

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Patologia
Faculdade de Medicina

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DAS CEPAS MCR,
ACFN, ICS, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar***

César Augusto Vilela da Silva

Belo Horizonte

2018

Cézar Augusto Vilela da Silva

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DAS CEPAS MCR, ACFN,
ICS, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Patologia - área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari (UFMG)
Co-orientador: Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes (UFMG)

Belo Horizonte
2018

Silva, Cezar Augusto Vilela da.
SI586a Avaliação da virulência e da patogenicidade das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de Entamoeba dispar [manuscrito]. / Cezar Augusto Vilela da Silva. -- Belo Horizonte: 2018.
82 f.: il.
Orientador (a): Marcelo Vidigal Caliani.
Coorientador (a): Maria Aparecida Gomes.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Entamoeba/patogenicidade. 2. Amebíase/etiologia. 3. Abscesso Hepático Amebiano. 4. Virulência. 5. Técnicas In Vitro. 6. Dissertação Acadêmica. I. Caliani, Marcelo Vidigal. II. Gomes, Maria Aparecida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 225

Fabiene Letizia Alves Furtado | Biblioteca CRB-8/2745



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DAS CEPAS MCR, ACFN, ICS, ADO E VEJ DE Entamoeba dispar

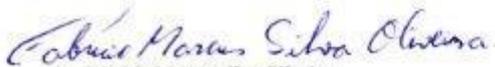
CÉZAR AUGUSTO VILELA DA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 20 de fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari - Orientador
UFMG


Prof(a). Maria Aparecida Gomes
UFMG


Dr. Fabricio Marcus Silva Oliveira
UFMG


Prof(a). Alvaro Cantini Nunes
UFMG

Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Deus, que me guiou em meio a tantos desafios.

A minha mãe, que em todos os momentos me encorajou nesta caminhada.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari, pela oportunidade e pelos diversos ensinamentos.

A Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes, pela co-orientação e ensinamentos, passados sempre de forma alegre e cativante.

Aos meus amigos Fabrício e Ruth, que se dispuseram sempre a me ajudar e tornaram os meus dias mais alegres, e a caminhada menos tortuosa.

Ao Joãozinho e Edna, por contribuir imensamente para o meu aprendizado técnico na área de amebíase.

A Isabela Maria, por toda a ajuda durante essa caminhada

A equipe do Laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG, em especial a Vânia, que me ensinou durante a graduação várias técnicas e acreditou no meu potencial.

A todos os professores do programa de pós-graduação em Patologia, pelo vasto conhecimento transmitido.

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri, que me inseriu no mundo da pesquisa.

As minhas amigas Lucélia e Izabela Gontijo, que desde a graduação sempre me deram apoio para a realização deste sonho, sendo exemplos de profissionalismo e principalmente de amizade.

A minha amiga Helena, que sempre me apoiou e me incentivou, além de aconselhar e de estar a qualquer momento disposta a me ajudar.

Ao meu amigo Ailton, que me acompanhou e me ajudou diversas vezes nos meus experimentos.

Ao Francisco, pelo apoio, paciência e todo carinho, estando sempre ao lado.

Aos meus colegas do Laboratório de Amebíase e Protozooses do ICB-UFMG, por toda ajuda.

Muito obrigado a todos!

RESUMO: A *Entamoeba histolytica* produz a amebíase, doença infecciosa que atinge o intestino humano, constituindo a 2^a maior causa de morte entre as doenças parasitárias. Considerada comensal, alguns autores têm reproduzido experimentalmente a colite e o abscesso hepático amebiano (AHA) utilizando *Entamoeba dispar* isolada de hospedeiros assintomáticos e sintomáticos. Das cepas de *E. dispar* disponíveis em nosso acervo, apenas a MCR foi estudada com maiores detalhes, tendo sido analisada a cinética das lesões hepáticas entre 12 horas e 8 dias após a infecção (DAI) e, mensurada as lesões. Ainda não foi avaliada a virulência das cepas de *E. dispar* de nosso acervo, através do ensaio de eritrofagocitose, muitas cepas ainda não foram testadas quanto à sua patogenicidade e é desconhecida a evolução do AHA após 12 DAI. Diante disso, foi objetivo deste estudo avaliar a virulência e a patogenicidade das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO E VEJ de *E. dispar* após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção. No ensaio *in vitro*, os trofozoítos interagiram com eritrócitos humanos, sendo então contadas as hemácias fagocitadas e os trofozoítos que fagocitaram. Quinze hamsters foram inoculados com 1×10^5 trofozoítos de cada cepa e, como controle, 1 hamster foi inoculado em cada grupo com a microbiota indígena. Cinco hamsters de cada grupo foram eutanasiados aos 3, 8, 12 e 16 DAI para necropsia, coleta do fígado e processamento para histopatologia e morfometria digital. Todas as cepas de *E. dispar* foram capazes de fagocitar eritrócitos, sem diferenças significativas entre elas, porém em quantidades inferiores em relação à *E. histolytica*. A cepa ACFN demonstrou ser patogênica no hamster, sendo capaz de produzir o AHA e, 100% de mortalidade em períodos superiores a 8 DAI. Já a MCR produziu 29% de mortalidade do 8^o ao 16^o DAI, enquanto as cepas ICS, VEJ e ADO não causaram mortalidade. O AHA foi observado em todos os grupos de hamsters, sendo mais frequente nos inoculados com as cepas ACFN e MCR. A ACFN produziu área de necrose significativamente superior à ADO no 8^o DAI, enquanto a necrose foi gerada somente pela MCR no 12^o DAI. A extensão da necrose estava associada ao intenso parasitismo (predominante no 8^o DAI) e geralmente ao infiltrado inflamatório granulocitário, histiocitário ou misto, focal e/ou difuso (predominante geralmente no 12^o DAI). No 12^o DAI foram observados os últimos abscessos em atividade e os primeiros em reparo. A inflamação crônica granulomatosa foi mais frequente no 8^o e 12^o DAI, variando entre os grupos. A trombose e a hemorragia foram mais frequentes nos hamsters inoculados com a ACFN, enquanto os fenômenos degenerativos, com a MCR. A maioria dos hamsters no 16^o DAI apresentou preservação da maior parte do parênquima hepático. A regeneração é o mecanismo de cura predominante na amebíase experimental produzida pela *E. dispar*. A cicatrização ocorre em pequenas áreas, a despeito das grandes extensões de tecido de granulação. Assim, com exceção da ACFN, todas as outras cepas foram capazes de produzir danos hepáticos autolimitantes.

