo Infec apresentou a maior média (118.749,06  $\mu\text{m}^2$ ), indicando maior produção de muco associada a intenso infiltrado inflamatório. Esse resultado foi significativo em relação aos grupos CT (66.231,71  $\mu\text{m}^2$ ), Trat (85.127,90  $\mu\text{m}^2$ ) e Prob (85.697,90  $\mu\text{m}^2$ ). Esses achados indicam que a presença de EcN contribuiu para a redução da área de deposição de muco.

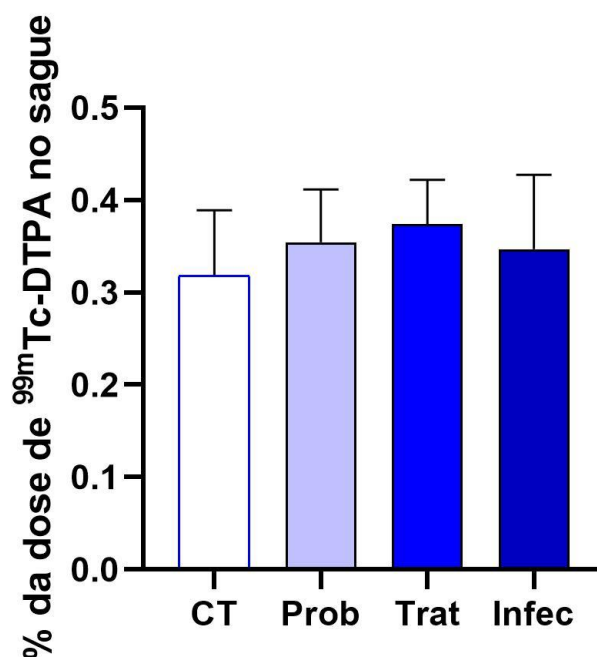
Por fim, o grupo CT (66.231,71  $\mu\text{m}^2$ ), Trat (85.127,90) e o grupo Prob (85.697,90  $\mu\text{m}^2$ ) não apresentaram variações significativas na área PAS<sup>+</sup>. A comparação entre os grupos reforça que a infecção provoca um aumento expressivo na área de muco, enquanto o tratamento testado exerce um efeito modulador sobre essa resposta (Figura 13).



**Figura 13.** Análise morfométrica da área PAS<sup>+</sup> no ceco de Gerbils infectados e tratados ou não com *Escherichia coli* Nissle. Gráfico demonstrando a área de muco avaliada na mucosa. Ct (controle, não infectado), Prob (tratado apenas com probiótico), Infec (infectado com *Entamoeba histolytica*) e Trat (infectado com *Entamoeba. histolytica* e tratado com probiótico). (\*) =  $p < 0,002$ ; (\*) =  $p < 0,043$ ; (•) = não significativo.

### 5.2.3. Análise de permeabilidade intestinal

A análise da permeabilidade intestinal nos diferentes grupos experimentais não revelou diferenças estatisticamente significativas. O grupo controle (CT) apresentou o menor valor médio de permeabilidade (0,318), considerado como referência da integridade fisiológica da mucosa intestinal. O grupo que recebeu apenas o probiótico (Prob) apresentou valor levemente superior (0,354), seguido pelo grupo infectado com *E. histolytica* (Infec), com valor de 0,347. O grupo tratado com probiótico após a infecção (Trat) apresentou o maior valor médio observado (0,374). Apesar dessas variações numéricas, a ausência de significância estatística entre os grupos indica que não houve alteração consistente e mensurável na permeabilidade intestinal (Figura 14).



**Figura 14.** Avaliação da permeabilidade intestinal em gerbils nos diferentes grupos experimentais. Os valores representam a média dos níveis de permeabilidade intestinal (unidades arbitrárias) nos grupos: controle (CT), probiótico sem infecção (Prob), infectado com *Entamoeba histolytica* (Infec) e infectado tratado com probiótico (Trat). Apesar das variações numéricas observadas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

#### 5.2.4. Expressão de mRNA de Citocinas nos Grupos Experimentais

A quantificação da expressão gênica relativa de diferentes citocinas foi realizada nos grupos experimentais. Foram analisadas as citocinas IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ . Os grupos não apresentaram diferença significativa  $p < 0,05$ .

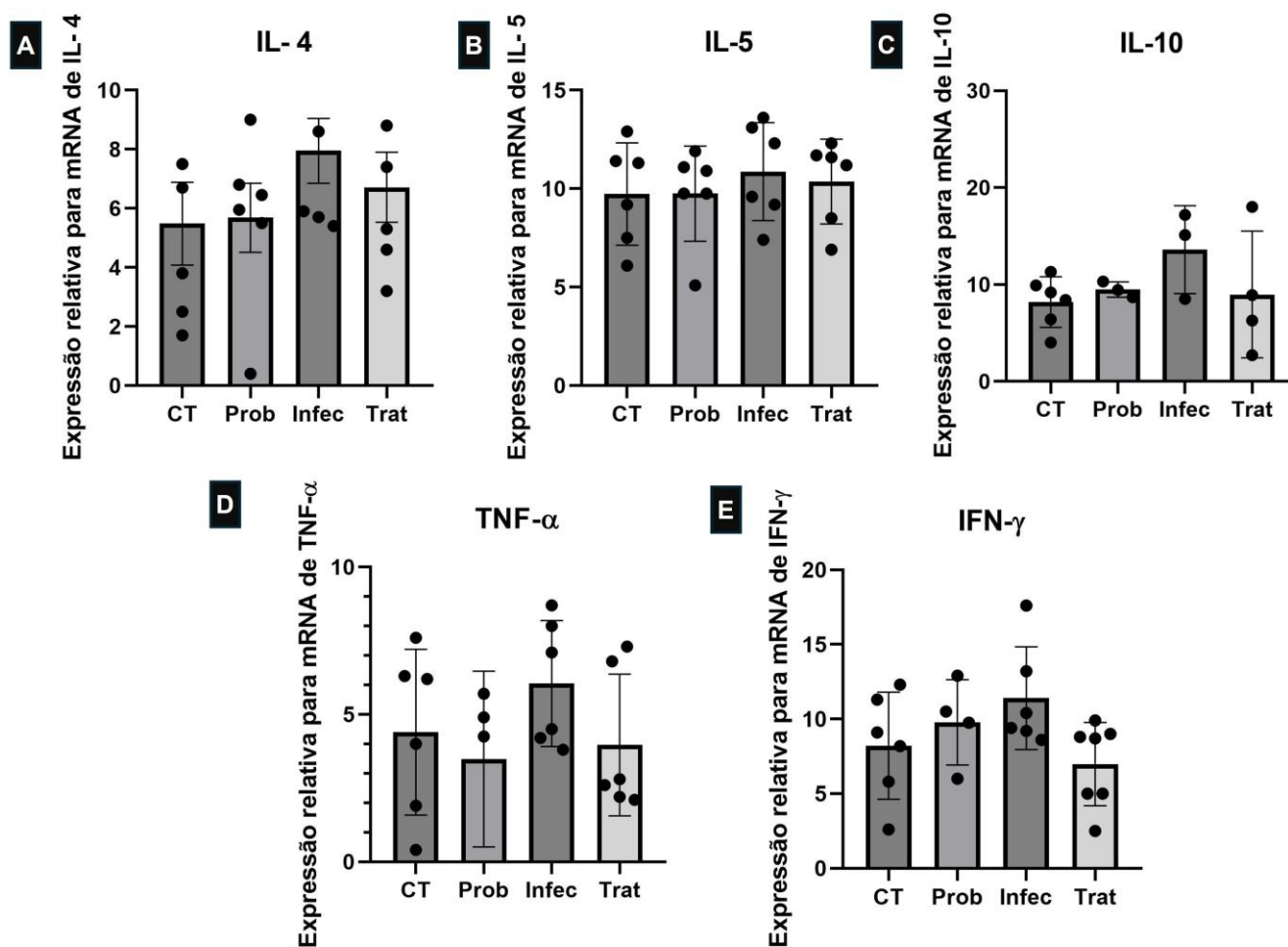
A expressão do mRNA para IL-4 apresentou-se relativamente estável entre os grupos experimentais (Figura 15A). O grupo Prob exibiu valores semelhantes ao controle, indicando que o probiótico isolado não induziu mudanças relevantes na transcrição de IL-4. O grupo infectado e tratado (Trat) também apresentou expressão semelhante aos demais grupos. O grupo infectado e não tratado (Infec), por sua vez, demonstrou uma tendência a elevação na média da expressão de IL-4.

A expressão relativa de IL-5 mostrou-se bastante consistente entre os grupos (Figura 15B), não apresentando diferenças estatísticas significativas entre eles.

A expressão de mRNA para IL-10 apresentou um padrão mais distinto entre os grupos (Figura 15C). Entretanto também não foi evidenciado diferenças estatísticas entre os grupos. O grupo controle (CT) e o grupo Prob mostraram níveis médios similares. O grupo infectado e tratado (Trat) apresentaram tendência a redução na média de expressão, sugerindo uma possível supressão da resposta anti-inflamatória mediada por IL-10 durante a infecção, mesmo com a intervenção probiótica. Por outro lado, os grupos infectados e não tratados (Infec) demonstrou aumento na média de IL-10.

A expressão relativa de TNF- $\alpha$ , citocina característica da resposta inflamatória aguda, apesar de não ser evidenciado diferença estatística, foi mais elevada no grupo infectado e não tratado (Infec), sugerindo um aumento da inflamação associada à infecção (Figura 15D). O grupo controle (CT) e o grupo Prob apresentaram níveis basais semelhantes. O grupo Trat mostrou níveis intermediários, indicando que o tratamento com EcN pode ter atenuado parcialmente a produção de TNF- $\alpha$ .

A expressão de mRNA para IFN- $\gamma$ , apesar de não apresentar diferenças estatísticas significativas (Figura 15E). O grupo controle (CT) e o grupo Prob apresentaram níveis semelhantes. O grupo infectado e tratado (Trat) demonstrou discreta redução na expressão, enquanto o grupo infectado e não tratado (Infec) exibiu a maior média de expressão de IFN- $\gamma$ .



**Figura 15.** Expressão relativa do mRNA de citocinas nos diferentes grupos experimentais: Controle (CT), Probiótico (Prob), Infectado (Infec) e Trat. (A) IL-4: Leve aumento da expressão nos grupos Infec e Trat, em comparação ao controle. (B) IL-5: Todos os grupos apresentaram níveis semelhantes, com ligeira elevação no grupo Trat. (C) IL-10: Aumento expressivo da expressão no grupo Infec, enquanto o grupo Trat apresentou redução em relação ao grupo infectado. (D) TNF- $\alpha$ : Expressão estável entre os grupos. (E) IFN- $\gamma$ : Discreta elevação nos grupos Prob e Infec, seguida de redução no grupo Trat.

## 6. DISCUSSÃO

A amebíase, doença causada pela *E. histolytica*, permanece como um problema de saúde pública relevante, principalmente em regiões com condições sanitárias precárias. Atualmente, o tratamento da amebíase é baseado em compostos derivados dos nitroimidazóis, como o metronidazol, que atua por meio da geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares que causam danos em organelas e comprometem estruturas do parasita (MORÁN et al., 2023; DUCHÊNE, 2014). Contudo, os efeitos colaterais desse fármaco, bem como relatos crescentes de cepas resistentes, têm incentivado a busca por alternativas terapêuticas eficazes e seguras. Nesse contexto, os probióticos têm se mostrado opções promissoras, seja como adjuvantes terapêuticos, seja como alternativas preventivas e/ou terapêuticas (DE OLIVEIRA et al., 2024).

Em nosso estudo, investigamos o potencial efeito amebicida direto do probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917 sobre *E. histolytica*. A cepa EcN é reconhecida por sua capacidade de modular positivamente a microbiota intestinal e reforçar a integridade da mucosa gastrointestinal, além de possuir propriedades antimicrobianas bem estabelecidas em modelos bacterianos (SHI et al., 2023). No entanto, sua atividade frente a protozoários intestinais, como *E. histolytica*, ainda é pouco compreendida. Nossos resultados mostraram que o EcN foi capaz de inibir significativamente a proliferação dos trofozoítos de *E. histolytica* em todas as concentrações testadas (de  $10^2$  a  $10^9$  UFC/mL) e em todos os tempos avaliados (6 h, 12 h e 18 h). O efeito inibitório foi mais expressivo após 18 horas de exposição, particularmente na concentração de  $10^9$  UFC/mL, atingindo níveis de inibição superiores a 80%.

Esses dados estão em concordância com os resultados de Sarjapuram *et al.* (2017), que demonstraram a capacidade de *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium* em inibir o crescimento de *E. invadens*, um modelo amplamente utilizado para o estudo de *E. histolytica*. Os autores observaram que concentrações mais altas, em torno de  $10^9$  UFC/mL, promoveram até 80% de inibição do parasita, corroborando a ideia de que a ação probiótica amebicida depende diretamente da densidade celular bacteriana.

Além da inibição da proliferação, em nosso estudo observou-se a produção de EROs, com destaque para o superóxido e o peróxido de hidrogênio. Ambas as moléculas foram detectadas em níveis elevados após a co-incubação entre EcN e *E. histolytica*. O aumento na produção de superóxido foi mais elevado nas concentrações de  $10^6$  UFC/mL após 6 horas, e de  $10^7$  UFC/mL após 18 horas. O peróxido de hidrogênio apresentou elevado nas mesmas condições iniciais ( $10^6$  UFC/mL, 6h), com nível ainda mais acentuado significativamente e eficaz na concentração de  $10^9$  UFC/mL após 18 horas.

Em nosso estudo sugerimos que a produção de EROs é dependente da concentração e do tempo de exposição ao probiótico. Além disso, destacamos que a concentração mais eficaz do probiótico  $10^9$  UFC/m por nós observada, está em concordância com as diretrizes internacionais para uso terapêutico de probióticos (WGO, 2023). Essa faixa de concentração é a mais comum em estudos clínicos e está associada à indução de efeitos funcionais na microbiota e na mucosa intestinal humana, conferindo validade prática e translacional aos nossos dados (BAI; CIACCI 2017).

Em um estudo conduzido por Sarid *et al.* (2022), foi demonstrado que *Lactobacillus acidophilus* é capaz de reduzir em até 50% a viabilidade de trofozoítos de *E. histolytica* após duas horas de exposição, efeito mediado principalmente pela liberação de  $H_2O_2$ . A adição de catalase ao sistema experimental aboliu completamente a atividade amebicida, confirmando o papel essencial do peróxido de hidrogênio nesse contexto. Este estudo também revelou, por meio de proteômica redox, que diversas enzimas amebianas cruciais foram oxidadas em presença do probiótico, incluindo a Gal/GalNAc lectina e cisteína proteases, sugerindo inativação de fatores de virulência do parasita.

A capacidade dos trofozoítos de resistirem ao estresse oxidativo é limitada, devido à ausência de enzimas antioxidantes como catalase e glutathione redutase, como demonstrado por Shahi e colaboradores (2016). O principal tiol intracelular da ameba é a L-cisteína, e o sistema antioxidante se baseia em proteínas como peroxirredoxinas e rubreritinas. No entanto, mesmo esses mecanismos mostram-se insuficientes frente a uma carga elevada de EROs, o que torna o parasita altamente vulnerável a alterações redox severas. Nossos achados, ao demonstrar aumento de EROs na cultura amebiana em resposta a presença EcN, sugerem que o probiótico

pode inibir a proliferação e eliminar trofozoítos amebianos, atuando por mecanismo semelhante ao do metronidazol, mas com potenciais vantagens em termos de segurança e ausência de toxicidade sistêmica.

Ao avaliarmos a morfologia dos trofozoítos amebianos em contato com EcN, constatamos que estes apresentaram alterações morfológicas. Os trofozoítos apresentaram formato arredondado, vacuolização citoplasmática, redução de tamanho e redução da granulosidade sugerindo perda do conteúdo intracelular, indicando danos morfofuncionais severos. Essas observações são compatíveis com morte celular induzida por estresse oxidativo, descrita previamente por Varet *et al.* (2018), ao observarem que a exposição a certas bactérias intestinais pode alterar o comportamento de *E. histolytica* frente ao estresse oxidativo. Embora o estudo tenha sido direcionado a proteção conferida por enterobactérias, os autores também reconheceram que algumas interações bacterianas podem exacerbar a resposta oxidativa amebiana, levando à perda de viabilidade.

O potencial antimicrobiano de EcN também pode ser atribuído a outras propriedades além da produção de EROs. Estudos demonstraram que esse probiótico é capaz de promover a modulação da barreira epitelial intestinal. Zyrek e colaboradores (2007) demonstraram que EcN induz a redistribuição e expressão aumentada de proteínas de junção, como ZO-2, restaurando a integridade da barreira intestinal em modelos de epitélio desorganizado. Esse efeito foi mediado pela inibição de PKC $\zeta$ , uma quinase chave na sinalização inflamatória intestinal.

Corroborando essa ideia, Hering *et al.* (2013) demonstraram que a proteína TcpC de EcN atua na ativação de PKC $\zeta$  e ERK1/2, promovendo a expressão de claudina-14, uma proteína de junção estreita associada à manutenção da seletividade celular. Nós sugerimos que restauração da integridade da mucosa intestinal por EcN, além de limitar a translocação de patógenos intestinais, pode também dificultar a adesão e invasão de *E. histolytica*, cujos trofozoítos dependem de uma mucosa desorganizada para exercerem seus efeitos citopáticos.

A colite amebiana configura a perda da integridade da mucosa intestinal, promovendo intensa resposta inflamatória podendo ocorrer ulceração da mucosa com comprometimento da submucosa e por vezes muscular. Um dos objetivos deste estudo, consta avaliar os efeitos da bactéria *Escherichia coli* Nissle na colite amebiana. Ao realizarmos análise histopatológica verificamos alterações

morfológicas no ceco gerbils infectados com *E. histolytica*, tratados ou não com EcN.

A análise histopatológica revelou que o grupo Infectado exibiu intenso infiltrado inflamatório na mucosa intestinal, por vezes com descamação das vilosidades, edema e áreas sugestivas de necrose focal. Estes achados estão alinhados com o observado por Oliveira e colaboradores (2012), que observaram ulcerações e erosões na mucosa intestinal de camundongos infectados por *E. histolytica*. Entretanto, em nosso estudo, quando realizado o tratamento com EcN, foi observado lesões menos intensas em relação ao grupo infectado, com diminuição significativa do infiltrado inflamatório.

Coletivamente nossos resultados *in vivo*, sugerem que a atenuação da lesão, ocorre devido a ação da *E. coli* Nissle, que possivelmente contribuiu com a modulação da resposta inflamatória. De fato, foi descrito que a bactérias probióticas podem competir por receptores com patógenos intestinais, além de contribuírem com a produção de substâncias antimicrobianas e modulação da imunidade local, mecanismos descritos para outras bactérias probióticas (KHALAF, 2013; MOHAMED, 2014).

Estudos com *Lactobacillus acidophilus* (KHALAF, 2013) demonstraram efeitos semelhantes, com diminuição do infiltrado inflamatório e aceleração da reparação tecidual em modelos murinos de amebíase. Prado e colaboradores (2020) também relataram que *Weissella paramesenteroides* WpK4 reduziu significativamente as áreas necróticas e aumentou a expressão de CDC-47, um marcador de proliferação epitelial, indicando intensa regeneração da mucosa. Em nosso estudo, além de verificarmos lesões menos intensas, também observamos frequentemente regeneração de enterócitos no grupo tratado. Nós acreditamos que *E. coli* Nissle atua não apenas como barreira competitiva ao parasito, mas possivelmente como agente indutor de reparação tecidual.

No grupo probiótico, não foram detectadas alterações histológicas relevantes, mantendo-se o padrão morfológico semelhante ao do grupo controle. Em nosso trabalho, isso indica que o probiótico não desencadeou resposta inflamatória ou dano tecidual em condições fisiológicas, corroborando com dados da literatura que enfatizam a segurança reportada para probióticos como *B. longum* (FONSECA, 2019) e *L. salivarius* (MOHAMMED, 2015).

No grupo tratado, observamos redução da área de muco, sugerindo que a administração de EcN modulou a produção de muco e reduziu a proliferação de células caliciformes. Nossos resultados contrastam com os achados de Fonseca (2019) e Prado et al. (2020), bem como com outros estudos que relataram aumento da área de muco e/ou da expressão de MUC-2 em modelos experimentais tratados com probióticos. Hafez (2012) demonstrou que EcN induz a expressão de diversos genes de mucinas (MUC2, MUC3, MUC5AC e MUC5B) em células HT-29.

Em modelo murino de colite induzida por Sulfato de Dextrana Sódica (DSS), Rodríguez-Nogales et al. (2018) relataram que EcN preveniu o dano colônico e aumentou a expressão de MUC-2. De forma semelhante, Ye et al. (2025) observaram que EcN elevou o número de células caliciformes e aumentou a expressão de MUC-2 em modelo de diarreia inflamatória crônica. Considerando os resultados obtidos, torna-se necessário investigações adicionais que permitam elucidar os mecanismos pelos quais o grupo tratado apresentou redução na produção de muco.

O grupo probiótico manteve áreas de marcação PAS semelhante ao controle, sem redução da camada de muco, confirmando que o probiótico sozinho não interfere na produção de muco. Corroborando com relatos de outros autores, que evidenciaram com *Saccharomyces boulardii* (RIBEIRO, 2018) e *Bifidobacterium* (MOHAMED, 2014) indicam que probióticos podem atuar na homeostase intestinal, reforçando a barreira mucosa em condições normais e patológicas.

Estudos conduzidos por outros autores relatam um consenso quanto à capacidade dos probióticos de modular a resposta imune e estrutural do intestino durante infecções parasitárias. Das (2024) destacou que cepas de *Limosilactobacillus* isoladas de bebidas fermentadas apresentaram potente atividade anti-amebiana *in vitro* e *in vivo*, com efeitos benéficos na integridade do epitélio e modulação de citocinas pró-inflamatórias. Em nosso estudo, lesões menos intensas associadas a menor produção de muco observadas no grupo tratado sugerem que EcN pode atuar mecanismos por mecanismos distintos: competição com o parasito, produção de substâncias antimicrobianas e estímulo da imunidade celular da barreira mucosa.

Além disso, estudos como o de Khalaf (2013) e Mohamed (2014) reforçam a importância do pré-tratamento probiótico, que reduz a carga parasitária e acelera a resolução das lesões. Khalaf (2013) relatou que *L. acidophilus* apresentou eficiência terapêutica de 68,3%, próxima à do metronidazol (67,5%), com melhora histológica significativa. Em nosso trabalho, embora não haja comparação direta com fármacos convencionais, os achados histopatológicos demonstram uma recuperação notável no grupo tratado com probiótico, sugerindo que EcN pode desempenhar papel terapêutico similar.

Os resultados obtidos em nosso trabalho com evidências de que probióticos podem ser um adjuvante promissor ao tratamento convencional da amebíase. Considerando que a resistência ao metronidazol e os efeitos colaterais são desafios clínicos atuais (Mohammed, 2015), a aplicação de cepas como EcN, reconhecida como segura em outros contextos gastrointestinais, pode representar um avanço no manejo terapêutico.

Alguns resultados *in vivo* de nosso estudo não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, mas revelam tendências biológicas consistentes. A análise da expressão gênica de citocinas tais como IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , embora sem significância estatística, evidencia padrões coerentes com a literatura sobre amebíase experimental.

A IL-4 manteve-se relativamente estável, com leve aumento no grupo infectado não tratado, sugerindo uma ativação moderada da resposta Th2, possivelmente associada ao reparo tecidual e modulação da inflamação (Oliveira et al., 2012; Mohamed, 2014). A IL-5 permaneceu constante, indicando ausência de recrutamento eosinofílico relevante nesse modelo.

A IL-10, principal citocina anti-inflamatória, aumentou expressivamente no grupo infectado não tratado, padrão descrito como resposta compensatória ao dano tecidual (Oliveira et al., 2012; Das, 2024). No grupo tratado com *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN), os níveis foram menores, sugerindo menor necessidade de contra-regulação imunológica, em consonância com a redução observada na histopatologia.

O TNF- $\alpha$  foi elevado no grupo infectado não tratado, compatível com a intensa inflamação local. No grupo tratado houve diminuição, o que sugere que EcN pode limitar a ativação de vias pró-inflamatórias, possivelmente por modulação da sinalização via NF- $\kappa$ B (Zyrek et al., 2007; Hering et al., 2013).

O IFN- $\gamma$  apresentou leve aumento nos grupos infectados não tratados, padrão esperado na ativação da resposta Th1 frente ao protozoário. A redução observada no grupo tratado aponta para uma possível atuação de mecanismos alternativos como produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e reforço da barreira mucosa.

Ao analisar o conjunto desses resultados, percebe-se um padrão de imunomodulação descrito para probióticos: indução concomitante de citocinas pró- (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e anti-inflamatórias (IL-10), promovendo a homeostase imunológica, exatamente o perfil observado em nosso estudo (Sheil et al., 2006; McCarthy et al., 2003).

Estudos mais recentes fortalecem esse conceito. Ma et al. (2021) demonstraram que *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* atenuaram colite e déficits cognitivos em modelo murino ao modularem as razões IFN- $\gamma$ /IL-10 e TNF- $\alpha$ /IL-10, reforçando que a modulação dessas proporções tem impacto biológico significativo mesmo quando os níveis absolutos não variam dramaticamente.

A razão IFN- $\gamma$ /IL-10 pode servir como indicador funcional mais sensível do que os valores absolutos. Estudos clínicos mostram que probióticos que elevam essa proporção aumentam significativamente a citotoxicidade de células NK. Experimentalmente, *L. acidophilus* preserva a integridade epitelial mesmo na presença de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  in vitro, sugerindo que EcN pode exercer efeitos protetores na barreira intestinal independentemente de mudanças estatísticas nos marcadores inflamatórios (Sheil et al., 2006).

Por fim, modelos murinos com deficiência em IL-10 comprovaram que probióticos como *Bifidobacterium infantis* podem modular a expressão de IFN- $\gamma$  por meio de mecanismos independentes dessa citocina reguladora — possivelmente envolvendo GALT ou sinalização local (Sheil et al., 2006), o que pode explicar o perfil de citocinas moderado observado em nosso experimento.

Assim, ainda que não tenha sido verificado significância estatística, o padrão de aumento de citocinas pró- (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) no grupo infectado, com redução parcial no grupo tratado, é coerente com a hipótese de que EcN atua como modulador imune, mitigando inflamação excessiva sem comprometer a defesa contra *E. histolytica*. Esse perfil imunológico foi descrito para outros probióticos em modelos de amebíase e giardíase (Khalaf, 2013; Prado et al., 2020; Das, 2024) e pode ser um mecanismo central para a atenuação das lesões intestinais observadas.

## 7. Conclusão

Os resultados *in vitro* deste estudo demonstram que *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) apresenta atividade amebicida significativa contra trofozoítos de *E. histolytica*, caracterizada pela redução da viabilidade e por alterações morfológicas dos trofozoítos. Esse efeito foi mais pronunciado na concentração de  $10^9$  UFC/mL após 18 horas de incubação, indicando uma relação dependente de dose e tempo. O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxido e peróxido de hidrogênio, sugere um novo mecanismo de ação do EcN, que provavelmente contribui para seus efeitos inibitórios. As alterações morfológicas observadas, arredondamento, vacuolização e redução do tamanho, indicam danos estruturais e funcionais induzidos pelo probiótico.

Os resultados *in vivo* mostram que a infecção por *E. histolytica* provoca danos importantes à mucosa intestinal, com intenso infiltrado inflamatório, na mucosa e submucosa. A administração do EcN após a infecção resultou em uma tendência parcial desses parâmetros, evidenciada pela redução do infiltrado inflamatório, reorganização parcial da mucosa e modulação da secreção de muco.

Além disso, a análise da expressão gênica das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  revelou tendências de modulação da resposta imune, com aumento das citocinas pró- e anti-inflamatórias na infecção não tratada e redução parcial nos animais tratados com EcN. Embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, o padrão observado sugere que o probiótico atua equilibrando a resposta imunológica local, contribuindo para a atenuação da inflamação e favorecendo a recuperação da mucosa intestinal.

Esses achados ressaltam o potencial terapêutico do EcN como adjuvante na amebíase, especialmente diante das crescentes preocupações com resistência e efeitos colaterais dos medicamentos convencionais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLA, MOHAMED D. et al. Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. **Infection and immunity**, v. 74, n. 7, p. 3897-3903, 2006.

ARELLANO-AGUILAR, G. et al. A brief history of amoebic liver abscess with an illustrative case. **Revista de Gastroenterología de México (English Edition)**, v. 82, n. 4, p. 344-348, 2017.

ASAD, SHADABA; OPAL, STEVEN M. Bench-to-bedside review: quorum sensing and the role of cell-to-cell communication during invasive bacterial infection. **Critical care**, v. 12, p. 1-11, 2008.

BACKHED, FREDRIK et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 5, p. 690-703, 2015.

BAI, JULIO C.; CIACCI, CAROLINA. World gastroenterology organisation global guidelines: celiac disease February 2017. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 51, n. 9, p. 755-768, 2017.

BAXT, LEIGH A., et al. "Downregulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis." **Eukaryotic cell** 9.8, 1283-1293, 2010.

Begum, S., Quach, J., & Chadee, K. Immune evasion mechanisms of *Entamoeba histolytica*: progression to disease. **Frontiers in microbiology**, 6, 1394, 2015.

BILLER, LAURA, et al. "Comparison of two genetically related *Entamoeba histolytica* cell lines derived from the same isolate with different pathogenic properties." **Proteomics** 9.17, 4107-4120, 2009.

BISANZ, JORDAN E. et al. A systems biology approach investigating the effect of probiotics on the vaginal microbiome and host responses in a double blind, placebo-controlled clinical trial of post-menopausal women. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104511, 2014.

BLUM, G., HACKER, J., & MARRE, R. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. **Infection**, 23(4), 234-236, 1995.

BUSATTI, H. G. N. O.; SANTOS, J. F. G; GOMES, M. A. The old and new therapeutic approaches to the treatment of giardiasis: where are we?. **Biologics: targets & therapy**, v. 3, p. 273, 2009.

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

CAMPOS-RODRÍGUEZ, RAFAEL et al. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. **Parasite**, v. 23, 2016.

CARRERO, JULIO C., et al. "Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries." **International Journal of Medical Microbiology** 310.1, 151358, 2020.

CELLI, JONATHAN P. et al. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 34, p. 14321-14326, 2009.

CERUELOS, A. H. et al. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 23, n. 1, p. 397-401, 2019.

CLARK, C. G.; DIAMOND, L. S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 3, p. 329-341, 2002.

CLARK, C.G.; 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**. 92(4):361-364, 1998.

COSTA, CÁSSIA AX et al. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 23, 2010.

CREMON, CESARE et al. Pre-and probiotic overview. **Current opinion in pharmacology**, v. 43, p. 87-92, 2018.

DAS, MOUBONNY; BISWAS, PINAKI; DAM, SOMASRI. Isolation and Potential Probiotic Characterization of Lactic Acid Bacteria from an Ethnic Fermented Beverage having Antibacterial Activity against Human Pathogen *Entamoeba histolytica*. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 14, n. 2, 2024.

DE CORDOVA, CLARISSA A. S.; MELO, HUGO C. O. Análise da Taxa de Internações e da Mortalidade pela Amebíase no Brasil Entre 2015 E 2021. **Facit Business and Technology Journal**, v. 2, n. 39, 2022.

DE OLIVEIRA, VIVIAN MOURA et al. Probiotics as a therapeutic alternative in amoebiasis. Where are we?. **Research, Society and Development**, v. 13, n. 10, p. e43131047039-e43131047039, 2024.

DIAMOND, L.S.; HARLOW, D.R.; CUNNICK, C.C. A new médium of the axenic cultivation of *Entamoeba hystolytica* and other *Entamoeba*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 72: 431-432, 1978a.

DÍAZ-GODÍNEZ, CESAR et al. *Entamoeba histolytica* trophozoites induce a rapid non-classical NETosis mechanism independent of NOX2-derived reactive oxygen species and PAD4 activity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 184, 2018.

DÍAZ-GODÍNEZ, CESAR; CARRERO, JULIO C. The state of art of neutrophil extracellular traps in protozoan and helminthic infections. **Bioscience reports**, v. 39, n. 1, p. BSR20180916, 2019.

DONGARRÀ, M. L., RIZZELLO, V., MUCCIO, L., FRIES, W., CASCIO, A., BONACCORSI, I., & FERLAZZO, G. Mucosal immunology and probiotics. **Current allergy and asthma reports**, 13, 19-26, 2013.

DOURADO, A.; MACIEL, A.; ACA, I. S. Ocorrência de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 388-389, Aug. 2006. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822006000400015&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822006000400015&lng=en&nrm=iso)>. access on 11 July 2020.

DUCHÊNE, MICHAEL. Metronidazole and the Redox Biochemistry of *Entamoeba histolytica*. In: **Amebiasis: Biology and Pathogenesis of Entamoeba**. Tokyo: Springer Japan, p. 523-541, 2014.

DUDLOVÁ, ADRIANA et al. Prevalence of non-pathogenic types of gastrointestinal protozoa in population in Slovakia and their potential importance in the aspect of public health. **Acta Parasitologica**, v. 63, n. 4, p. 819-825, 2018.

FAUST, DANIELA M.; GUILLEN, NANCY. Virulence and virulence factors in *Entamoeba histolytica*, the agent of human amoebiasis. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1428-1441, 2012.

FERNANDES H. C, COSTA A. F, FREITAS M.A, MARTINS A.S, PESQUERO J.L, RABELO ÉM, GOMES M.A. *Entamoeba histolytica*: gene expression analysis of cells invading tissues. **ScientificWorldJournal**. 2014 Jan 27;2014:364264. doi: 10.1155/2014/364264. ECollection. PMID: 24605052, 2014.