ABSTRACT: *Entamoeba histolytica* produces amebiasis, an infectious disease that affects the human intestine, making it the second largest cause of death among parasitic diseases. Considered commensal, some authors have experimentally reproduced colitis and amebic liver abscess (AHA) using *Entamoeba dispar* isolated from asymptomatic and symptomatic hosts. Of the strains of *E. dispar* available in our collection, only MCR was studied in greater detail, analyzing the kinetics of hepatic lesions between 12 hours and 8 days after infection (DAI) and, measuring the lesions. Virulence of the strains of *E. dispar* from our collection has not yet been evaluated through the erythrophagocytose assay. Many strains have not yet been tested for their pathogenicity and the evolution of AHA after 12 DAI is unknown. The objective of this study was to evaluate the virulence and pathogenicity of *E. dispar* strains MCR, ACFN, ICS, ADO and VEJ after 3, 8, 12 and 16 days of infection. In the *in vitro* assay, the trophozoites interacted with human erythrocytes, and the phagocytosed erythrocytes and trophozoites that phagocytosed were counted. Fifteen hamsters were inoculated with 1×10^5 trophozoites from each strain and, as a control, 1 hamster was inoculated in each group with the native microbiota. Five hamsters from each group were euthanized at 3, 8, 12 and 16 DAI for necropsy, liver collection and processing for histopathology and digital morphometry. All strains of *E. dispar* were able to phagocyte erythrocytes, with no significant differences between them, but in lesser amounts in relation to *E. histolytica*. The ACFN strain proved to be pathogenic in the hamster, being able to produce AHA and 100% mortality in periods superior to 8 DAI. On the other hand, MCR produced 29% mortality from the 8th to the 16th DAI, whereas the ICS, VEJ and ADO strains did not cause mortality. AHA was observed in all groups of hamsters, being more frequent in the inoculated with the strains ACFN and MCR. The ACFN produced a necrosis area significantly higher than ADO in the 8th DAI, while necrosis was generated only by the MCR in the 12th DAI. The extent of necrosis was associated with intense parasitism (predominant in the 8th ICD) and usually to the granulocytic, histiocytic or mixed, focal and / or diffuse inflammatory infiltrate (predominantly in the 12th). At the 12th DAI, the last active abscesses were observed and the first ones under repair. Chronic granulomatous inflammation was more frequent in the 8th and 12th DAI, varying between groups. Thrombosis and hemorrhage were more frequent in hamsters inoculated with ACFN, while degenerative phenomena, with the MCR. Most hamsters in the 16th DAI presented preservation of most of the liver parenchyma. Regeneration is the predominant healing mechanism in the experimental amoebiasis produced by *E. dispar*. Healing occurs in small areas, despite large extensions of granulation tissue. Thus, with the exception of ACFN, all other strains were able to produce self-limiting liver damage.

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 – Epidemiologia	2
1.2 – Patogênese	3
1.3 – Fatores de virulência	5
1.3.1 – Lectina ligante de galactose e N-acetil-d-galactosamina	5
1.3.2 – Cisteína proteinases	6
1.3.3 – Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada	6
1.3.4 – Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptideoglicanos	6
1.3.5 – Amebaporos	7
1.4 – Fagocitose	7
1.5 – Imunidade	8
1.6 – Abscesso hepático amebiano	9
1.6.1 – O papel dos neutrófilos e dos fatores de virulência no desenvolvimento do AHA	10
1.6.2 – Histopatologia e cinética das lesões em modelo animal	11
1.6.3 – Experimentação animal utilizando <i>E. dispar</i>	11
2 – OBJETIVOS	14
2.1 – Objetivo geral	14
2.2 – Objetivos específicos	14
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 – Cepas de <i>Entamoeba dispar</i> e de <i>Entamoeba histolytica</i>	15
3.2 – Ensaio de eritrofagocitose	15
3.3 – Avaliação da patogenicidade	15

3.3.1 – Animais utilizados	15
3.3.2 – Preparo do inóculo	17
3.3.3 – Inoculação	18
3.3.4 – Necropsia, coleta do material e histopatologia	18
3.3.5 – Análise de mortalidade	18
3.3.6 – Análise morfométrica do abscesso hepático amebiano	18
3.4 – Análise estatística	19
4 – RESULTADOS	20
4.1 – Ensaio de eritrofagocitose	20
4.2 – Análise de mortalidade	20
4.3 – Análise macroscópica e histopatológica do fígado de hamsters infectados com as cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ	21
4.4 – Análise morfométrica do abscesso hepático amebiano	25
4.4.1 – 3° DAI	25
4.4.2 – 8° DAI	26
4.4.3 – 12° DAI	28
4.4.4 – 16° DAI	29
5 – DISCUSSÃO	31
6 – CONCLUSÕES	39
7 – REFERÊNCIAS	40
8 – ANEXOS	48
8.1 – Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG.	48
8.2 – Figuras	49