FONSECA, J. F. et al. Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 51A and *Weissella paramesenteroides* WpK4 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 4, p. 1184-1191, 2019.

FRADE, MARIA TALITA SOARES et al. Colite necrohemorrágica causada por *Entamoeba histolytica* em um cão. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-4, 2017.

FREITAS M. A, FERNANDES H. C, CALIXTO V. C, MARTINS A. S, SILVA E. F, PESQUERO J. L, GOMES M. A. *Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. **Exp Parasitol**.

2009 Aug;122(4):306-9. doi: 10.1016/j.exppara.2009.04.005. Apr 21. PMID: 19389401, 2009.

GALVÁN-MOROYOQUI, JOSÉ MANUEL, M. DEL CARMEN DOMÍNGUEZ-ROBLES, AND IshURA MEZA. "Pathogenic bacteria prime the induction of Toll-like receptor signalling in human colonic cells by the Gal/GalNAc lectin Carbohydrate Recognition Domain of *Entamoeba histolytica*." **International journal for parasitology** 41, no. 10, 1101-1112, 2011.

GARCIA-NIETO, ROSA MARIA, ROSA RICO-MATA, SERGIO ARIAS-NEGRETE, AND EVA E. AVILA. "Degradation of human secretory IgA1 and IgA2 by *Entamoeba histolytica* surface-associated proteolytic activity." **Parasitology international** 57, no. 4, 417-423, 2008.

GITLER, CARLOS E DAVID MIRELMAN. "Fatores que contribuem para o comportamento patogênico de *Entamoeba histolytica*." **Annual Reviews in Microbiology** 40.1, 237-261, 1986.

GOMES M.A.; PESQUERO; J.B.; FURST, C.; VALLE, P.R.; PESQUERO, J.L.; SILVA, E.F.; An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitology**. 119: 359-362, 1999.

GONZÁLEZ, A., et al. "Localization of *Entamoeba histolytica* amebopore in amebic liver abscesses in hamsters." **Annals of the New York Academy of Sciences** 1149.1: 375-379, 2008.

GORMAN, H.; CHADEE, K. *Entamoeba Histolytica*: Biology and Host Immunity. In: SCHMIDT, T. M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology** (Fourth Edition). Oxford: Academic Press, p. 147–155, 2019.

GROBE, C., SCHERER, J., KOCH, D., OTTO, M., TAUDTE, N., & GRASS, G. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. **Molecular microbiology**, 62(1), 120-131, 2006.

GUILLÉN, NANCY. Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. **Virulence**, v. 14, n. 1, p. 2158656, 2023.

GUO, XIAOTI; HOUPPT, ERIC; PETRI JR, WILLIAM A. Crosstalk at the initial encounter: interplay between host defense and ameba survival strategies. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 4, p. 376-384, 2007.

HAFEZ, MOHAMED M. Upregulation of intestinal mucin expression by the probiotic bacterium *E. coli* Nissle 1917. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 4, n. 2, p. 67-77, 2012.

HAMANO, S. OBSOLETE: Protozoan Diseases: Amebiasis. 2017. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00356-8>).

HAQUE, RASHIDUL, DINESH MONDAL, PRIYA DUGGAL, MAMUN KABIR, SHANTANU ROY, BARRY M. FARR, R. BRADLEY SACK, AND WILLIAM A. PETRI

JR. "*Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis." **Infection and immunity** 74, no. 2: 904-909, 2006

HAQUE, RASHIDUL, et al. "Amebiasis." **New England journal of medicine** 348.16: 1565-1573, 2003.

HENKER, JOBST et al. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. **European journal of pediatrics**, v. 166, p. 311-318, 2007.

HERING, N. A. et al. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. **Mucosal immunology**, v. 7, n. 2, p. 369-378, 2014.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects. **Bugs as Drugs: Therapeutic Microbes for the Prevention and Treatment of Disease**, p. 73-98, 2018.

HUNG, CHIEN-CHING et al. Increased risk for *Entamoeba histolytica* infection and invasive amebiasis in HIV seropositive men who have sex with men in Taiwan. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 2, n. 2, p. e175, 2008.

HUSTON, Christopher D.; HAQUE, Rashidul; PETRI, William A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 1, n. 9, p. 1-11, 1999.

IRMER, HENRIETTE, et al. "Major cysteine peptidases of *Entamoeba histolytica* are required for aggregation and digestion of erythrocytes but are dispensable for phagocytosis and cytopathogenicity." **Molecular microbiology** 72.3: 658-667, 2009.

IRVINE, STEPHANIE L. et al. Probiotic yogurt consumption is associated with an increase of CD4 count among people living with HIV/AIDS. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 44, n. 9, p. e201-e205, 2010.

JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 181-186, 1998.

JOHANSSON, MALIN EV et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 105, n. 39, p. 15064-15069, 2008.

JORGENSEN, V. L.; NIELSEN, S. L.; ESPERSEN, K.; PERNER, A. Increased colorectal permeability in patients with severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Med.** v. 32, p. 1790-1796, 2006.

KANDASAMY, S., VLASOVA, A. N., FISCHER, D. D., CHATTHA, K. S., SHAO, L., KUMAR, A., ... & SAIF, L. J. Unraveling the differences between gram-positive and gram-negative probiotics in modulating protective immunity to enteric infections. **Frontiers in immunology**, 8, 334, 2017.

KASARELLO, K., CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA, A., & CZARZASTA, K. Communication of gut microbiota and brain via immune and neuroendocrine signaling. **Frontiers in microbiology**, 14, 1118529, 2023.

KHALAF, KHAWLAH JEBUR. Study of *Lactobacillus acidophilus* as a treatment and prophylaxis for *Entamoeba histolytica* infected mice. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 5, p. 1229-1237, 2013.

KISSOON-SINGH, VANESSA et al. *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in Muc2<sup>-/-</sup> mice. **The American journal of pathology**, v. 182, n. 3, p. 852-865, 2013.

KONIG, CONSTANTIN et al. Taxon-specific proteins of the pathogenic *Entamoeba* species *E. histolytica* and *E. nuttalli*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 641472, 2021.

KRAMMER, H. J. et al. Probiotische Arzneimitteltherapie mit *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN): Ergebnisse einer prospektiven Datenerhebung mit 3807 Patienten. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v. 44, n. 08, p. 651-656, 2006.

LEJEUNE M, RYBICKA JM, CHADEE K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. **Future Microbiol.** Feb;4(1):105-18. doi: 10.2217/17460913.4.1.105. PMID: 19207103, 2009.

LI, JUNQIANG, et al. "Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control." **Research in veterinary science** 136: 174-181, 2021.

LIDELL, MARTIN E., DARCY M. MONCADA, KRIS CHADEE, AND GUNNAR C. HANSSON. "*Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 103, no. 24: 9298-9303, 2006.

LLOYD-PRICE, JASON et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. **Nature**, v. 569, n. 7758, p. 655-662, 2019.

LÓPEZ, P. et al. Treg-inducing membrane vesicles from *Bifidobacterium bifidum* LMG13195 as potential adjuvants in immunotherapy. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. 825-829, 2012.

LORENZI, HERNAN A., et al. "New assembly, reannotation and analysis of the *Entamoeba histolytica* genome reveal new genomic features and protein content information." **PLoS neglected tropical diseases** 4.6: e716, 2010

LOTTER H, GONZÁLEZ-ROLDÁN N, LINDNER B, WINAU F, ISIBASI A, MORENO-LAFONT M, ULMER AJ, HOLST O, TANNICH E, JACOBS T. Natural killer T cells activated by a lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* are critically important to control amebic liver abscess. **PLoS Pathog**. 2009.

LOZANO, R., NAGHAVI, M., FOREMAN, K., LIM, S., SHIBUYA, K., ABOYANS, V., ... & REMUZZI, G. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, 380(9859), 2095-2128, 2012. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0).

MA, X, SHIN YJ, JANG HM, JOO MK, YOO JW, KIM DH. Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium longum alleviate colitis and cognitive impairment in mice by regulating IFN-gamma to IL-10 and TNF-alpha to IL-10 expression ratios. **Sci Rep**. 2021 Oct 19;11(1):20659. doi: 10.1038/s41598-021-00096-x.

MACPHERSON, ANDREW J.; UHR, Therese. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. **Science**, v. 303, n. 5664, p. 1662-1665, 2004.

MARCHESI, JULIAN R. et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. **Gut**, v. 65, n. 2, p. 330-339, 2016.

MARIE, CHELSEA, AND WILLIAM A. PETRI JR. "Regulation of virulence of *Entamoeba histolytica*." **Annual review of microbiology** 68: 493-520, 2014.

MARKOWIAK-KOPEC, P., & ŚLIZEWSKA, K. The effect of probiotics on the production of short-chain fatty acids by human intestinal microbiome. **Nutrients**, 12(4), 1107, 2020.

MARTINEZ, A.M.; GOMES, M.A.; VIANA, J.C.; ROMANHA, A.J.; SILVA, E.F.; Isoenzyme profile as parameter to differentiate pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 38: 407-412, 1996.

MARTÍNEZ-CASTILLO, M. et al. Flavonoids as a natural treatment against *Entamoeba histolytica*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 209, 2018.

MAYADAS, TANYA N.; CULLERE, XAVIER; LOWELL, Clifford A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 181-218, 2014.

MENDOZA-MACÍAS, CLAUDIA LETICIA, et al. "*Entamoeba histolytica*: effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with *Escherichia coli* 055." **Experimental parasitology** 121.2: 167-174, 2009.

MIRELMAN, D., MICHAEL ANBAR, AND RIVKA BRACHA. "Trophozoites of *Entamoeba histolytica* epigenetically silenced in several genes are virulence-attenuated." **Parasite** 15.3 : 266-274, 2008.

MISHRA, SANJUKTA; ACHARYA, SWASTIK. A brief overview on probiotics: the health friendly microbes. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 14, n. 4, p. 1869-1880, 2021.

MOHAMED, SABAA T. Use of Bifidobacterium for Treatment and Protective from *Entamoeba Histolytica* Infection in Mice. **International Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 1, 2014.

MOHAMMED, S.; KHALAF, K.; SULAIMAN, N. *Lactobacillus salivarius* bacteriocin and supernatant activity against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. **Br J Biol Health Med Sci Res**, v. 3, p. 19-28, 2015.

MONCADA, DARCY, KATHY KELLER, AND KRIS CHADEE. "*Entamoeba histolytica*-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides." **Infection and immunity** 73, no. 6: 3790-3793, 2005.

MONTALBAN-ARQUES, A. et al. Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 512, 2015.

MOONAH, SHANNON N., NONA M. JIANG, AND WILLIAM A. PETRI JR. "Host immune response to intestinal amebiasis." **PLoS pathogens** 9, no. 8: e1003489, 2013.

MORÁN, PATRICIA et al. Amebíase: avanços no diagnóstico, tratamento, características imunológicas e interação com o ecossistema intestinal. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 14, p. 11755, 2023.

MORTIMER, LEANNE, AND KRIS CHADEE. "The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*." **Experimental parasitology** 126, no. 3: 366-380, 2010.

NAGARAJA, SHRUTI ; ANKRI, SERGE. Target identification and intervention strategies against amebiasis. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 1-14, 2019.

NAKADA-TSUKUI, K., & NOZAKI, T. (2016). Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*. **Frontiers in immunology**, 7, 175.

NAUSEEF, WILLIAM M. ; BORREGAARD, NIELS. Neutrophils at work. **Nature immunology**, v. 15, n. 7, p. 602-611, 2014.

NELSON, J.; SINGH, U. *Entamoeba histolytica* (Amebiasis). In: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. **Elsevier**, p. 1310-1316. e2. 2018.

NISSLE, A. Die antagonistische behandlung chronischer darmstörungen mit colibakterien. **Med Klin**, v. 2, p. 29-33, 1918.

NISSLE, ALFRED. Weiteres über grundlagen und praxis der mutaflorbehandlung. **DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 51, n. 44, p. 1809-1813, 1925.

OLIVEIRA, FABRÍCIO MS et al. Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in natural killer T-lymphocytes in C57BL/6 mice. **Infectious Disease Reports**, v. 4, n. 2, 2012.

OLIVOS-GARCÍA, ALFONSO, et al. "Molecular nature of virulence in *Entamoeba histolytica*." **Infection, Genetics and Evolution** 9.6: 1033-1037, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA (WGO). Diretrizes mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia: probióticos e prebióticos. Fevereiro de 2023.

OTT M, BENDER LA, BLUM GA, SCHMITTROTH MA, ACHTMAN MA, TSCHÄPE H, HACKER J. Virulence patterns and long-range genetic mapping of extraintestinal *Escherichia coli* K1, K5, and K100 isolates: use of pulsed-field gel electrophoresis. **Infection and immunity**. Aug;59(8):2664-72, 1991.

PELASEYED, THAHER, JOAKIM H. BERGSTRÖM, JENNY K. GUSTAFSSON, ANNA ERMUND, GEORGE MH BIRCHENOUGH, ANDRÉ SCHÜTTE, SJOERD VAN DER POST ET AL. "The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system." **Immunological reviews** 260, no. 1: 8-20, 2014.

PETRI, WILLIAM A. JR.; HAQUE, RASHIDUL; LUMPKIN, MALCOLM M. AMEBIASE. IN: MANDELL, GERALD L.; BENNETT, JOHN E.; DOLIN, RAPHAEL. *Princípios e Prática das Doenças Infecciosas*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 278, p. 3097-3110, 2005.

PRADO, G. K. S. et al. *Weissella paramesenteroides* WpK4 ameliorate the experimental amoebic colitis by increasing the expression of MUC-2 and the intestinal epithelial regeneration. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1706-1719, 2020.

PUTSEP, KATRIN et al. Germ-free and colonized mice generate the same products from enteric prodefensins. **Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40478-40482, 2000.

RAMOS, ESPIRIDIÓN, ALFONSO OLIVOS-GARCÍA, MARIO NEQUIZ, EMMA SAAVEDRA, EUSEBIO TELLO, ANDRÉS SARALEGUI, IRMGARD MONTFORT, AND RUY PÉREZ TAMAYO. "*Entamoeba histolytica*: apoptosis induced in vitro by nitric oxide species." **Experimental parasitology** 116, no. 3: 257-265, 2007.

RAMOS-MARTÍNEZ, ESPIRIDIÓN, et al. "*Entamoeba histolytica*: oxygen resistance and virulence." **International journal for parasitology** 39.6 : 693-702, 2009.

RAVDIN, JONATHAN I. et al. Intestinal Antilectin Immunoglobulin A Antibody Response and Immunity to *Entamoeba dispar* Infection following Cure of Amebic Liver Abscess. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 6899-6905, 2003.

RIBEIRO, M. R. S. et al. Effect of probiotic *Saccharomyces boulardii* in experimental giardiasis. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 5, p. 789-798, 2018.

RODRÍGUEZ-NOGALES, ALBA et al. The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates development of DSS-induced colitis in mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 468, 2018.

ROSALES, CARLOS; URIBE-QUEROL, EILEEN. Phagocytosis: a fundamental process in immunity. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

RUIZ, L. et al. Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes. **FEMS microbiology letters**, v. 359, n. 1, p. 1-11, 2014.

RUTSCH, ANDRINA; KANTSJÖ, JOHAN B.; RONCHI, FRANCESCA. The gut-brain axis: how microbiota and host inflammasome influence brain physiology and pathology. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 604179, 2020.

SABTI, ZAINAB SAMEER; ABBAS, SHATHA KHUDAIER; MAHMOOD, NIBRAS NAZAR. Investigation the Role of Lactobacillus ssp. on Entamoeba histolytica Pathogenesis. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, v. 10, n. 10, 2019.

SANDERS, M. E. et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. **Gut**, v. 62, n. 5, p. 787-796, 2013.

SARD, BÁRBARA GOMILA; NAVARRO, RAFAEL TOLEDO; ESTEBAN SANCHIS, J. GUILLERMO. Non-pathogenic intestinal amoebae: a clinical-analytical overview. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, p. 20-28, 2011.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344-371, 2017.

SARID, LOTEM et al. Insights into the mechanisms of Lactobacillus acidophilus activity against Entamoeba histolytica by using thiol redox proteomics. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 814, 2022.

SARJAPURAM, NITYA et al. The potential of Lactobacillus casei and Enterococcus faecium combination as a preventive probiotic against Entamoeba. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 9, n. 2, p. 142-149, 2017.

SCHAAP, PAULINE; SCHILDE, CHRISTINA. Encystation: the most prevalent and underinvestigated differentiation pathway of eukaryotes. **Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 727-739, 2018.

SCHACHTLE, M. A., & ROSSHART, S. P. The microbiota-gut-brain axis in health and disease and its implications for translational research. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 698172, 2021.

SCHULTZ, M. Clinical use of *E. coli* Nissle 1917 in inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, 14(7), 1012-1018, 2008.

SEGERS, MARIJKE E.; LEBEER, SARAH. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. **Microbial cell factories**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2014.

SETSHEDI, M.; RUTHERFORD THOMSON, S. R. Chapter 18 - Amoebiasis in Sub-Saharan Africa. In: SEGAL, I. (Ed.). *Digestive Diseases in Sub-Saharan Africa*. [s.l.] **Academic Press**, p. 173–183. 2019.