LISTA DE ABREVIACÕES

AHA – Abscesso hepático amebiano

APC's – Células apresentadoras de antígenos

COX-2 – Cicloxigenase 2

CP's – Cisteína proteinases

DAB – Diaminobenzidina

DAI – Dias após a infecção

EhCP1 – Cisteína proteinase 1 da *Entamoeba histolytica*

EhCP2 – Cisteína proteinase 2 da *Entamoeba histolytica*

EhCP5 – Cisteína proteinase 5 da *Entamoeba histolytica*

ERO – Espécies reativas de oxigênio

ELISA – *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

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

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IFN- γ – Interferon γ

IIP – Inoculação Intraportal

IL1- β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-9 – Interleucina 9

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23

IL-25 – Interleucina 25

MAP – Fosfatase ácida de membrana

MHC Classe II – Complexo de histocompatibilidade Classe II

NF- κ B – Fator Nuclear κ B

NK – *Natural Killer*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos

SAP – Fosfatase ácida secretada

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

VSG – *Variant surface glycoprotein*

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Número de trofozoítos das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> e, EGG de <i>E. histolytica</i> que realizaram eritrofagocitose e número de hemácias fagocitadas por trofozoítos	20
Gráfico 02: Área de necrose hepática produzida pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3º DAI	25
Gráfico 03: Área de focos inflamatórios produzidos pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3º DAI	26
Gráfico 04: Área de tecido de granulação produzido pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3º DAI	26
Gráfico 05: Área de necrose hepática produzida pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI	27
Gráfico 06: Área de focos inflamatórios produzidos pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI	27
Gráfico 07: Área de tecido de granulação produzido pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI	28
Gráfico 08: Área de necrose hepática produzida pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI	28
Gráfico 09: Área de focos inflamatórios produzidos pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI	29
Gráfico 10: Área de tecido de granulação produzido pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI	29
Gráfico 11: Área de focos inflamatórios produzidos pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI	30
Gráfico 12: Área de tecido de granulação produzido pela <i>E. dispar</i> das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Grupos experimentais	16
Tabela 02: Frequência de abscessos hepáticos amebianos nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção	24
Tabela 03: Frequência de parasitismo e lesões hepáticas nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção	24
Tabela 04: Frequência de lesões hepáticas e de fenômenos de reparo nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção	24
Tabela 05: Frequência de fenômenos de reparo nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Ensaio de eritrofagocitose.....	49
Figura 02: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i>	50
Figura 03: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i> da cepa ACFN e eutanasiado 8 dias após a infecção (DAI)	51
Figura 04: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i>	52
Figura 05: Fígado de hamsters inoculados com a <i>Entamoeba dispar</i> da cepa MCR e eutanasiados 12 dias após a infecção (DAI)	53
Figura 06: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i>	54
Figura 07: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i> e eutanasiados após 8 dias de infecção (DAI).....	55
Figura 08: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i> da cepa MCR e eutanasiados 12 dias após a infecção (DAI)	56
Figura 09: Fígado de hamster inoculado com a <i>Entamoeba dispar</i>	57

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A amebíase é causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*. É a doença mais grave provocada por protozoário que atinge o intestino humano e a segunda maior causa de morte entre as doenças parasitárias (Stanley, 2003). É caracterizada por duas principais síndromes clínicas, a colite e o abscesso hepático amebiano (Haque *et al.*, 2003). É uma importante doença por ser de ampla distribuição geográfica, alta incidência e ser capaz de desenvolver quadros graves, alguns destes fatais, e ainda permanecer como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (Huston, 2004).

Embora descrita há mais de 130 anos na Rússia por Lösch (1875, citado por Jackson, 1998), a *Entamoeba histolytica* foi formalmente reconhecida como espécie em 1903 por Schaudinn (1903, citado por Clark, 1998). Em 1925, Brumpt propôs uma teoria a fim de explicar a alta prevalência de casos assintomáticos, denominada teoria dualista, onde afirmava a existência de duas espécies de amebas morfológicamente idênticas, porém biologicamente distintas (1925, citado por Walsh, 1986). Foi considerado que apenas a *E. histolytica* seria capaz de penetrar nos tecidos e produzir a forma extra-intestinal. Posteriormente a espécie foi separada em dois grupos distintos: *E. histolytica* patogênica e não-patogênica, como evidenciado por Brumpt (Sargeant *et al.*, 1978).

A prevalência mundial de indivíduos assintomáticos, em torno de 90%, poderia ser explicada pela espécie não-patogênica (Walsh, 1986). Análises de DNA destes grupos evidenciaram a existência de duas espécies distintas e a nova espécie foi denominada *Entamoeba dispar*, como sugerido por Brumpt em 1925 (Diamond & Clark, 1993). A *E. dispar* foi reconhecida oficialmente em 1997 (OMS,1997), após várias análises do perfil de isoenzimas, das diferenças genéticas e da utilização de anticorpos monoclonais.

As formas clínicas abrangem amplo espectro: infecções sintomáticas devido a *E. histolytica* (amebíase intestinal ou extra-intestinal), infecções assintomáticas por *E. dispar*, infecções mistas assintomáticas causadas por *E. histolytica* e *E. dispar* e infecções assintomáticas provocadas pela *E. histolytica* (Ximénez *et al.*, 2010).