SHAHI, PREETI et al. Proteomic identification of oxidized proteins in *Entamoeba histolytica* by resin-assisted capture: insights into the role of arginase in resistance to oxidative stress. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004340, 2016.

SHARMA, MONIKA, DEEPAK BHASIN, AND HARPREET VOHRA. "Differential induction of immunoregulatory circuits of phagocytic cells by Gal/Gal NAc lectin from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba*." **Journal of clinical immunology** 28, no. 5: 542, 2008.

SHERMAN, PHILIP M.; OSSA, JUAN C.; JOHNSON-HENRY, KATHENE. Unraveling mechanisms of action of probiotics. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 24, n. 1, p. 10-14, 2009.

SHI, JUN et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917-derived outer membrane vesicles modulate the intestinal microbiome and host gut-liver metabolome in obese and diabetic mice. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1219763, 2023.

SHIRLEY, D. A. T., FARR, L., WATANABE, K., & MOONAH, S. A review of the global burden, new diagnostics, and current therapeutics for amebiasis. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 5, No. 7, p. ofy161). US: Oxford University Press, 2018.

SILVA, MÔNICA et al. Determinação da infecção por em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, p. 969-973, 2005.

SPERANDIO, BRICE, NATALIE FISCHER, AND PHILIPPE J. SANSONETTI. "Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies." In **Seminars in immunology**, vol. 27, no. 2, pp. 111-118. Academic Press, 2015. *Entamoeba histolytica*

STANLEY JR, SAMUEL L. "Amoebiasis." **The lancet** 361.9362: 1025-1034, 2003.

STEIMLE, A., MENZ, S., BENDER, A., BALL, B., WEBER, A. N., HAGEMANN, T., ... & FRICK, J. S. Flagellin hypervariable region determines symbiotic properties of commensal *Escherichia coli* strains. **PLoS biology**, 17(6), e3000334, 2019.

STOJANOV, SPASE, ALES BERLEC, AND BORUT ŠTRUKELJ. "The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease." **Microorganisms** 8, no. 11: 1715, 2020.

TAMBOLI, CYRUS P., CHRISTEL NEUT, PIERRE DESREUMAUX, AND JEAN F. COLOMBEL. "Dysbiosis in inflammatory bowel disease." **Gut** 53, no. 1, p.1-4, 2004.

THANANIMIT, S., PAHUMUNTO, N., & TEANPAISAN, R. Characterization of short chain fatty acids produced by selected potential probiotic lactobacillus strains. **Biomolecules**, 12(12), 1829, 2022.

TREBICHAUSKY, I., SPLICHAL, I., RADA, V., & SPLICHALOVA, A. Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917. **Nutrition reviews**, 68(8), 459-464, 2010.

UPCROFT, P.; UPCROFT, J. A. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 1, p. 150-164, 2001.

VARET, HUGO ET al. Enteric bacteria boost defences against oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9042, 2018.

WANG, YURONG et al. The administration of *Escherichia coli* Nissle 1917 ameliorates irinotecan-induced intestinal barrier dysfunction and gut microbial dysbiosis in mice. **Life sciences**, v. 231, p. 116529, 2019.

WOLF, MARCIA K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 4, p. 569-584, 1997.

XIMÉNEZ, C., MORÁN, P., ROJAS, L., VALADEZ, A., & GÓMEZ, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, 9(6), 1023–1032, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.06.008>.

YANG, SIWEN et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 211, n. 1, p. 44. e1-44. e12, 2014.

YE, ZHENGHAO et al. *Escherichia coli* Nissle Improves Short-Chain Fatty Acid Absorption and Barrier Function in a Mouse Model for Chronic Inflammatory Diarrhea. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1109-1120, 2025.

ZHENG, Y., ZHANG, Z., TANG, P., WU, Y., ZHANG, A., LI, D., ... & YUAN, C. S. Probiotics fortify intestinal barrier function: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **Frontiers in immunology**, 14, 1143548, 2023.

ZYREK, AGATA A. et al. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. **Cellular microbiology**, v. 9, n. 3, p. 804-816, 2007.

## Apêndice 1. Fármacos de escolha para o tratamento da amebíase intestinal e abscesso hepático amebiano

Composto	AI	AHA	Doses	Benefícios	Efeitos Colaterais	Referências
Metronidazol	Sim	Sim	750 mg por via oral (3 vezes ao dia) por 7 a 10 dias	Alta eficácia; boa biodisponibilidade; tratamento de baixo custo.	Efeitos colaterais graves, como gosto metálico, dor de cabeça, boca seca, náusea, urticária, prurido e urina de cor escura. Casos relatados de encefalopatia, meningite asséptica, convulsões e neuropatia. Genotóxico, mutagênico e carcinogênico em roedores.	Ansari <i>et al.</i> , 2015; Dingsdag; Hunter, 2018; Gelfand; Cleveland, 2017; Marie; Petri Jr., 2013
Tinidazol	Sim	Sim	800 mg/dia por via oral (3 vezes por dia) durante 7 dias	Mais eficaz que o metronidazol; boa distribuição	Menos efeitos colaterais que o metronidazol: anorexia, náusea, desconforto abdominal, diarreia, vômito, fadiga e gosto metálico	Fung; Doan, 2005; Gonzales <i>et al.</i> , 2019; Marie; Petri Jr., 2013
Nitazoxanida	Sim	Sim	~15 mg/kg diariamente em duas doses divididas por 3 dias	Agente antimicrobiano de amplo espectro; mais eficaz que o metronidazol (taxa de cura de 70-90%)	Dor abdominal, dispepsia, náusea, disúria, dor de cabeça, tontura e sonolência	Adagu <i>et al.</i> , 2002; Davila-Gutierrez <i>et al.</i> , 2002; Marie; Petri Jr., 2013; Ochoa; Branco, 2005
Desidroemetina	Sim	Sim	1–1,5 mg/kg/dia intramuscular por até 5 dias	Atividade amebicida rápida	Cardiotoxicidade, diarreia, náusea, vômito, fraqueza muscular	Stanley, 2003.
Clioquinol	Sim	Sim	Absorção oral ou	Alta eficácia	A neurite óptica em indivíduos com intolerância ao	Mao; Schimmer,

			percutânea		iodo, causa atrofia óptica grave e irreversível e neuropatia periférica. Nos gatos tratados com Clioquinol, observou-se diminuição da condução nos nervos periféricos em comparação com o controle tratado	2008; Stanley, 2003
Auranofin	Sim	Sim	–	Alta eficácia; rápido e econômico	A terapia de longo prazo está relacionada com diarreia, erupções cutâneas, anormalidades hematológicas e proteinúria	Capparelli <i>et al.</i> , 2016; Debnath <i>et al.</i> , 2012
Ornidazol	Sim	Sim	Cápsulas de 500 mg duas vezes ao dia por 10 dias	Meias-vidas mais longas; bem tolerado; menor tempo de tratamento	Gastrite, náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, leucopenia e alergia	Haque <i>et al.</i> , 2003; Stanley, 2003; Sitepu <i>et al.</i> , 1982
Secnidazol	Sim	Sim	30 mg/kg de peso corporal por via oral em dose única	Meias-vidas mais longas; bem tolerado; menor tempo de tratamento	Gastrite, náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, leucopenia e alergia	Haque <i>et al.</i> , 2003; Padilla <i>et al.</i> , 2000; Stanley, 2003
Panidazol	Sim	Sim	Comprimidos de 500 mg pela quarta vez ao dia por 6 dias	Baixa toxicidade	Tonturas, náuseas vômitos e dor epigástrica	Botero; Pérez, 1977.

Praziquantel	Sim	Sim	40 mg/kg de peso corporal divididos em duas doses por via oral e tomadas com 4 a 6 h de intervalo	Alta eficácia	Náusea vômito e tontura	Mohammed <i>et al.</i> , 1998.
Medicamento à base de plantas Amoebex	Sim	Sim	800 mg/dia após a refeição três vezes ao dia	Alta eficácia	Sem descrição	Carrero <i>et al.</i> , 2020.
Cloroquina	Sim	Sim	500 mg por dia durante 10 semanas	Altamente efetivo	Sem descrição	Cohen; Reynolds, 1975.
Paromomicina	Sim	Não	25-35 mg/kg diariamente em três doses divididas por 7 dias	Bem tolerado; alta eficiência; sem nefrotoxicidade; usando durante a amamentação	Diarréia, distúrbios gastrointestinais	Kikuchi <i>et al.</i> , 2013; Marie; Petri Jr., 2013
Quinfamida	Sim	Não	4,3 mg/kg em dose única no dia	Alta eficácia (95%)	Dor abdominal, náusea, dor de cabeça	Padilha <i>et al.</i> , 2012.

Secnidazol	Sim	Não	30 mg/kg em dose única	Alta eficácia	Vômitos, diarreia, dor de cabeça, sabor desagradável	Padilha <i>et al.</i> , 2000.
Furoato de Diloxanida	Sim	Não	500 mg por via oral (3 vezes ao dia) por 10 dias	Rapidamente absorvido; baixa toxicidade; excelente perfil de segurança	Flatulência, menor taxa de cura em pacientes sintomáticos	Adagu <i>et al.</i> , 2002; Blessmann; Tannich, 2002; Marie; Petri Jr., 2013.
Iodoquinol	Sim	Não	650 mg por via oral (3 vezes ao dia)	Altamente seletivo	Cefaleia, náuseas, vômitos e lesão do nervo óptico, produzem neurite óptica em indivíduos com intolerância ao iodo, causam atrofia óptica grave e irreversível e neuropatia periférica	Ghaskadbi; Vaidya, 1989.
Tiliquinol/Tilbroquinol	Sim	Não	–	Usado antes do tratamento de AHA para remover parasitas restantes no intestino	Hepatotoxicidade e neurotóxico (retirado comercialmente em alguns países)	Billet <i>et al.</i> , 2019; Nestola <i>et al.</i> , 2015.

AI: Amebíase intestinal.

AHA: Amebíase hepática amebiana.

Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151358>

## 9. ANEXOS

### 9.1. Artigos publicados

#### 9.1.1. Probiotics as a Therapeutic alternative in amoebiasis. Where are we?

Research, Society and Development, v. 13, n. 10, e43131047039, 2024  
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v13i10.47039>

#### Probiotics as a therapeutic alternative in amoebiasis. Where are we?

Probióticos como alternativa terapêutica na amebiase. Onde estamos?

Probióticos como alternativa terapêutica en la amebiasis. ¿Dónde estamos?

Received: 09/24/2024 | Revised: 10/06/2024 | Accepted: 10/07/2024 | Published: 10/11/2024

Vivian Moura de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6454-630X>  
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil  
E-mail: [vivian-moura@live.com](mailto:vivian-moura@live.com)

Matheus Rezende Corrêa

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-5498-1833>  
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil  
E-mail: [matheusrezendebr@gmail.com](mailto:matheusrezendebr@gmail.com)

Isabela Cristina Vieira Silva

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-4126-3033>  
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil  
E-mail: [isabelacvsilva@gmail.com](mailto:isabelacvsilva@gmail.com)

Larissa Rezende Corrêa

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2010-7740>  
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil  
E-mail: [larissarezende2@gmail.com](mailto:larissarezende2@gmail.com)

Maria Aparecida Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-7263-5721>  
Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil  
E-mail: [magomes@icb.ufmg.br](mailto:magomes@icb.ufmg.br)

#### Abstract

*Entamoeba histolytica* is the cause of amoebiasis, a neglected tropical disease and a leading cause of mortality worldwide. The objective of this review is to show the potential of probiotics as a treatment strategy for amoebiasis. A systematic search was conducted using PubMed and Google Scholar with keywords "Entamoeba histolytica", "amoebiasis", and "probiotics." The studies on probiotics for amoebiasis treatment are limited, but some shown promising results. *Lactobacillus acidophilus* reduced *E. histolytica* cyst excretion by 79.67% in mice, with a 68.31% efficacy comparable to metronidazole. *Bifidobacterium* sp. showed 75.63% efficacy in reducing infection severity, higher than metronidazole (67.56%). *Lactobacillus salivarius* inhibited *E. histolytica* growth in vitro and provided protection in vivo. *Lactobacillus fermentum* and *L. delbrueckii* inhibited *E. histolytica* proliferation with efficacy ranging from 46.42% to 97.68%, depending on the concentration. *Saccharomyces boulardii* reduced amoebic dysentery duration by 25% and eliminated parasitic cysts in human stool samples. *Lactobacillus casei* showed a 100% recovery rate in rats infected with *E. histolytica*. These findings suggest probiotics have potential as therapeutic agents for amoebiasis, but further research is needed to confirm their effectiveness in animal models and humans.

Keywords: *Entamoeba histolytica*; Probiotics; Protozoa.

#### Resumo

*Entamoeba histolytica* é a causa da amebiase, uma doença tropical negligenciada e uma das principais causas de mortalidade mundial. O objetivo desta revisão é mostrar o potencial dos probióticos como estratégia de tratamento para amebiase. Foi realizada uma busca sistemática no PubMed e Google Scholar com as palavras-chave "Entamoeba histolytica", "amebiase" e "probióticos." Os estudos sobre o uso de probióticos no tratamento da amebiase são limitados, mas alguns apresentaram resultados promissores. O *Lactobacillus acidophilus* reduziu a excreção de cistos de *E. histolytica* em 79,67% em camundongos, com eficácia de 68,31%, comparável ao metronidazol. O *Bifidobacterium* sp. mostrou 75,63% de eficácia na redução da gravidade da infecção, superior ao metronidazol (67,56%). O *Lactobacillus salivarius* inibiu o crescimento de *E. histolytica* in vitro e ofereceu proteção in vivo. *Lactobacillus fermentum* e *L. delbrueckii* inibiram a proliferação de *E. histolytica* com eficácia variando de 46,42% a 97,68%, dependendo da concentração. O *Saccharomyces boulardii* reduziu a duração da disenteria amebiana em 25% e eliminou os cistos parasitários em amostras de fezes humanas. *Lactobacillus casei* apresentou uma taxa de recuperação de 100% em ratos infectados por *E. histolytica*. Esses achados sugerem que os probióticos têm potencial terapêutico contra infecções por *E. histolytica*, destacando a necessidade de mais pesquisas tanto em modelos animais quanto em humanos para validar sua aplicação no tratamento da amebiase.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica*; Probióticos; Protozoário.

### Resumen

*Entamoeba histolytica* es la causa de la amebiasis, una enfermedad tropical desatendida y una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. El objetivo de esta revisión es mostrar el potencial de dos probióticos como estrategia de tratamiento para amebiasis. Se realizó una búsqueda sistemática en PubMed y Google Scholar utilizando las palabras clave "*Entamoeba histolytica*", "amebiasis" y "probióticos". Los estudios sobre el uso de probióticos para tratar la amebiasis son limitados, pero algunos muestran resultados prometedores. *Lactobacillus acidophilus* redujo la excreción de quistes de *E. histolytica* en un 79,67% en ratones, con una eficacia del 68,31%, comparable al metronidazol. *Bifidobacterium* sp. mostró una eficacia del 75,63% en la reducción de la gravedad de la infección, superior al metronidazol (67,56%). *Lactobacillus salivarius* inhibió el crecimiento de *E. histolytica* in vitro y proporcionó protección in vivo. *Lactobacillus fermentum* y *L. delbrueckii* inhibieron la proliferación de *E. histolytica* con una eficacia que varía del 46,42% al 97,68%, dependiendo de la concentración utilizada. *Saccharomyces boulardii* redujo la duración de la disentería amebiana en un 25% y eliminó los quistes parasitarios en muestras de heces humanas. *Lactobacillus casei* mostró una tasa de recuperación del 100% en ratas infectadas con *E. histolytica*. Estos hallazgos sugieren que los probióticos tienen un potencial terapéutico contra las infecciones por *E. histolytica*, destacando la necesidad de más investigaciones en modelos animales y en humanos para validar su uso en el tratamiento de la amebiasis.

Palabras clave: *Entamoeba histolytica*; Probióticos; Protozoario.

## 1. Introduction

The first historical account of *Entamoeba histolytica* was documented by Fedor Lösch in 1875, who observed the feces of a rancher suffering from dysentery. The term *Entamoeba histolytica* was introduced by Schaudinn in 1903, based on his observations of the parasite's notable capacity to lyse tissues. The prevalence of *E. histolytica*, the pathogen responsible for amoebiasis, is currently difficult to determine due to the emergence of *E. dispar*, which is morphologically indistinguishable from *E. histolytica* (Imperato, 1981).

Infections caused by *E. histolytica* can be asymptomatic or symptomatic. Before the recognition of *E. dispar*, it was estimated that approximately 10% of the global population was infected with *E. histolytica*, with around 10% of these individuals experiencing invasive symptomatic infections (Walsh, 1986). This suggests that at least 1% of the global population may present with symptomatic *E. histolytica* infections, leading to over 100,000 reported deaths annually. It is crucial to note that amoebiasis primarily affects individuals in developing countries, largely due to inadequate sanitation and water treatment facilities, although infections are also reported in travelers visiting endemic regions (Carrero et al., 2020).