A infecção ocorre na maioria dos casos através da ingestão de água ou alimentos contendo cistos de *E. histolytica/E. dispar*. Ocasionalmente pode haver infecção através de sexo oral, anal e enema (Stanley, 2003).

Com a comprovação da existência da *E. dispar* em 1997 (OMS, 1997), iniciaram-se vários estudos comparando esta espécie de ameba com a *E. histolytica*. A *E. dispar* é morfológicamente similar a *E. histolytica* e é considerada uma espécie distinta baseada nos

padrões isoenzimáticos observados entre amebas isoladas de pacientes assintomáticos e naqueles com doença invasiva (Sargeant *et al.*, 1978). Ambas têm quase o mesmo conjunto de genes que codificam os principais fatores de virulência. Contudo, a *E. histolytica* secreta cerca de 10 a 1.000 vezes mais cisteína proteinases do que a *E. dispar* (Reed *et al.*, 1989); a atividade das amebaporos na *E. dispar* é cerca de um terço da que é observada na *E. histolytica* (Leippe, 1997); além disso, a lectina ligante de galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) da *E. dispar* possui homologia de dois membros da cadeia pesada e quatro da cadeia leve em relação à lectina da *E. histolytica* levando a redução na aderência e citotoxicidade *in vitro* (Dodson *et al.*, 1997).

E. histolytica não-patogênica (NP) era o termo usado para se referir à *E. dispar* antes de sua descrição como uma espécie distinta da *E. histolytica* (Diamond & Clark, 1993). Os estudos experimentais envolvendo a *E. histolytica* NP não conseguiram demonstrar sua capacidade em produzir lesões significativas em animais de laboratório. A *E. dispar* é considerada não invasiva e está relacionada às infecções assintomáticas, mas já foi isolada de paciente portadores de colite não disentérica (Chadee *et al.*, 1985; Vohra *et al.*, 1989). Os isolados de ameba destes pacientes foram analisados por PCR e na determinação do perfil de isoenzimas (hexoquinase, fosfoglicomutase, L-malato e glicose fosfato isomerase), confirmando a infecção por *E. dispar* (Diamond & Clark, 1993; Sargeant, 1987).

1.1 - Epidemiologia

A amebíase produz cerca de 50 milhões de casos por ano em todo o mundo e mata anualmente cerca de 100 mil pessoas (OMS, 1997). Estima-se que a *E. histolytica* e *E. dispar* infectem cerca de 12% da população mundial, sendo muito mais comum a infecção pela última, podendo a *E. histolytica* representar 1% deste universo (OMS, 1997). Em 2013 houve 1,3 milhões de óbitos por doenças diarréicas, onde se enquadra a amebíase (GBD, 2013). A prevalência da *E. dispar* não é conhecida. Especula-se que esta espécie seja responsável por grande maioria das infecções antes atribuídas à *E. histolytica*. Existem vários trabalhos que mostram uma alta prevalência da *E. histolytica/E. dispar* nos países em desenvolvimento (Evangeloupolos *et al.*, 2001; Guzmán *et al.*, 2001; Rivero *et al.*, 2009; Reyes & León, 2002; Ouattara *et al.*, 2010; Hegazi *et al.*, 2013; Rivera *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2005; Leiva *et al.*, 2006; Levecke *et al.*, 2011; Stauffer *et al.*, 2006.)

Em 1996, foram reportados no México 1,3 milhões de casos de amebíase intestinal, incluindo infecções pela *E. dispar*. No Vietnã, com população de 1 milhão de habitantes, um hospital

reportou 1.500 casos de abscesso hepático amebiano em 5 anos. Não se sabe o motivo da diferença da incidência de AHA entre populações, mas acredita-se que fatores hormonais e o uso de álcool influenciem (Stanley, 2003).

No Brasil a amebíase constitui importante causa de morbidade, cujas lesões são provocadas pela *E. histolytica* (Ferreira & Marçal, 1997, Santos *et al.*, 2005). Apesar de ser relacionada aos casos assintomáticos, a *E. dispar* é a mais prevalente no território brasileiro. Em Manaus, 93,2% das amostras positivas para cistos analisadas foram representadas pela *E. dispar*, enquanto apenas 6,8% foram positivas para *E. histolytica* (Benetton *et al.*, 2005). Estudo realizado com indivíduos residentes na região metropolitana de Belém identificou prevalência pela infecção de *E. dispar* (70,65%) em relação a *E. histolytica* (29,35%) (Silva *et al.*, 2005). Calegar *et al.* (2016) identificaram em Russas, município do Ceará, predomínio de cistos de *E. dispar* nas amostras analisadas (57,1%), seguido pela *E. histolytica* (23,8%) e de 14,3% de infecções mistas (*E. dispar* e *E. histolytica*). Nosso grupo tem encontrado em torno de 3% de infecções por *E. histolytica/E. dispar* em comunidades da grande Belo Horizonte (Gil *et al.*, 2013). Até o momento, temos verificado que 99% destas infecções foram provocadas pela *E. dispar* (dados não publicados).

1.2 - Patogênese

A infecção ocorre através da ingestão de cistos maduros, principalmente através de água e alimentos contaminados com fezes. A infecção e estabelecimento dos trofozoítos na mucosa intestinal dependem de um conjunto complexo de fatores, como o estado nutricional, fatores genéticos e bacterianos (Brandt & Tamayo, 1970). O excistamento ocorre no lúmen do intestino delgado e os trofozoítos chegam maduros no cólon, onde multiplicam-se e sobrevivem de maneira comensal, alimentando-se por meio da fagocitose de bactérias e restos celulares. Por vezes, os trofozoítos podem aderir ao epitélio intestinal por intermédio da lectina GAL/GALNAc, provocar a destruição das células epiteliais prismáticas, penetrar na mucosa e submucosa, induzindo necrose liquefativa e colite. Os trofozoítos podem deslocar-se lateralmente na submucosa, originando a clássica úlcera em forma de “frasco” ou “botão de camisa”. Eles podem ainda por via hematogênica atingir a circulação e migrar para outros órgãos, levando ao desenvolvimento da amebíase extra-intestinal, especialmente o abscesso hepático (Stanley, 2003). A penetração e deslocamento são dependentes dos fatores de virulência dos trofozoítos, como as cisteína proteinases e amebaporos (Leippe, 1995; Que & Reed, 1997). A invasão é seguida por um processo inflamatório agudo que recruta neutrófilos,

macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos, contribuindo para o dano tecidual por liberação excessiva de seus produtos tóxicos (Haque *et al.*, 2003). Além da capacidade do trofozoíto de eliminar células do hospedeiro, a resposta inflamatória decorrente da ação de neutrófilos e outras células inflamatórias também contribuem para o dano tecidual. O fator de necrose tumoral α (TNF- α) é secretado principalmente por macrófagos e o seu papel na amebíase é controverso: alguns autores consideram como protetor o papel desta citocina por aumentar a produção de óxido nítrico (NO) e contribuir com a eliminação dos trofozoítos. De fato, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ativação de neutrófilos e macrófagos por TNF- α e IFN- γ são capazes de eliminar os trofozoítos (Haque *et al.*, 2003). Outros autores relataram piora das lesões na colite amebiana induzida em ratos infectados com *E. histolytica* e associaram os elevados níveis de TNF- α com o aumento da lesão e maior chance de recorrência da diarreia (Peterson *et al.*, 2010). Zhang *et al.* (2003) observaram em ratos imunodeficientes e xenoenxertados com intestino humano que o TNF- α é responsável pelo recrutamento maciço de neutrófilos para o local da infecção, o que favoreceria a maior intensidade do dano na parede intestinal e diarreia. Além disso, o TNF- α também é capaz de atrair trofozoítos por quimiotaxia, favorecendo o processo de invasão do tecido e colite (Zhang *et al.*, 2003). Durante o início da amebíase invasiva nota-se um intenso infiltrado inflamatório, ao contrário do observado após o desenvolvimento das úlceras intestinais e dos AHA's, onde a presença de infiltrado é mínima, apesar do elevado grau de dano tecidual (Haque *et al.*, 2003).

Os trofozoítos também têm a capacidade de induzir a apoptose em células inflamatórias, ligando-se a elas através da lectina GAL/GALNAc e induzindo o influxo de cálcio, desfosforilação de tirosina e ativação da caspase 3. Assim, o processo de apoptose é iniciado, os trofozoítos reconhecem os corpos apoptóticos através da exposição da fosfatidilserina e os fagocitam (Ralston & Petri, 2011). Estudos demonstram que as caspases são necessárias para a morte de células *in vitro* e para a formação do AHA *in vivo* (Yan & Stanley, 2001; Huston *et al.*, 2000). Estudos recentes identificaram que os trofozoítos também podem sofrer apoptose. Até o momento nenhuma caspase foi identificada no processo, mas sugere-se que proteases dependentes de cálcio presentes no seu citoplasma podem estar envolvidas neste processo de morte celular (Villalba-Magdaleno *et al.*, 2011; Monroy *et al.*, 2015).

1.3 – Fatores de virulência

Os produtos amebianos relacionados com a virulência da ameba incluem moléculas de superfície, tais como Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptideoglicanos (Moody *et al.*, 1997; Lauwaet *et al.*, 2004) e a lectina ligante de GAL/GALNAc (Haque *et al.*, 2003; Stanley, 2003), proteínas geradoras de poros denominadas de amebaporos (Leippe, 1995), cisteína proteinases (Que & Redd, 1997) e fosfatases (Aguirre-Garcia, 2003). Tais fatores de virulência favorecem a sobrevivência da ameba em seu hospedeiro e são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões.

1.3.1 – Lectina ligante de galactose e N-acetil-D-galactosamina (GAL/GALNAc)

Os trofozoítos utilizam lectinas ligantes de galactose e N-acetil-D-galactosamina (GAL/GALNAc) para se ligar às células intestinais através de oligossacarídeos de membrana e assim colonizar o intestino grosso. Células de mamíferos sem a presença de resíduos terminais de N-galactose ou N-acetilgalactosamina são resistentes à aderência e efeito citopático dos trofozoítos, sendo então o contato célula-célula essencial para o processo de invasão e destruição tecidual (Espinosa-Cantellano *et al.*, 1998). A lectina é um complexo composto por uma subunidade leve de 31-35KDa (Lgl) e uma subunidade pesada de 170KDa (HgL), ligadas por pontes dissulfeto, associadas a uma proteína de 150KDa (Igl). A GAL/GALNAc possui homologia com a molécula CD59, um antígeno leucocitário que impede a formação do complexo de ataque à membrana C5b-C9 do complemento. Desta forma, o trofozoíto inibe a ativação deste complexo (Haque *et al.*, 2003; Stanley, 2003). Recentemente foi elucidado que a subunidade IgI dessa lectina possui atividade hemolítica e está presente tanto na *E. histolytica* quanto na *E. dispar*, sendo menos expresso na *E. dispar* (Kato *et al.*, 2017). Apesar da atividade protetora contra a ação do complemento, verificamos que alguns trofozoítos de *E. histolytica* e de *E. dispar* podem ser destruídos através deste mecanismo imune (Costa *et al.*, 2010). Além disso, restos de trofozoítos de *E. dispar* mostraram maior expressão de C9 e C3 do que os de *E. histolytica*, mostrando que esta última ameba se mostrou mais resistente à ação do complemento. Tais achados são corroborados pela observação de que 27% e 60% dos trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica*, respectivamente, expressam a lectina ligante de GAL/GALNAc (Pacheco *et al.*, 2009).