The treatment of amoebiasis and other intestinal diseases varies according to the severity of the infection. However, the wide range of side effects, coupled with the potential for drug resistance, has led the WHO to recommend the use of probiotics and their metabolites to prevent intestinal infections caused by parasites and other microorganisms. In light of this, numerous studies have emerged to evaluate the efficacy of these probiotic compounds in treating various health conditions (Cuellar-Guevara & Menchaca-Arredondo, 2019).

Few clinical and experimental studies have investigated the effects of different probiotic strains on amoebiasis (Sarid & Ankri, 2022). Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host, primarily through the modulation of intestinal microbiota and reinforcement of immune barriers (Sanders et al., 2013). Probiotics may play a beneficial role in the prevention and treatment of parasitic infections, including amoebiasis, by promoting the recovery of intestinal microbiota and modulating the inflammatory response (Montalban-Arques et al., 2015; Sarao & Arora, 2017).

Considering the scarcity of studies relating amoebiasis and probiotics, our objective was to identify, analyze, and synthesize clinical and experimental studies evaluating the use of probiotics as therapeutic agents in infections caused by *Entamoeba histolytica*. Therefore, the central question of this review is: What is the efficacy of probiotics as therapeutic agents in the treatment of infections caused by *Entamoeba histolytica*? The analysis integrates findings on clinical outcomes related to the use of probiotics in amoebiasis, providing a comprehensive overview of the current state of research. Studies published

between 2003 and the first half of 2024 were selected through a systematic search using combinations of the keywords 'Entamoeba histolytica,' 'amoebiasis' and 'probiotics' in the electronic databases PubMed and Google Scholar. Clinical and experimental articles that utilized probiotics as therapeutic agents and were published in English were included.

## 2. Methodology

Scientific Methodology is important for a research to have reproducibility in the best way possible (Pereira et al., 2018). The methodology followed a systematic (Mattos, 2015; Gomes & Caminha, 2014) process aimed at ensuring the comprehensiveness and relevance of the selected studies, as well as the standardization of data analysis.

### 2.1 Inclusion criteria

Only articles published in English, between 2003 and 2024, that investigated the use of probiotics as treatment in in vivo and/or in vitro experiments involving *Entamoeba histolytica* were included. The search was conducted in the electronic databases PubMed and Google Scholar, utilizing combinations of the keywords "Entamoeba histolytica," "amoebiasis," and "probiotics." The research followed a systematic approach, employing Boolean operators to ensure that the articles addressed the topics of interest in an integrated manner.

### 2.2 Exclusion criteria

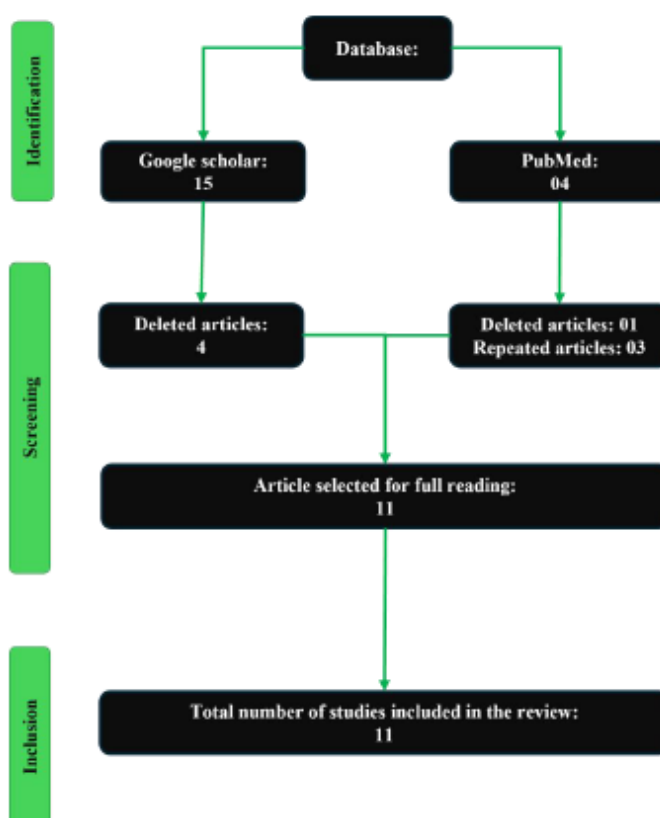
Repeated or duplicate articles in different databases, literature reviews and studies that tested probiotics in amoebas other than *Entamoeba histolytica* were excluded.

### 2.3 Data organization

Following the initial search, the selection of studies was conducted in multiple stages (Figure 1). First, titles and abstracts were reviewed to identify those that met the inclusion criteria. The studies that passed this preliminary screening were then read in their entirety for a more detailed evaluation. Subsequently, the studies were assessed for methodological quality and their relevance to the objectives of the review. The evaluation criteria included clarity in experimental methods, robustness of results, and appropriateness of statistical analysis.

The results were categorized based on the type of experiment, the probiotic utilized, and the efficacy of the probiotics reported in each study. The analysis included a comparison of the observed effects in the treatment of infections caused by *E. histolytica*. Additionally, the consistency of the results across different studies was evaluated, along with the potential impact of variations in the type of probiotic used.

Figure 1 – Flowchart of the Article Selection Process Steps.



Source: Prepared by the authors (2024).

### 3. Literature review

#### 3.1 *E. histolytica* and Amoebiasis

Amoebas are unicellular protozoa belonging to the phylum Sarcodina, characterized by the absence of a fixed shape due to their amoeboid movement through pseudopods (Adl et al., 2019). These cytoplasmic extensions allow amoebas to move and capture food particles, such as bacteria and other microorganisms, through a process called phagocytosis. Living in various aquatic and moist environments, amoebas are highly adaptable organisms that can survive in both water bodies and wet soils. Their simple structure includes a nucleus, cytoplasm, digestive and contractile vacuoles, and they reproduce asexually, typically through binary fission (Samba-Louaka & Héchar, 2019).

The life cycle of the parasite is relatively simple, presenting itself in the forms of cysts and trophozoites. The infection process occurs via the fecal-oral route, without the need for a vector, where cysts, the resistant form of the parasite eliminated in the host's feces, are ingested through contaminated food or water. Upon reaching the terminal ileum, excystation occurs, releasing trophozoites into the host's intestine, which then migrate to the colon, continuing their life cycle (Guillén, 2023).

The epidemiology of *E. histolytica*/*E. dispar* infections is characterized by a high number of asymptomatic cases, where the parasite remains in equilibrium with the host, perpetuating disease transmission through the release of cysts in feces.

However, approximately 10% of infected individuals progress to more severe forms of the disease, including amoebic colitis, amoeboma of the colon, and fulminant colitis, all symptoms that fall under intestinal amoebiasis, caused by *E. histolytica* (Morán et al., 2023).

In certain instances, clinical manifestations may occur beyond the gastrointestinal tract, primarily through hematogenous dissemination via the portal vein. This pathway can facilitate the migration of *Entamoeba histolytica* trophozoites to the liver, where they can induce the formation of amoebic liver abscesses. Additionally, these trophozoites may reach the pulmonary system, resulting in pulmonary amoebiasis, which can similarly lead to the development of abscesses. In rarer cases, *E. histolytica* may also affect the brain (Abasszade & Bell, 2021; Uribe-Querol & Rosales, 2020).

Prevention of amoebiasis involves good hygiene practices, such as regular handwashing, treating water before consumption, and ensuring proper food preparation. Basic sanitation measures and education on hygiene are crucial for reducing disease incidence, especially in vulnerable communities. Although amoebiasis is often easily treatable with specific medications, it can be dangerous if not diagnosed and treated adequately, highlighting the importance of attention to the quality of water and food, particularly in at-risk areas.

### 3.2 *Entamoeba histolytica* vs intestinal microbiota

The intestinal microbiota performs its function in four different environments in the human body: metabolic, structural, protective, and neurological. In the protective environment, the mucus layer consists of mucin glycoproteins secreted by goblet cells, forming a viscous gel-like layer on the intestinal epithelium. This layer serves to prevent microbial adhesion directly to the epithelium and also functions as a lubricant, facilitating the transport of luminal contents without damaging the epithelial lining (Johansson et al., 2008).

The mucus layer is approximately 150 µm thick and comprises two distinct strata of sialomucins and sulfomucins arranged alternately. The acidic sulfomucin is located closest to the epithelium and is less susceptible to degradation by bacterial glycosidases and host proteases. Additionally, this acidic mucin plays a critical role in preventing the direct adherence of commensal microorganisms to colonic epithelial cells (Johansson et al., 2008).

When *E. histolytica* infects a healthy individual with an intact intestinal barrier, the amoebas adhere to the outer mucus layer, away from the epithelium. In this context, mucus plays a protective role by maintaining a healthy balance between the microbiome and pathogens, as both are in constant competition for binding sites within the mucus layer (Pelaseyed et al., 2014; Sperandio & Sansonetti, 2015). The adhesion of *E. histolytica* to the intestinal mucus layer is mediated by a surface lectin that exhibits high affinity for galactose (Gal) and N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) oligosaccharides found in mucin, the primary component of the mucus layer (Birchenough & Hansson, 2015).

Initial infection by *Entamoeba histolytica* leads to thickening of the mucosal layer, likely as a defense mechanism to prevent the pathogen from contacting the intestinal epithelium. During the infection, amoebae produce glycosidases and proteases that can degrade the mucin layer, exposing the intestinal epithelial cells (IECs) (Lidell & Hansson, 2006; Moncada & Chadee, 2005). In the absence of mucin, the amoebic lectin Gal/GalNAc binds to Gal and GalNAc residues on the surface of the exposed IECs. Progressive disease is characterized by mucin loss, flattening of IECs, and neutrophil infiltration. Furthermore, secretory molecules from *E. histolytica* disrupt tight junctions and ion transport in the intestine, leading to diarrhea. In mucin-deficient mice, for example, *E. histolytica* directly attached to IECs, resulting in increased pathology, barrier disruption, and secretory and pro-inflammatory responses (Kissoon-Singh & Chadee, 2013). Amebic lesions in the intestinal epithelium can progress to necrotic ulcers containing trophozoites, bacteria, and inflammatory cells. From these

ulcers, trophozoites may invade the tissue and enter the bloodstream, often spreading to the liver and causing amoebic liver abscesses.

#### 4. Results

In the synthesis of results, we used narrative analysis (Whittemore & Knafelz, 2005), which facilitates the integration and descriptive presentation of findings from various studies, highlighting how each contributes to the understanding of the role of probiotics in the treatment of amoebiasis. Frame I present the studies included in the sample, organized by author and year, detailing the type of probiotic used in the research, the main findings, and the type of experiment conducted, whether in vitro or in vivo.

Frame I - Efficacy of Probiotics in inhibiting *Entamoeba histolytica* in vivo and in vitro studies.

Study	Probiotic/Treatment	Results and effectiveness (%)	Type of experiment
Mansour-Ghanaei et al., 2003	<i>Saccharomyces boulardii</i>	100% reduction in parasitic cysts and 50% reduction in episodes of fever and abdominal pain	In humans
Dinleyici et al., 2009	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Bloody diarrhea resolved within 5 days in group B, 76% to 24% reduction in diarrhea within 36 hours	In humans
Savay-Erdeve et al., 2009	<i>Saccharomyces boulardii</i>	Reduction of amoebic cysts: 8.8% (Group I) and 7.5% (Group II)	In humans
Khalaf, 2013	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	79,67% (protection), 68,31% (treatment), Significant reduction in cysts excretion	In vivo
Rahi & Nashaat, 2013	<i>Lactobacillus casei</i>	80% (group 1), 100% (group 2), watery diarrhea control	In vivo
Mohamed, 2014	Bifidobacteria sp.	75,63%, complete resolution on the eighth day after inoculation	In vivo
Mohammed et al., 2015	<i>Lactobacillus salivarius</i>	More effective inhibition than metronidazole in vitro	In vitro and in vivo
Shafeek & Ruzzuki, 2016	<i>Lactobacillus fermentum</i> e <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	46,42% ( $1,5 \times 10^6$ ), 88,65% ( $1,5 \times 10^8$ ), 97,68% ( $1,5 \times 10^9$ ), inhibition of growth of <i>E. histolytica</i>	In vitro
Sabti et al., 2019	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gradual reduction of cysts in infected mice	In vivo
Sarid et al., 2022	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	50% reduction in trophozoite viability, effect mediated by H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	In vitro
Das et al., 2024	Bacterial isolates	Significant elimination of <i>E. histolytica</i> in mice	In vivo

Source: Prepared by the authors (2024).

#### 5. Discussion

Experimental trials involving probiotics have emerged as a growing area of research, driven by the recognition of the beneficial effects of these live microorganisms on human health (Magistrelli et al., 2019; Maldonado & Perdigon, 2019; Mazziotta & Rotondo, 2023). Probiotics, such as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, are commonly studied for their ability to enhance intestinal microbiota, strengthen the immune system, and prevent gastrointestinal diseases (Al-Tawaha & Meng, 2018; Flach et al., 2018). These trials aim to evaluate the efficacy, safety, and mechanisms of action of probiotics under various health conditions, providing scientific evidence for their therapeutic and preventive use. Experimental research on probiotics is essential for validating their clinical effects and establishing appropriate usage protocols.

There are very few studies addressing the topic amoebiasis and probiotics. However, in all the studies reviewed, probiotics have been shown to be at least feasible adjuncts in the therapy of amoebiasis. It has been demonstrated that

administering the probiotic *Lactobacillus acidophilus* for seven days prior to exposing mice to *E. histolytica* trophozoites significantly reduced cyst excretion. Additionally, infected mice treated with *L. acidophilus* showed a gradual decrease in cyst numbers starting from the first day of treatment. The protection conferred by the probiotic was 79.67%, while the efficacy of the treatment was 68.31%, compared to an efficacy of 67.56% for metronidazole (Khalaf, 2013).

In another study, *L. acidophilus* was observed to gradually reduce the number of *E. histolytica* trophozoites present in the feces of infected mice (Sabti, et al., 2019). Incubation with *L. acidophilus* for two hours resulted in a 50% reduction in the viability of *E. histolytica* trophozoites. However, this amoebicidal activity was lost in the presence of catalase, an enzyme that degrades hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) into water and oxygen. This finding suggests that the effect may be mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produced by *L. acidophilus* (Sarid et al., 2022).

One more study evaluated the effect of Bifidobacteria in BALB/c mice infected with *E. histolytica*. The results indicated that the administration of *Bifidobacterium* spp. for seven days prior to infection demonstrated 75.63% efficacy in reducing cyst elimination and the severity of the infection, with complete resolution by the eighth day post-inoculation. The excretion of *E. histolytica* cysts was significantly higher in groups treated with metronidazole, which showed 67.56% efficacy but did not eradicate the infection until the tenth day (Mohamed, 2014).

*Lactobacillus salivarius*, a probiotic bacterium present in the gastrointestinal tract with various therapeutic properties, has also been investigated for its anti-amoebic activity. The supernatant containing the bacteriocin from *L. salivarius* was tested both in vitro and in vivo against *E. histolytica*, using metronidazole as a reference treatment. The results indicated that the bacteriocin from *L. salivarius* effectively inhibited the growth of *E. histolytica* in vitro, while the supernatant provided superior protection in vivo (Mohammed, 2015).

Studies involving *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* have demonstrated that these probiotic bacteria are effective in inhibiting the growth of *E. histolytica*. The treatment, conducted at various concentrations of the probiotic, proved effective across all tested concentrations, achieving an inhibition rate of 97.68% at a concentration of 10<sup>8</sup> cells/ml after 72 hours of incubation (Shafeek & Ruzzuki, 2016).

A randomized, double-blind clinical trial was conducted involving 57 adults diagnosed with intestinal amoebiasis, characterized by acute mucous diarrhea accompanied by fever and abdominal pain. Participants were randomly assigned to two groups. Group 1 received a combination of metronidazole and iodoquinol three times daily for 10 days. Group 2 received the same regimen as Group 1, with the addition of lyophilized *Saccharomyces boulardii*, also administered three times daily for 10 days. Follow-up assessments were conducted at 2 and 4 weeks post-treatment. Results indicated that the inclusion of the probiotic significantly reduced the duration of amoebic dysentery by approximately 25% and decreased the incidence of fever and abdominal pain by nearly 50%. In terms of parasitic cysts in fecal samples, Group 1 demonstrated an 81.5% reduction, while the probiotic group achieved a complete reduction (100%) of the parasitic cyst form elimination (Mansour-Ghanaei & Shafaghi, 2003).