1.3.2 - Cisteína proteinases

As cisteína proteinases (CPs) possuem um papel importante na infecção: degradam mucoproteína 2 (MUC 2), que funciona como barreira mecânica intestinal e assim favorecem a penetração dos trofozoítos na mucosa; degradam proteínas do sistema imune do hospedeiro, como as anafilotoxinas C3a e C5a, o que provoca redução de atividade inflamatória e, também digerem colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, favorecendo a mobilidade do parasito na matriz extracelular. Tais proteínas são alvos potenciais atraentes para o tratamento da amebíase porque são essenciais para a patogênese (Que & Reed, 1997; Reed & Gigli, 1990). Embora mais de 90% da atividade das CPs sejam representadas pelas EhCP1, EhCP2 e EhCP5, a degradação de mucina parece ser predominantemente provocada pela EhCP5, uma vez que sua inibição reduz intensamente a atividade proteolítica da enzima. Além disso, trofozoítos deficientes de EhCP5 são incapazes de superar a barreira de muco em cultura de células (Cornik & Chadee, 2017). Um estudo demonstrou que a EhCP5 não é expressa pela *E. dispar*, contribuindo para a interpretação de que tal espécie é não-patogênica (Que & Reed, 1997). Contudo, recentemente nosso grupo conseguiu demonstrar a expressão positiva de EhCP5 nas cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* (dados não publicados).

1.3.3 – Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada

Foram identificadas em diferentes cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* enzimas com ação PTPase, sendo elas a Fosfatase ácida de membrana (MAP) e a Fosfatase ácida secretada (SAP). A MAP é encontrada em ambas as espécies, enquanto a SAP somente na *E. histolytica*. Estas PTPases possuem alta especificidade em desfosforilar tirosina, mas também são hábeis para serina, ATP e treonina, na sua ordem. Tal processo provoca a dissociação dos microfilamentos de actina, impossibilitando células do sistema imune (principalmente macrófagos) de emitir pseudópodes para realizar fagocitose, contribuindo para a resistência do parasita. (Aguirre-Garcia, 2003).

1.3.4 – Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptídeoglicanos

Os lipofosfoglicanos (LPG) e lipofosfopeptídeoglicanos (LPPG) são proteofosfoglicanos, peptídeos ancorados via glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estão presentes na superfície dos trofozoítos e acredita-se que essas moléculas colaborem para a citotoxicidade amebiana, além de impedir a ativação do complemento. Estudos revelaram diferenças na composição estrutural dessas moléculas entre cepas de *E. histolytica* patogênicas e não-patogênicas e,

cepas de *E. dispar*, mostrando que a mesma molécula tem quantidades de aminoácidos diferentes entre as amebas analisadas (Moody *et al.*, 1996). As LPPGs estão presentes em ambas as espécies, enquanto as LPGs somente na *E. histolytica*. Estudos de como esses proteofosfolípidos se ligam aos enterócitos ainda necessitam ser realizados, mas sabe-se que eles possuem ação semelhante ao antígeno VSG (*Variant surface glycoprotein*) do *Trypanosoma brucei*, inserindo-se na membrana via GPI (Moody *et al.*, 1996; Lauwaet *et al.*, 2003). Lauwaet *et al.* (2003) identificaram diferença na capacidade de ligação da *E. histolytica* e *E. dispar* às células epiteliais via LPG e LPPG. A *E. dispar* não se ligou às células epiteliais por não conseguir ultrapassar a barreira de muco.

1.3.5 – Amebaporos

Os amebaporos são um conjunto de proteínas formadoras de poros de 5kD que não necessitam de receptor para se inserirem à membrana citoplasmática. Compreendem três isoformas, A, B, e C, sendo a primeira em maior proporção e atividade. Tais peptídeos amebianos são semelhantes estrutural e funcionalmente a um polipeptídeo produzido por células natural killer (NK) e linfócitos T citotóxicos, chamado NK-lisina (Leippe, 1995), sendo responsável pela formação de poros na membrana citoplasmática da célula alvo, levando à tumefação e morte celular. Esta atividade foi detectada tanto em células hospedeiras quanto em bactérias. Os amebaporos mostraram-se eficazes em provocar citólise de células do hospedeiro, exceto hemácias, devido provavelmente à ausência de moléculas carregadas negativamente na monocamada lipídica externa dos eritrócitos (Leippe *et al.*, 1994). A função básica dos amebaporos é destruir as bactérias fagocitadas para fins nutritivos e para combater o crescimento intracelular destas bactérias (Leippe, 1997). A *E. dispar* também é capaz de produzir as três isoformas de amebaporos. Nickel *et al.* (1999) identificaram em cepas de *E. dispar* e *E. histolytica*, similaridade de aminoácidos na mesma posição em todos os peptídeos analisados, entretanto a atividade dos amebaporos da *E. histolytica* foi 25 vezes maior a da *E. dispar*.