Another randomized clinical trial involving 53 children selected based on clinical symptoms (fever, bloody diarrhea, and abdominal pain) divided the participants into two groups. Group A received metronidazole treatment twice daily, while Group B was treated with both metronidazole and *Saccharomyces boulardii*, also administered twice daily. The results indicated that the resolution of bloody diarrhea occurred more rapidly in Group B. A similar trend was observed for the cessation of diarrhea, with a shorter duration noted in Group B compared to Group A. When both symptoms were assessed over a 48-hour period, they were significantly more prevalent in Group A. After 36 hours, only 24% of children in Group B continued to experience diarrhea, compared to 76% in Group A; additionally, 12% of children in Group B still exhibited blood in their stools, whereas this figure was 44% in Group A. Over a five-day period, all children in Group B were free of blood in

their stools and did not present with trophozoites or cysts. By the end of ten days, all children in both groups had fully recovered based on the parameters evaluated in the study (Dinleyici, 2009).

In another study, forty-five children in Group I received only oral metronidazole for 10 days, while another 40 in Group II received *Saccharomyces boulardii* in addition to the same medication. The primary outcomes investigated included the duration of acute and bloody diarrhea, the frequency and consistency of stool, the time taken for symptom resolution, as well as the tolerance and side effects associated with the treatment regimens. The results indicated that the rate of children with amoebic cysts two weeks after the cessation of treatment was 8.8% in Group I and 7.5% in Group II (Savas-Erdeve & Dallar, 2009).

A study was conducted involving 45 rats suffering from watery diarrhea. All fecal samples contained trophozoites of *Entamoeba histolytica*. The rats were divided into three groups: the first group received 2 ml of *Lactobacillus casei* extract orally, the second group received 2 ml of *L. casei* suspension, and the third group received 2 ml of normal saline as a positive control. The first group exhibited an 80% recovery rate, the second group demonstrated a 100% recovery rate, while the control group showed no recovery (Rahi & Nashaat, 2013).

Another recent study selected twenty bacterial isolates based on their ability to tolerate acid and bile salt. The selected isolate was assessed for in vivo safety using a mouse model, demonstrating significant activity in the elimination of *E. histolytica* (Das & Dam, 2024).

Despite the limited number of studies evaluating the amoebicidal activity of probiotics and their role in inhibiting amoebic proliferation, the findings highlight the therapeutic potential of probiotics as an alternative or adjunctive treatment for amoebiasis. Given the scarcity of research in this field and the promising therapeutic effects of probiotics, particularly in intestinal infections, this review encourages further investigation into the use of probiotics for amoebiasis, aiming to establish their role in the management of this condition.

## 6. Final Considerations

Based on the studies presented it is evident that different probiotic strains, such as *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus delbrueckii*, demonstrated significant efficacy in inhibiting and controlling infections caused by *Entamoeba histolytica*. These probiotics were shown to reduce cyst excretion, decrease the viability and proliferation of trophozoites, and in some cases, completely eliminate the infection in both in vivo and in vitro models. The effectiveness of the probiotics varied depending on the strain and the study conditions; however, in many instances, their efficacy was comparable to or exceeded that of the standard treatment with metronidazole, highlighting the therapeutic potential of probiotics as complementary or alternative agents in the treatment of amoebiasis.

These findings underscore the significance of further investigating probiotics as a promising and safe strategy for treating *E. histolytica* infections. This is particularly important due to their potential to decrease parasitic load while minimizing the common side effects associated with traditional medications. Future research should aim to elucidate the mechanisms by which probiotics exert their effects, optimize dosing regimens, and assess their efficacy in human subjects. This will contribute to the development of a broader range of therapeutic options for managing these infections.

## Acknowledgments

VMO and MAG are grateful to CNPq and FAPEMIG for the research grant.

## Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Abasszade, J. H., Little, R., Yeaman, F., Robertson, M., & Bell, S. (2021). Amoebic colitis: A case series of a recurring missed diagnosis. *JGH Open*, 5(3), 404-407.
- Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E. et al. (2019). Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4-119.
- Al-Tawaha, R., & Meng, C. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Adv. Environ. Biol.*, 12, 16-27.
- Birchough, G. M., Johansson, M. E., Gustafsson, J. K., Bergström, J. H., & Hansson, G. (2015). New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal immunology*, 8(4), 712-719.
- Carrero, J. C., Reyes-López, M., Serrano-Luna, J., Shibayama, M., Unzueta, J., León-Sicaños, N., & de la Garza, M. (2020). Intestinal amoebiasis: 160 years of its first detection and still remains as a health problem in developing countries. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(1), 151358.
- Cuellar-Guevara, F. L., Barrón-González, M. P., & Menchaca-Arredondo, J. L. (2019). Effect of *Lactobacillus* postbiotics on *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Revista de investigación clínica*, 71(6), 402-407.
- Das, M., Biswas, P., & Das, S. (2024). Isolation and Potential Probiotic Characterization of Lactic Acid Bacteria from an Ethnic Fermented Beverage having Antibacterial Activity against Human Pathogen *Entamoeba histolytica*. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 14(2).
- Dinleyici, E., Eren, M., Yargic, Z., DOĞAN, N., & Vandenplas, Y. (2009). Clinical efficacy of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole compared to metronidazole alone in children with acute bloody diarrhea caused by amoebiasis: a prospective, randomized, open label study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(6).
- Flach, J., Van Der Waal, M. B., Kardinaal, A. F. M., Schloesser, J., Ruijschop, R. M. A. J., & Claassen, E. (2018). Probiotic research priorities for the healthy adult population: A review on the health benefits of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12. *Cogent Food & Agriculture*, 4(1), 1452839.
- Gomes, I. S. & Caminha, I. O. (2014). Guia para estudos de revisão sistemática: uma opção metodológica para as Ciências do Movimento Humano. *Movimento*, 20 (1), 395-411.
- Guillén, N. (2023). Pathogenicity and virulence of *Entamoeba histolytica*, the agent of amoebiasis. *Virulence*, 14(1), 2158656.
- Imperato, P. J. (1981). A historical overview of amoebiasis. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 57(3), 175.
- Johansson, M. E., Phillipson, M., Petersson, J., Velcich, A., Holm, L., & Hansson, G. C. (2008). The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(39), 15064-15069.
- Khalaf, K. J. (2013). Study of *Lactobacillus acidophilus* as a treatment and prophylaxis for *Entamoeba histolytica* infected mice. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2(5), 1229-1237.
- Kissoon-Singh, V., Moreau, F., Trusevych, E., & Chadee, K. (2013). *Entamoeba histolytica* exacerbates epithelial tight junction permeability and proinflammatory responses in *Muc2*<sup>-/-</sup> mice. *The American journal of pathology*, 182(3), 852-865.
- Lidell, M. E., Moncada, D. M., Chadee, K., & Hansson, G. C. (2006). *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(24), 9298-9303.
- Magistrelli, L., Amoroso, A., Mogna, L., Graziano, T., Cantello, R., Paine, M., & Couzi, C. (2019). Probiotics may have beneficial effects in Parkinson's disease: in vitro evidence. *Frontiers in immunology*, 10, 969.
- Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E., & Perdigon, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(2), 115-124.
- Mansour-Ghannai, F., Dehbashi, N., Yazdamparast, K., & Shafiqhi, A. (2003). Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 9(8), 1832.
- Mattos, P. C. (2015). Tipos de revisão de literatura. Unesp, 1-9. <https://www.fca.unesp.br/Home/Biblioteca/tipos-de-revisao-de-literatura.pdf> 6.1.3).
- Mazziotta, C., Tognon, M., Martini, F., Torreggiani, E., & Rotondo, J. C. (2023). Probiotics mechanism of action on immune cells and beneficial effects on human health. *Cells*, 12(1), 184.
- Mohamed, S. T. (2014). Use of *Bifidobacterium* for Treatment and Protective from *Entamoeba Histolytica* Infection in Mice. *International Journal of Science and Technology*, 3(1).
- Mohammed, S., Khalaf, K., & Sulaiman, N. (2015). *Lactobacillus salivarius* bacteriocin and supernatant activity against *Entamoeba histolytica* in vitro and in vivo. *Br J Biol Health Med Sci Res*, 3, 19-28.

- Moncada, D., Keller, K., & Chadee, K. (2005). Entamoeba histolytica-secreted products degrade colonic mucin oligosaccharides. *Infection and immunity*, 73(6), 3790-3793.
- Montalban-Arques, A., De Schryver, P., Bossier, P., Gorkiewicz, G., Mulero, V., Gatlin III, D. M., & Galindo-Villegas, J. (2015). Selective manipulation of the gut microbiota improves immune status in vertebrates. *Frontiers in Immunology*, 6, 512.
- Morán, P., Serrano-Vázquez, A., Rojas-Velázquez, L., González, E., Pérez-Juárez, H., Hernández, E. G., ... & Jiménez, C. (2023). Amoebiasis: Advances in diagnosis, treatment, immunology features and the interaction with the intestinal ecosystem. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11755.
- Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Erumud, A., Birchenough, G. M., Schütte, A., ... & Hansson, G. C. (2014). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunological reviews*, 260(1), 8-20.
- Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFMS. 6.1.2).
- Rahi, A. A., & Nashaat, Z. (2013). Leaky cells and the use of Lactobacillus casei in the treatment of laboratory animals infected with amoebic dysentery. *Euphrates Journal of Agricultural Science*, 3(1), 15-22.
- Sabti, Z. S., Abbas, S. K., & Mahmood, N. N. (2019). Investigation the Role of Lactobacillus ssp. on Entamoeba histolytica Pathogenesis. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(10).
- Samba-Louanka, A., Delafont, V., Rodier, M. H., Cateau, E., & Héchar, Y. (2019). Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS microbiology reviews*, 43(4), 415-434.
- Sanders, M. E., Guerner, F., Guerrant, R., Holt, P. R., Quigley, E. M., Sartor, R. B., ... & Mayer, E. A. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5), 787-796.
- Sarao, L. K., & Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(2), 344-371.
- Sarid, L., Zanditenas, E., Ye, J., Trebicz-Geffen, M., & Ankri, S. (2022). Insights into the mechanisms of Lactobacillus acidophilus activity against Entamoeba histolytica by using thiol redox proteomics. *Antioxidants*, 11(5), 814.
- Savaş-Erdeve, S., Gökay, S., & Dallar, Y. (2009). Efficacy and safety of Saccharomyces boulardii in amebiasis-associated diarrhea in children. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 51(3), 220-224.
- Shafeek, Z., & Ruzzuki, N. (2016). The effect of different concentrations of the run and stuck bacteria (Lactobacillus fermentum, Lactobacillus delbrueckii) in trophozoite growth of Entamoeba histolytica in vitro. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 5, 924-30.
- Sperandio, B., Fischer, N., & Sansonetti, P. J. (2015). Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. In *Seminars in immunology*, Vol. 27, No. 2, pp. 111-118.
- Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2020). Immune response to the enteric parasite Entamoeba histolytica. *Physiology*, 35(4), 244-260.
- Walsh, J. A. (1986). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Reviews of infectious diseases*, 8(2), 228-238.
- Whittemore, R., & Knaf, K. (2005). The integrative review: updated methodology. *Journal of advanced nursing*, 52(5), 546-553.

## 9.1.2. Amebicidal Activity of *Escherichia coli* Nissle 1917 Against *Entamoeba histolytica*



Article

### Amebicidal Activity of *Escherichia coli* Nissle 1917 Against *Entamoeba histolytica*

Vivian Moura-Oliveira <sup>1</sup>, Fabrício M. S. Oliveira <sup>2</sup>, Olga L. M. Moreno <sup>3</sup>, Julia R. Ferreira <sup>1</sup>, Raphael E. Szawka <sup>4</sup>, Ana C. Campideli-Santana <sup>4</sup>, Jullia Teles <sup>1</sup>, Luciano S. A. Capettini <sup>3</sup>, Flaviano S. Martins <sup>5</sup> and Maria A. Gomes <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; vivian-moura@live.com (V.M.-O.); juliaRodriguesferreira.16@gmail.com (J.R.F.); juju54321@live.com (J.T.)

<sup>2</sup> Translational Type 2 Immunity Laboratory, Microbiology, Immunology and Tropical Medicine Department, George Washington School of Medicine and Health Sciences, Washington, DC 20052, USA; oliveirafms13@gmail.com

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; olgamore2@gmail.com (O.L.M.M.); lucianocapettini@gmail.com (L.S.A.C.)

<sup>4</sup> Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; reszawka@gmail.com (R.E.S.); anaclaracampideli@gmail.com (A.C.C.-S.)

<sup>5</sup> Department of Microbiology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; flaviano@ich.ufmg.br

\* Correspondence: magomes@ich.ufmg.br

**Abstract:** Amebiasis is a globally prevalent infection that can lead to fatal outcomes if not adequately treated. Conventional treatment with imidazoles often fails due to side effects and resistance, emphasizing the need for alternative therapies. The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) has shown potential in combating intestinal pathogens. This study aimed to evaluate the amebicidal activity of EcN in vitro and its effect on the production of reactive oxygen species (ROS). Trophozoites of *Entamoeba histolytica* ( $2.5 \times 10^4$  cells/mL) were cultured in 96-well plates and exposed to varying concentrations of EcN ( $10^2$ – $10^9$  cells/mL). Plates were incubated at 36 °C for 6, 12, and 18 h, after which trophozoite viability was assessed. Intracellular ROS production, including superoxide and hydrogen peroxide, was measured using fluorescent probes. The highest efficacy was observed after 18 h at a CFU concentration of  $10^9$  cells/mL. Increased ROS production at all probiotic concentrations suggested a role in EcN's amebicidal mechanism. Morphological changes in trophozoites, such as rounding, vacuolization, and size reduction, were noted after EcN exposure, indicating growth inhibition. These findings suggest EcN induces structural and morphological changes in *E. histolytica*, inhibiting its growth in vitro. The findings suggest the potential efficacy of EcN; however, definitive confirmation requires data from human clinical trials.

**Keywords:** *Entamoeba histolytica*; *Escherichia coli*; Nissle; probiotic; reactive oxygen species



Academic Editors: Pramod Gopal and Todd Riley Callaway

Received: 6 December 2024

Revised: 7 March 2025

Accepted: 18 March 2025

Published: 5 April 2025

Citation: Moura-Oliveira, V.; Oliveira, F.M.S.; Moreno, O.L.M.; Ferreira, J.R.; Szawka, R.E.; Campideli-Santana, A.C.; Teles, J.; Capettini, L.S.A.; Martins, F.S.; Gomes, M.A. Amebicidal Activity of *Escherichia coli* Nissle 1917 Against *Entamoeba histolytica*. *Microorganisms* 2025, 13, 828. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13040828>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1. Introduction

*Entamoeba histolytica* is an anaerobic eukaryotic protozoan and the etiological agent of amebiasis. The infection is globally distributed, with a higher prevalence in developing countries, particularly in regions with inadequate water treatment. There is a notable incidence in areas where contaminated water containing cysts, the infective form of the parasite, is used for vegetable cultivation [1,2].

Infection with *E. histolytica* can present as symptomatic or asymptomatic [3]. The primary site of infection is the intestine; however, the amoeba can disseminate to other organs, resulting in extraintestinal amebiasis, with the liver being the most common site. In developing countries, diarrhea remains the third leading cause of mortality in children under five years of age [4], and amebiasis is listed among the top 15 causes of mortality [5].

An estimated 50 million cases of invasive *E. histolytica* infection occur annually, resulting in approximately 100,000 deaths. The prevalence of infection exhibits global variation, ranging from 10% to 50% across different regions worldwide [6,7]. However, it is believed that this percentage may be underestimated, as asymptomatic infections can be caused by both *E. histolytica* and *E. dispar*, which are morphologically indistinguishable.

The treatment of choice for amebiasis is metronidazole [8]. However, in up to 50% of patients, this medication alone fails to eradicate intestinal colonization, leaving affected individuals at a substantial risk of relapse months later. This peculiarity underscores the necessity for research into alternative therapeutic options that, in addition to ensuring safety, demonstrate effective activity while minimizing adverse effects and resistance. In this context, probiotics emerge as promising alternatives for either curative or preventive treatment [9–11].

A well-known probiotic is *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) [12–14]. EcN is a Gram-negative enterobacterium that can colonize the intestine within a few days and persist as a colonic microbiota for months after administration [15,16]. This interaction of EcN with the microbiota promotes direct antagonistic effects, such as the inhibition of the growth and death of pathogenic bacteria and yeasts. Indirect antagonistic effects involve the inhibition of the invasion of intestinal epithelial cells by invasive pathogens and include signaling with the intestinal mucosa [17]. EcN inhibited the growth of 21 bacterial isolates, including 40% for *Pseudomonas*, 50% for *E. coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus*, and 100% for *Klebsiella* and *Enterobacter* [18]. EcN has also been shown to effectively inhibit the adhesion of the adherent-invasive *E. coli* isolated from Crohn's disease patients, supporting its use as an adjunctive treatment for these patients [19]. There is limited research evaluating the effects of EcN in parasitic infections. The therapeutic potential of this probiotic in amebiasis has not yet been assessed. Therefore, the objective of our study was to expand research on probiotics for the treatment of amebiasis by assessing the amebicidal activity of EcN in vitro and its effect on the production of reactive oxygen species.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *E. histolytica* Strain

The axenic strain EGG of *E. histolytica* used in this study was isolated in our laboratory from a patient residing in Manaus, Amazonas, who presented with dysentery. The patient's diagnosis was confirmed through serology, zymodeme analysis, and PCR, all of which were positive for *E. histolytica* [20].

The strain was maintained in axenic culture and grown in TYI-S-33 medium [21]. Inoculations were performed every 72–96 h, and the tubes were stored with an inclination of 30 degrees in a bacteriological oven under temperature of 37 °C.

### 2.2. *Escherichia coli* Nissle 1917

The probiotic EcN (Mutaflor; Ardeypharm, Herdecke, Germany) was acquired as a pharmaceutical product available in Canada. EcN was isolated and maintained in brain-heart infusion broth under aerobic conditions for 24 h at 37 °C. Subculturing was performed every 24 h to ensure its use during the exponential growth phase.

EcN was acclimated in TYI-S-33 medium prior to association with *E. histolytica* to ensure its viability during the assays. Colony-forming units (CFUs) were determined

through serial dilution in TYI-S-33 medium to achieve concentrations ranging from  $10^2$  to  $10^9$  cells/mL. Culture viability, colony counts, and purity were assessed via Gram staining for quality control.

### 2.3. In Vitro Association

Initially, 40,000 *E. histolytica* trophozoites were distributed into a 96-well plate. The plate was then incubated at 37 °C for 1 h to ensure adherence of the trophozoites to the plate surface. After the incubation, the supernatant was discarded. To the wells containing *E. histolytica*, 270 µL of TYI-S-33 medium and 30 µL of *E. coli* Nissle (EcN) were added in serial dilutions, achieving concentrations ranging from  $10^2$  to  $10^9$  cells/mL. The plate was subsequently incubated with the probiotic concentrations at 37 °C for 6, 12, and 18 h. Following each incubation period, the viability of the amoebae was assessed by counting using a hemocytometer and trypan blue exclusion.

The wells containing only *E. histolytica*, without the addition of EcN, were considered as controls, with 100% viable cells. The number of viable trophozoites for each probiotic concentration was quantified and compared to the control to calculate the percentage of inhibition at different association times and concentrations.

The final inhibition percentage for each treatment was calculated using the following formula adapted from Edington [22]:  $I (\%) = [(CEhC - CEhT)/CEhC] \times 100$ , where I represents the inhibition percentage; CEhC denotes the trophozoite growth of *Entamoeba histolytica* in the control; and CEhT indicates the trophozoite growth of *Entamoeba histolytica* in the treatment.

### 2.4. Morphometric Analysis of the Trophozoites

For the morphometric analysis of trophozoite size, the area of each trophozoite was measured, considering that live trophozoites could assume an amoeboid shape. Images of 15 viable trophozoites and 15 dead trophozoites were captured using a JVC TK-1270/RGB microcamera (Tokyo, Japan) under a 40× objective for digitization. The area occupied by each trophozoite was measured using QuPath software version 0.5.1 (<https://qupath.github.io>, accessed on 19 February 2025).

### 2.5. Determination of Reactive Oxygen Species

To assess intracellular reactive oxygen species (ROS) production, specifically superoxide radicals and hydrogen peroxide, intracellular fluorescent probes were employed. Following the treatments, the cells were washed with PBS (pH 7.2) and subsequently incubated with fluorescent probes for superoxide (dihydroethidium, DHE, 5 µM; Invitrogen, Waltham, MA, USA) and hydrogen peroxide (dihydrodichlorofluorescein diacetate, H2-DCF-DA, 5 µM; Invitrogen, USA) for 30 min. The DAPI probe was used for nuclear staining (for 5 min). All procedures were conducted in the dark, and cells were washed with PBS after staining. Post-incubation, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and subsequently examined using fluorescence microscopy for further analysis.

### 2.6. Fluorescence

Initially, round cover slips of 13 mm diameter were placed into each well of a 24-well plate. Subsequently, 200 µL of a solution containing 40,000 trophozoites of *E. histolytica* were distributed into each well. To ensure the adherence of the amoebae to the glass cover slips, the plate was incubated at 37 °C for 1 h. Following incubation, the supernatant was discarded. In wells containing *E. histolytica*, 270 µL of TYI-S-33 medium and 30 µL of probiotic bacteria, previously diluted to achieve successive dilutions ranging from  $10^4$  to  $10^9$  CFU, were added. The plate was incubated again at 37 °C for 6, 12, and 18 h. No antibiotics were employed during the co-cultivation experiment. Finally, the cover slips

were removed from the plate and mounted on slides for imaging under a fluorescence microscope, with emission/excitation wavelengths set at 525/470 nm and 629/572 nm for H2-DCF-DA and DHE probes, respectively.

After the incubation period, the plates were examined using an inverted microscope to assess cell growth, viability, and adherence. Images were captured with a 20× objective on a fluorescence microscope (Axiovision 3.1, Zeiss, Hallbergmoos, Germany). Immunoreactive cells were identified by their green cytoplasm and blue nuclei. Photographs of fields containing 5 to 10 cells were taken for each experimental treatment across three fluorescent channels—blue, green, and red.

### 2.7. Statistical Analysis

In the *in vitro* assay, a two-way ANOVA was conducted to compare the effects of different *E. coli* Nissle concentrations across different time points (6 h, 12 h, and 18 h). To identify the specific differences in viability at each time point, Tukey's post-hoc test for multiple comparisons was employed ( $p < 0.05$ ). Data were processed using the statistical software package GraphPad Prism, version 9.0.

## 3. Results

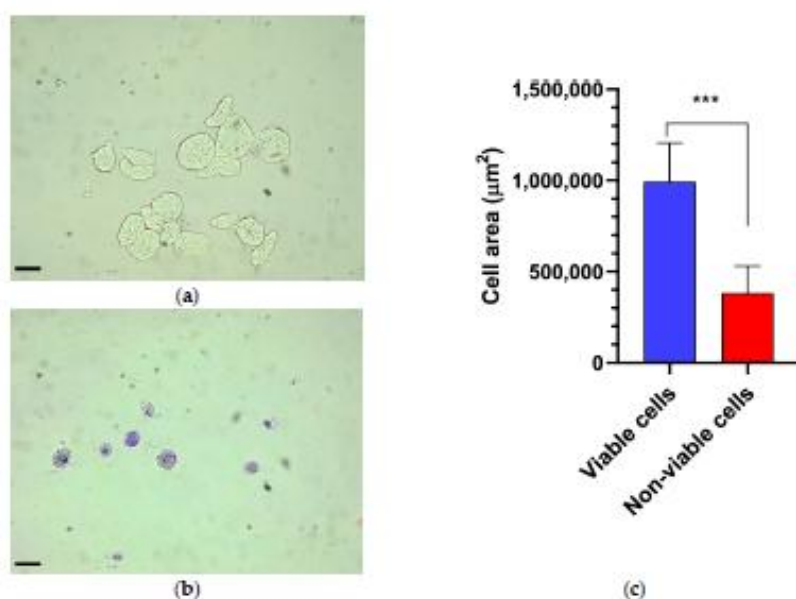
### 3.1. Effect of Probiotic EcN on *E. histolytica* Viability

The viability of *E. histolytica* following association with EcN was assessed by counting viable trophozoites using a hemocytometer at intervals of 6, 12, and 18 h. Following exposure to the probiotic, the dead or distressed trophozoites, observed under an optical microscope, appeared stained with trypan blue and generally had a rounded shape (Figure 1a,b). Additionally, they were smaller in size compared to viable trophozoites, as confirmed by measuring the area occupied by each trophozoite (Figure 1c). The number of trophozoites was quantified and graphically represented in relation to the variation in EcN concentration (Figure 2a). Inhibition of *E. histolytica* growth was observed at all incubation times and across all probiotic concentrations. This inhibitory effect was most evident after 18 h of association at a CFU of  $10^9$  cells/mL (Figure 2b).

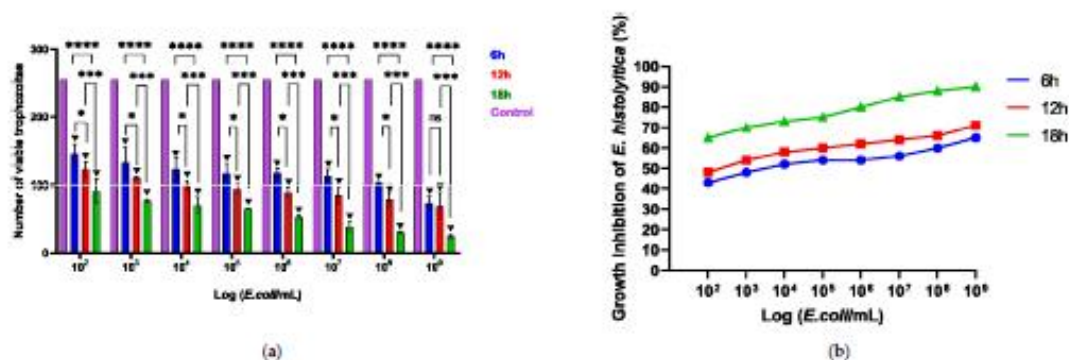
### 3.2. ROS Production

The production of superoxide and hydrogen peroxide was evaluated in the co-culture of EcN and *E. histolytica*. We focused on the analysis of ROS production at 6 h and 18 h. These were the two extremes of our experimental design and showed significant differences in the number of trophozoites between them.

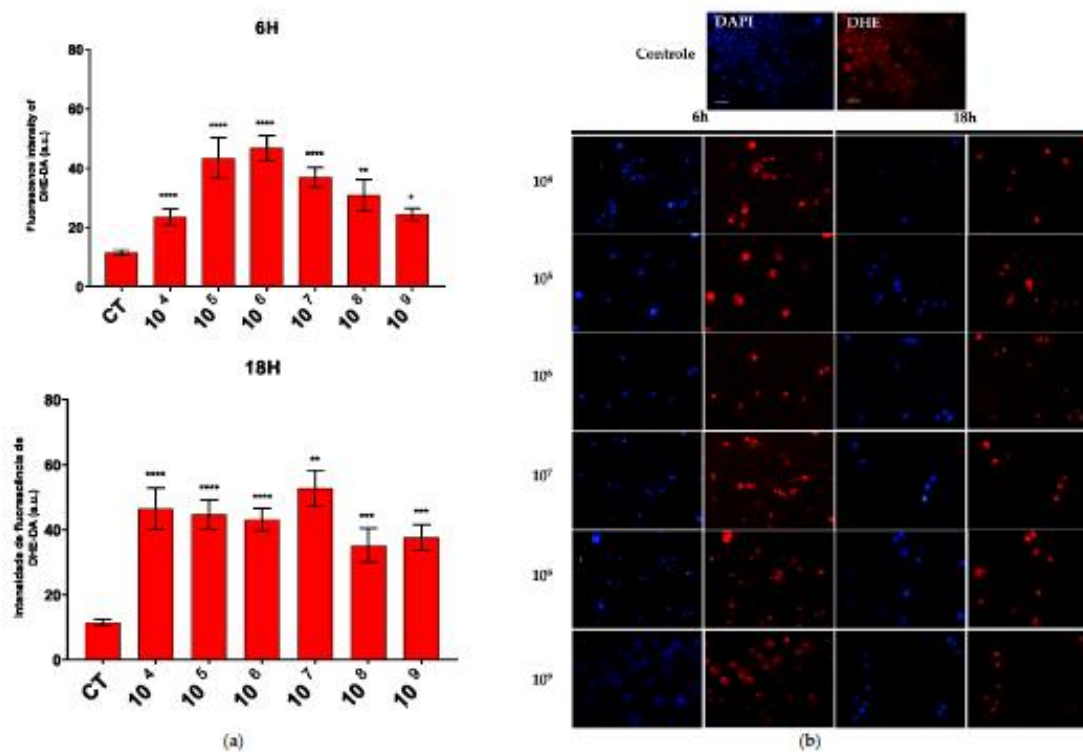
An increase in the production of both compounds was observed across all the associated time points and probiotic concentrations. Notably, a marked enhancement in superoxide production was detected at a concentration of  $10^6$  cells/mL after six hours of association and at  $10^7$  cells/mL after eighteen hours (Figure 3a).



**Figure 1.** Morphological assessment of *Entamoeba histolytica* trophozoites. (a) Control. Viable trophozoites exhibit a larger size and remain unstained by trypan blue. (b) In contrast, non-viable trophozoites display a rounded shape, increased cytoplasmic granularity, and intense staining with trypan blue. (c) Comparison of the trophozoite cell area between viable and non-viable cells, with a significant difference ( $p < 0.0007$ ). Bar = 70  $\mu\text{m}$ . \*\*\*  $p < 0.001$ .



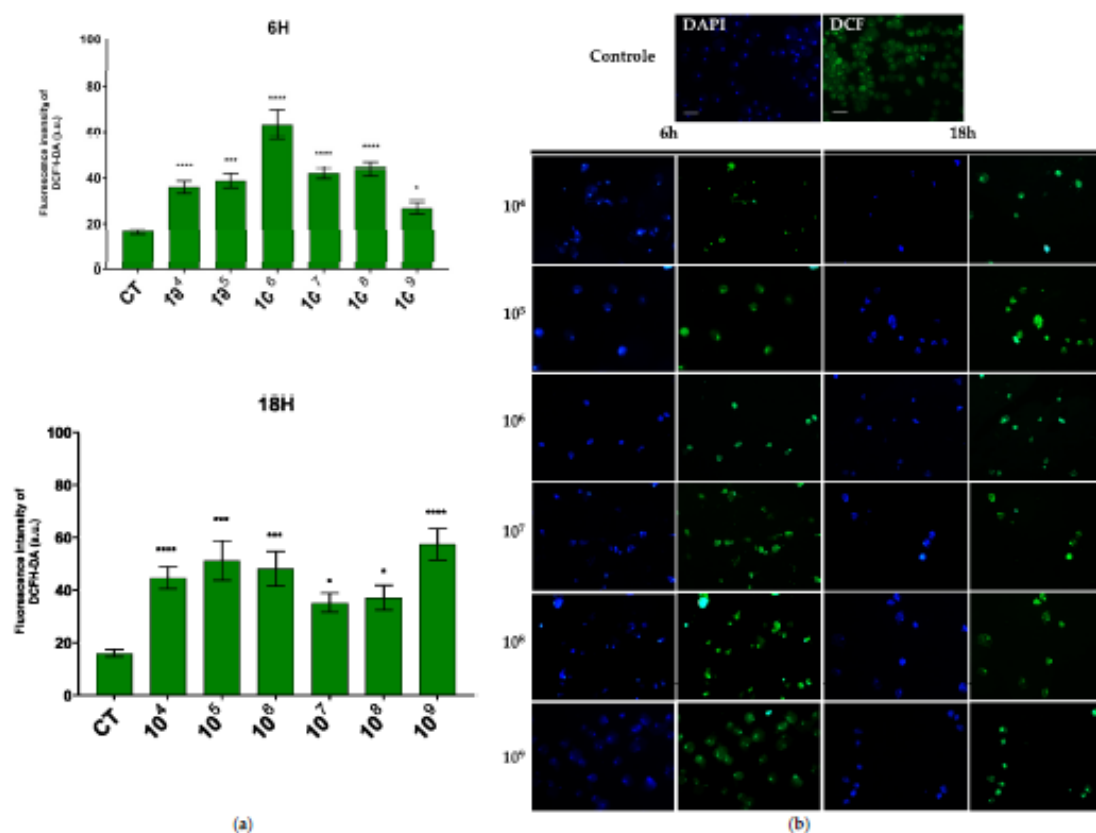
**Figure 2.** (a) Number of viable cells following the association of the parasite *E. histolytica* with the probiotic *E. coli* Nissle, subjected to different concentrations ( $10^2$ – $10^9$ ) across various time intervals, in a 96-well plate. (b) Impact of probiotics on the inhibition of *E. histolytica* trophozoites over different time periods and at varying concentrations. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*\*  $p < 0.001$ ; ▼  $p < 0.001$  Significant difference when compared to the control group.



**Figure 3.** ROS production evaluated by DHE and DCF fluorescence. (a) Quantification of DHE-DA fluorescence intensity in each group. (b) Fluorescence microscopic images of intracellular production of DHE-DA staining in *E. histolytica* after interaction with the probiotic *E. coli* Nissle at different concentrations over 6 h and 18 h. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.002$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Regarding hydrogen peroxide, the concentration that showed the most pronounced reaction was also  $10^6$  cells/mL over a 6-h period, while in the 18-h period, the concentration of  $10^9$  cells/mL was most effective (Figure 4a).

In the fluorescence analysis, a clear morphological alteration of the trophozoites was observed following their interaction with the probiotic. The cells acquired a more rounded shape and exhibited vacuolation, accompanied by a reduction in size. Additionally, there was an apparent loss of the intracellular ameboid medium (Figures 3b and 4b).