1.4– Fagocitose

Os trofozoítos possuem a capacidade de fagocitar partículas e células, tais como eritrócitos. Este processo foi descrito há mais de 100 anos por LÖSH (1875) e é utilizado como forma de avaliação da virulência e caracterização de cepas “patogênicas” e “não patogênicas” (Orozco *et al.*, 1983). Dentre as alterações bioquímicas que acompanham o processo estão o aumento

do consumo de oxigênio e glicose e, a produção do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), caracterizando a explosão respiratória (Talámas-Lara *et al.*, 2014). A menor capacidade de realizar eritrofagocitose está associada a uma menor virulência (Orozco *et al.*, 1983). Embora também tenha a capacidade de fagocitar eritrócitos humanos, comparando com a *E. histolytica*, a *E. dispar* possui menor capacidade de adesão, citólise e fagocitose de hemácias. A menor adesão é devida à reduzida capacidade do trofozoíto de provocar a externalização da molécula de fosfatidilserina dos eritrócitos, que é reconhecida pela ameba (Boettner *et al.*, 2005). Talámas-Lara e colaboradores (2014) realizaram um estudo comparativo sobre a eritrofagocitose praticada pela *E. dispar* e *E. histolytica*, verificando que a *E. dispar* possuía uma população maior de trofozoítos não-fagocíticos e aqueles que realizaram a fagocitose continham menos hemácias em seu interior. As CP's estão relacionadas ao processo de fagocitose. Ankri e colaboradores (1998) verificaram em cepas de *E. histolytica* que a diminuição da expressão de CP's é capaz de inibir a eritrofagocitose, sem contudo afetar o efeito citopático sobre células renais cultivadas e sobre a atividade hemolítica.

1.5 – Imunidade

A primeira linha de defesa do hospedeiro contra a infecção amebiana é o muco colônico, que impede o contato dos trofozoítos com o epitélio. Após o reconhecimento da lectina GAL/GALNAc, o hospedeiro passa a produzir níveis elevados de IgA, representando cerca de 90% do total de anticorpos específicos, que são responsáveis por inibir a aderência dos trofozoítos às células epiteliais. A presença de anticorpos e a camada de muco podem permitir a eliminação do patógeno, auxiliada pelo peristaltismo (Haque *et al.*, 2003; Carrero *et al.*, 2007). Após a penetração na mucosa intestinal os trofozoítos induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias: IL-1-β, IL-23, IL-25, IL-17 e TNFα. A IL-25 induz a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13), o que promove eosinofilia e colabora na proteção do epitélio contra a invasão dos trofozoítos (Noor *et al.*, 2017). Ocorre ainda, a ativação da via alternativa do sistema complemento, resultando na clivagem de C3 em C3a e C3b. A anafilotoxina C3a pode ser degradada pelas CP's dos trofozoítos, ao passo que o peptídeo C3 inicia a cascata que resulta no complexo de ataque a membrana (C5b9) (Reed & Gigli, 1990). Calderon & Schreiber (1985) utilizando da cepa HM1 de *E. histolytica* observaram que os trofozoítos também podem ativar a via clássica do complemento mesmo na ausência de anticorpos, contudo a resposta predominante parece ser a promovida pela via alternativa, devido aos altos níveis de C3 em relação aos de C1, C4 e C2.

A grande maioria dos trabalhos para elucidar a resposta imune do hospedeiro na amebíase invasiva é realizada em hamsters, através da indução experimental do abscesso hepático amebiano (AHA). Estes hospedeiros desenvolvem uma resposta do tipo Th1, cursando com a produção de altos níveis de IL-12, IL2 e IFN- γ . Esta resposta é resultado da apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos por APC's para os linfonodos satélites próximo ao local de penetração dos trofozoítos. À medida que ocorre cronificação da infecção, a resposta é repolarizada para o tipo Th2, predominando altos níveis de IL-10. Este processo reduz significativamente a fibrose portal, a fim de tornar menos intenso o dano tecidual (Carrero *et al.*, 2007).

1.6 – Abscesso hepático amebiano

É uma das formas extra-intestinais mais frequentes da amebíase e é provocada pela migração dos trofozoítos para o parênquima hepático. Os mecanismos pelos quais as amebas invadem outros órgãos ainda não estão bem compreendidos. Não somente fatores relacionados ao parasito estão envolvidos, mas também ao hospedeiro, como a genética e o gênero. Estudos realizados identificaram que certos indivíduos possuem um alelo de MHC Classe II que protege contra a amebíase invasiva (DQB1*0601), alterando a apresentação de antígeno para as células TCD4+ (Duggal *et al.*, 2004). Indivíduos do sexo masculino são de 5 a 6 vezes mais predispostos a desenvolver o AHA do que os do sexo feminino (Lotter *et al.*, 2006). A gonadectomia em hamsters reduziu a indução do AHA em 50% e 15%, respectivamente em machos e fêmeas e, foi acompanhada de redução do infiltrado inflamatório. Foi observado que os hamsters gonadectomizados repolarizaram a resposta imune de Th1 para Th2 e Th3, sugerindo que a proteção contra o AHA se daria pela regulação negativa da resposta Th1 hepática durante a infecção amebiana (Cervantes-Resolledo *et al.*, 2009). Os autores também observaram nestes animais, redução da expressão de citocinas Th1 e Th2, com exceção da IL-4, e aumento da expressão de IL-10 e TGF- β .