**Figure 4.** ROS production evaluated by DCFH-DA fluorescence. (a) Quantification of DCFH-DA fluorescence intensity in each group. (b) Fluorescence microscopic images of intracellular production of DCFH-DA staining in *E. histolytica* after interaction with the probiotic *E. coli* Nissle at different concentrations over 6 h and 18 h. Bar = 50  $\mu$ m. \*  $p < 0.004$ ; \*\*\*  $p < 0.0003$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 4. Discussion

The treatment of choice for amebiasis involves adverse effects that often lead to the discontinuation of therapy. Additionally, the suspicion of drug resistance signals the importance of alternative therapies in resolving the infection. Probiotics have emerged as potentially attractive options. However, the use of probiotics has been timidly evaluated in amebiasis. The combination of *Saccharomyces boulardii* and metronidazole for the treatment of amebiasis has been reported to reduce the duration of clinical symptoms and cyst excretion [23]. Furthermore, *S. boulardii* has demonstrated effectiveness in inhibiting the adherence of amoebae to the intestinal mucosal surface [24]. *Lactobacillus helveticus* has been identified as a potential probiotic for amebiasis [25,26], while *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* have demonstrated in vitro activity against *E. invadens* [27]. However, the precise mechanism of action of these probiotics remains incompletely understood. Our research group assessed the efficacy of the lactic acid bacterium *Weissella paramesenteroides* WpK in resolving the lesions induced by *E. dispar* in murine models. The bacterium facilitated the recovery of necrotic regions by enhancing intestinal mucosal protection through the upregulation of MUC-2 and epithelial regeneration [28].

EcN is a well-established probiotic with recognized benefits for intestinal homeostasis [29–31]. In this context, we investigated the potential of EcN to contribute to the control of *E. histolytica* infection. Our results demonstrated a reduction in the proliferation of *E. histolytica* trophozoites in the presence of EcN, suggesting an anti-amebic activity of the probiotic. This activity was time-dependent, with maximum efficacy observed at 18 h, resulting in over 80% inhibition of *E. histolytica* trophozoite growth. These findings support the therapeutic potential of EcN in the treatment of amoebiasis.

In addition to the relationship between exposure time and the ability of EcN to inhibit the growth of *E. histolytica*, the quantity of probiotic cells is also crucial for the effectiveness of its activity. Inhibition of *E. invadens* growth was observed at a concentration of  $10^8$  CFU/mL, with *E. faecium* demonstrating approximately 71% inhibition of the parasite's growth, and *L. casei* showing approximately 50% inhibition [27].

In this study, the most effective treatment was observed at a concentration of  $10^9$  CFU/mL of EcN. The efficacy of a probiotic in vivo depends on the specific strain, but generally, the effective dosage for inducing favorable changes in the intestinal microbiota ranges from  $10^8$  to  $10^9$  CFU/mL [32]. Although this study was conducted in vitro, the findings indicate that probiotic concentration plays a crucial role in the observed effects, aligning with dosages recommended in the in vivo studies. In vitro models are valuable tools for investigating initial mechanisms and providing insights for future in vivo research. Notably, all the concentrations of EcN tested resulted in a reduction in *E. histolytica* proliferation, reinforcing its potential therapeutic application in amoebiasis.

When associating EcN with *E. histolytica*, a clear reduction in the proliferation of the amoebas was observed. Anaerobic microorganisms possess inherently weak antioxidant defenses against oxidative stress. In *E. histolytica*, ROS act as significant cytotoxic effectors, causing protein oxidation which generally leads to the inhibition of protein synthesis [33]. Probiotics may serve as effective allies in controlling the proliferation of pathogenic microorganisms through the production of ROS.

In the association between EcN and *E. histolytica*, the production of hydrogen peroxide and superoxide was observed. The generation of free radicals is a common process during interactions between microorganisms. The probiotic effect of *Lactobacillus helveticus* has been attributed to its capacity to produce hydrogen peroxide [25,34].

*E. histolytica* trophozoites exhibited a more rounded and vacuolated morphology, along with a reduction in size following association with EcN. Additionally, a loss of intracellular amebic content was observed. Collectively, these findings indicate that EcN acts as a causative agent of the morphological and structural alterations observed in the amebic cells.

Among the potential mechanisms of action identified for the microbicidal activity of EcN are the enhancement of transepithelial resistance [35], a beneficial effect on the formation and stabilization of epithelial tight junctions [36], the positive regulation of zona occludens-1 mRNA expression [37], the induction of human  $\beta$ -defensin 2, an inducible antimicrobial peptide synthesized by the epithelium to counteract bacterial adhesion and invasion [38], and a protective role against pathogenic *E. coli* strains that colonize the intestines of patients with inflammatory bowel disease [19]. For the first time, the possibility of probiotic activity of EcN via reactive oxygen species is suggested. The production of hydrogen peroxide and superoxide by EcN may represent a mechanism through which the probiotic exerts its amebicidal activity.

## 5. Conclusions

The results of this study provide good evidence that the probiotic EcN inhibits the growth of *E. histolytica* trophozoites. This inhibitory effect was accompanied by significant

morphological changes in the trophozoites, including rounding, vacuolization, and reduction in size. A notable decrease in trophozoite numbers was observed in cultures exposed to EcN, with the most pronounced effect occurring at a concentration of  $10^9$  cells/mL and after an 18-h incubation period, suggesting a dose- and time-dependent relationship. Additionally, for the first time, this study identifies the production of hydrogen peroxide and superoxide as a novel mechanism of action for EcN, which likely contributes to its inhibitory effects. Together, these findings shed new light on the therapeutic potential of EcN in the treatment of amoebiasis and encourage further research to explore the underlying mechanisms involved.

**Author Contributions:** Conceptualization: M.A.G. and F.M.S.O. Data Curation: V.M.-O., F.M.S.O., L.S.A.C., F.S.M. and M.A.G. Formal Analysis: V.M.-O., F.M.S.O., F.S.M., L.S.A.C. and M.A.G. Investigation: V.M.-O., O.L.M.M., J.R.F., J.T., F.M.S.O. and L.S.A.C. Methodology: V.M.-O., O.L.M.M., J.R.F., J.T., R.E.S. and A.C.C.-S. Writing—Original Draft Preparation: V.M.-O. and M.A.G. Review and Editing: F.M.S.O., L.S.A.C., F.S.M. and M.A.G. Funding Acquisition: M.A.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), grant number: APQ-02829-18 and by FAPEMIG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq—Brasil grant number BPQ-06575-24. VMO was funded by CNPq/Brazil.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data that support the findings of this study are available in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Barlaam, A.; Sannella, A.R.; Ferrari, N.; Temesgen, T.T.; Rinaldi, L.; Normanno, G.; Cacciò, S.M.; Robertson, L.J.; Giangaspero, A. Ready-to-eat salads and berry fruits purchased in Italy contaminated by *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Entamoeba histolytica*. *Int. J. Food Microbiol.* **2022**, *370*, 109634. [\[CrossRef\]](#)
2. Saleh, F.E.R.; Gad, M.A.; Ashour, A.A.; Soliman, M.I.; El-Senousy, W.M.; Al-Herrawy, A.Z. Molecular detection of *Entamoeba histolytica* in fresh vegetables and irrigation. *Egypt. J. Aquat. Biol. Fish.* **2019**, *22*, 551–561. [\[CrossRef\]](#)
3. Yanagawa, Y.; Singh, U. Diversity and Plasticity of Virulent Characteristics of *Entamoeba histolytica*. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2023**, *8*, 255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Lozano, R.; Naghavi, M.; Foreman, K.; Lim, S.; Shibuya, K.; Aboyans, V.; Abraham, J.; Adair, T.; Aggarwal, R.; Ahn, S.Y.; et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **2012**, *380*, 2095–2128. [\[CrossRef\]](#)
5. Shirley, D.-A.T.; Farr, L.; Watanabe, K.; Moonah, S. A Review of the Global Burden, New Diagnostics, and Current Therapeutics for Amebiasis. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, ofy161. [\[CrossRef\]](#)
6. Nasrallah, J.; Akhouni, M.; Haouchine, D.; Marteau, A.; Mantelet, S.; Wind, P.; Benamouzig, R.; Bouchaud, R.; Dhote, R.; Izri, A. Updates on the worldwide burden of amoebiasis: A case series and literature review. *J. Infect. Public Health* **2022**, *15*, 1134–1141. [\[CrossRef\]](#)
7. Jiménez, C.; Morán, P.; Rojas, L.; Valadez, A.; Gómez, A. Reassessment of the epidemiology of amoebiasis: State of the art. *Infect. Genet. Evol.* **2009**, *9*, 1023–1032. [\[CrossRef\]](#)
8. Kumanan, T.; Sujaritha, V.; Sri Ranganathan, S. Metronidazole for Amoebiasis: A tale of more than half a century. *Jaffna Med. J.* **2021**, *33*, 6–13. [\[CrossRef\]](#)
9. Van de Wijgert, J.H.H.M.; Verwijs, M.C. Lactobacilli-containing vaginal probiotics to cure or prevent bacterial or fungal vaginal dysbiosis: A systematic review and recommendations for future trial designs. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2020**, *127*, 287–299. [\[CrossRef\]](#)
10. Iqbal, Z.; Ahmed, S.; Tabassum, N.; Bhattacharya, R.; Bose, D. Role of probiotics in prevention and treatment of enteric infections: A comprehensive review. *3 Biotech* **2021**, *11*, 242. [\[CrossRef\]](#)

11. Lopez-Santamarina, A.; Gonzalez, E.G.; Lamas, A.; Mondragon, A.C.; Regal, P.; Miranda, J.M. Probiotics as a possible strategy for the prevention and treatment of allergies. A narrative review. *Foods* **2021**, *10*, 701. [CrossRef] [PubMed]
12. Cao, H.; Zhou, T.; Tang, H.; Feng, P.; Ali, G.; Liu, P.; Li, X. Genetically encoded probiotic EcN 1917 alleviates alcohol-induced acute liver injury and restore gut microbiota homeostasis. *J. Funct. Foods* **2021**, *85*, 104661. [CrossRef]
13. Michael, H.; Miyazaki, A.; Lange, S.N.; Amimo, J.O.; Kick, M.K.; Chepngeno, J.; Paim, F.C.; Fischer, D.D.; Rajashekara, G.; Saif, L.J.; et al. *Escherichia coli* Nissle 1917 Enhances Efficacy of Oral Attenuated Human Rotavirus Vaccine in a Gnotobiotic Piglet Model. *Vaccines* **2022**, *10*, 83. [CrossRef] [PubMed]
14. Zhu, W.; Hao, L.; Liu, X.; Borrás-Hidalgo, O.; Zhang, Y. Enhanced anti-proliferative efficacy of epothilone B loaded with *Escherichia coli* Nissle 1917 bacterial ghosts on the HeLa cells by mitochondrial pathway of apoptosis. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 1328–1335. [CrossRef]
15. Blum, G.; Marre, R.; Hacker, J. Properties of *Escherichia coli* Strains of Serotype O6. *Infection* **1994**, *23*, 234–236. [CrossRef]
16. Kruijs, W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **2004**, *53*, 1617–1623. [CrossRef] [PubMed]
17. Sonnenborn, U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—From bench to bedside and back: History of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, fnw212. [CrossRef]
18. Storm, D.W.; Koff, S.A.; Horvath, D.J.; Li, B.; Justice, S.S. In Vitro Analysis of the Bactericidal Activity of *Escherichia coli* Nissle 1917 Against Pediatric Uropathogens. *J. Urol.* **2011**, *186*, 1678–1683. [CrossRef]
19. Boudeau, J.; Glasser, A.L.; Julien, S.; Colombel, J.F.; Darfeuille-Michaud, A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *18*, 45–56. [CrossRef]
20. Gomes, M.A.; Melo, M.N.; Macedo, A.M.; Pena, G.P.M.; Caliari, M.V.; Silva, E.F. Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by Biological, Biochemical, and Molecular Parameters. *Arch. Med. Res.* **2000**, *31*, S249–S250. [CrossRef]
21. Clark, C.G.; Diamond, L.S. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2002**, *15*, 329–341. [CrossRef] [PubMed]
22. Edgington, L.V. Fungitoxic Spectrum of Benzimidazole Compounds. *Phytopathology* **1971**, *61*, 42–44. [CrossRef]
23. Mansour-Ghanaei, F.; Dehbashi, N.; Yazdanparast, K.; Shafaghi, A. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. *World J. Gastroenterol.* **2003**, *9*, 1832–1833. [CrossRef] [PubMed]
24. Rigother, M.C.; Maccario, J.; Gayral, P. Inhibitory activity of *Saccharomyces* yeasts on the adhesion of *Entamoeba histolytica* trophozoites to human erythrocytes in vitro. *Parasitol. Res.* **1994**, *80*, 10–15. [CrossRef]
25. Sarid, L.; Zanditenas, E.; Ye, J.; Trebicz-Geffen, M.; Ankri, S. Insights into the Mechanisms of *Lactobacillus acidophilus* Activity against *Entamoeba histolytica* by Using Thiol Redox Proteomics. *Antioxidants* **2022**, *11*, 814. [CrossRef]
26. Varet, H.; Shaulov, Y.; Sismeiro, O.; Trebicz-Geffen, M.; Legendre, R.; Coppée, J.-Y.; Ankri, S.; Guillen, N. Enteric bacteria boost defences against oxidative stress in *Entamoeba histolytica*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9042. [CrossRef]
27. Sarjapuram, N.; Mekala, N.; Singh, M.; Tatu, U. The Potential of *Lactobacillus casei* and *Enterococcus faecium* Combination as a Preventive Probiotic Against *Entamoeba*. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2017**, *9*, 142–149. [CrossRef]
28. Prado, G.K.S.; Torrinha, K.C.; Cruz, R.E.; Gonçalves, A.B.B.; Silva, C.A.V.; Oliveira, F.M.S.; Nunes, A.C.; Gomes, M.A.; Caliari, M.V. *Wissella paramoenteroides* WpK4 ameliorate the experimental amoebic colitis by increasing the expression of MUC-2 and the intestinal epithelial regeneration. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *129*, 1706–1719. [CrossRef]
29. Van Baarlen, P.; Wells, J.M.; Kleerebezem, M. Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 208–215. [CrossRef]
30. Martens, K.; Pugin, B.; De Boeck, L.; Spacova, I.; Steelant, B.; Seys, S.F.; Lebeer, S.; Hellings, P.W. Probiotics for the airways: Potential to improve epithelial and immune homeostasis. *Allergy* **2018**, *73*, 1954–1963. [CrossRef]
31. Shini, S.; Bryden, W.L. Probiotics and gut health: Linking gut homeostasis and poultry productivity. *Anim. Prod. Sci.* **2021**, *62*, 1090–1112. [CrossRef]
32. Bai, J.C.; Ciacci, C. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Celiac Disease February 2017. *J. Clin. Gastroenterol.* **2017**, *51*, 755–768. [CrossRef] [PubMed]
33. Shahi, P.; Trebicz-Geffen, M.; Nagaraja, S.; Alterzon-Baumel, S.; Hertz, R.; Methling, K.; Lalk, M.; Ankri, S. Proteomic Identification of Oxidized Proteins in *Entamoeba histolytica* by Resin-Assisted Capture: Insights into the Role of Arginase in Resistance to Oxidative Stress. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004340. [CrossRef]
34. Collins, E.B.; Aramaki, K. Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **1980**, *63*, 353–357. [CrossRef]
35. Hering, N.A.; Richter, J.F.; Fromm, A.; Wieser, A.; Hartmann, S.; Günzel, D.; Bucker, R.; Fromm, M.; Schulzke, J.D.; Troeger, H. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol.* **2014**, *7*, 369–378. [CrossRef]

36. Zyrek, A.A.; Cichon, C.; Helms, S.; Enders, C.; Sonnenborn, U.; Schmidt, M.A. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKC $\zeta$  redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cdl. Microbiol.* **2007**, *9*, 804–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ukena, S.N.; Singh, A.; Dringenberg, U.; Engelhardt, R.; Seidler, U.; Hansen, W.; Bleich, A.; Bruder, D.; Franzke, A.; Rogler, G.; et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Inhibits Leaky Gut by Enhancing Mucosal Integrity. *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1308. [[CrossRef](#)]
38. Schlee, M.; Wehkamp, J.; Altenhoefer, A.; Oelschlaeger, T.A.; Stange, E.E.; Fellermann, K. Induction of Human  $\beta$ -Defensin 2 by the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 Is Mediated through Flagellin. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 2399–2407. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 9.2. Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do potencial probiótico de *Escherichia coli* nissle na colite amebiana experimental.", protocolo do CEUA: 50/2025 sob a responsabilidade de Maria Aparecida Gomes 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 6.899 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 21/05/2025.

Vigência da Autorização	21/05/2025 a 20/05/2030
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Gerbil / <i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	9
Peso/Idade	55g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
*Espécie/linhagem	Gerbil / <i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	9
Peso/Idade	55g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
*Espécie/linhagem	Gerbil / <i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	9
Peso/Idade	55g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
*Espécie/linhagem	Gerbil / <i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	9
Peso/Idade	55g / 5(semanas)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG
Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Gerbil / <i>Meriones unguiculatus</i>
Nº de animais	36
Idade	5(semanas)

Sexo	indiferente
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas ICB UFMG

## Considerações posteriores:

21/05/2025	Aprovado no dia 21/05/2025. Validade: 21/05/2025 à 20/05/2030. Aprovação será homologada na reunião de 26/05/2025
------------	---

Belo Horizonte, 22/06/2025.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

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](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)