Os neutrófilos desempenham um papel fundamental na infecção por este protozoário, determinando resistência ou susceptibilidade à invasão amebiana, respectivamente devido a uma adequada ou inadequada ativação deste tipo de granulócito (Campos-Rodríguez *et al.*, 2016). A inflamação gerada pela invasão dos trofozoítos provoca vasodilatação, hipóxia e isquemia. As moléculas LPG e LPPG funcionam como PAMPS, sendo reconhecidas pelos TLR-2 e TLR-4, que ativam os neutrófilos. Essa ativação resulta numa explosão respiratória, aumentando a produção de superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido

nítrico, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Estes compostos são capazes de lisar a membrana dos trofozoítos e provocar a sua morte. Entretanto, estudos demonstram que os neutrófilos podem exercer sua função imunitária mesmo na deficiência da explosão respiratória, concluindo que eles podem ser apenas ativadores das proteínas de seus grânulos ou outras moléculas efetoras. Fatores como a capacidade dos trofozoítos de resistir à ação do complemento e ataques oxidativos favorecem a sobrevivência no microambiente hepático, ao passo que os fatores de virulência permitem que eles façam fagocitose, desencadeiem a morte celular e se locomovam no parênquima do órgão (Santi-Rocca, 2009).

Apesar de comensal, a *E. dispar* já foi isolada de abscessos hepáticos e para explicar a sua presença foram sugeridas as seguintes hipóteses: trofozoítos de *E. histolytica* invadem a mucosa intestinal possibilitando a invasão também pela *E. dispar*, que se aproveita da virulência da outra espécie para atingir a circulação portal e migrar para o fígado; algumas cepas de *E. dispar* também seriam patogênicas e poderiam invadir a mucosa; a patogenicidade da *E. dispar* seria resultado do seu sinergismo com bactérias específicas da microbiota indígena de certos hospedeiros ou da recombinação entre as duas espécies (Ximénez *et. al.*, 2010).

1.6.1 – O papel dos fatores de virulência e dos neutrófilos no desenvolvimento do AHA

Após a migração para o parênquima hepático através da veia porta, os trofozoítos evadem do sistema imune e secretam seus fatores de virulência tais como amebaporos, CP's, LPG, LPPG, MAP e SAP no fígado. Estes por sua vez possuem efeito citopático e provocam a destruição de hepatócitos, sendo eventos focais e de menor intensidade. De acordo com alguns autores, os principais responsáveis pela progressão do AHA em sua fase tardia não estariam relacionados aos fatores de virulência das amebas, mas sim da ação dos produtos secretados por neutrófilos ou liberados após sua morte pelos trofozoítos (Campos-Rodríguez *et al.*, 2016).

Contudo, camundongos tratados previamente com anticorpos monoclonais anti-neutrófilos e inoculados com *E. histolytica* desenvolveram AHA do mesmo tamanho que aqueles que não receberam o tratamento para destruir os neutrófilos (Velazquez *et al.*, 1998). Também em nossos experimentos, verificamos que os produtos dos trofozoítos é que são os principais responsáveis pelo desenvolvimento do AHA, seja destruindo diretamente o parênquima hepático ou as células inflamatórias, que liberam enzimas de seus lisossomas rompidos. O tratamento prévio de camundongos com duas doses de 0,5 mg/Kg de dexametasona e

posterior inoculação dos trofozoítos não reduziu significativamente a área do AHA, apesar da diminuição significativa dos neutrófilos e macrófagos (Costa *et al.*, 2011). Nesse sentido, ainda não estão devidamente esclarecidos tanto os mecanismos pelos quais o abscesso ocorre, quanto a importância de cada um.

1.6.2 – Histopatologia e cinética das lesões em modelo animal

Vários modelos experimentais já foram propostos para estudar o AHA e o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) foi o modelo que mais se aproximou em suas características estruturais dos casos humanos. O AHA é representado por uma necrose de liquefação, com presença de inúmeros trofozoítos na borda da lesão, debris celulares e células inflamatórias que o delimitam no parênquima hepático. Estudos realizados em hamsters verificaram que após 30 minutos de inoculação intraportal (IIP) de trofozoítos eles já são encontrados no lúmen de pequenos ramos da veia porta e de veias centrolobulares, ao passo que 60 minutos após eles já se encontram aleatoriamente nos sinusóides dos lobos hepáticos (Tsutsumi *et al.*, 1984). Três horas após IIP de trofozoítos há migração de neutrófilos, eosinófilos, monócitos e alguns linfócitos, resultando na formação de focos inflamatórios, a maioria sem a presença de trofozoítos. Tal fato se deve a eliminação do parasito pelo sistema imune. Os trofozoítos resistentes à resposta imune se dividem e os focos inflamatórios vão aumentando e coalescem. A partir daí a ação dos trofozoítos e da inflamação forma o abscesso hepático. A necrose se forma cerca de 24 horas após a infecção, tornando-se mais evidente às 48 horas (Costa *et al.*, 2010; Santi-Rocca, 2009; Rigotherier *et al.*, 2002). Os granulomas amebianos podem começar a se formar no 2º DAI e tornam-se bem evidentes nos 6º e 8º DAI (Costa *et al.*, 2010).

1.6.3 – Experimentação animal utilizando *E. dispar*

Os primeiros estudos experimentais envolvendo a *E. histolytica* não-patogênica (*E. dispar*) não obtiveram sucesso em reproduzir as lesões amebianas (Chadee, 1985; Vohra, 1989; Espinosa-Cantellano, 1997). Após o reconhecimento da *E. dispar* como uma espécie distinta da *E. histolytica* (Clark, 1998), as pesquisas continuaram demonstrando sua incapacidade de produzir lesões experimentais. Estudos utilizando inóculos de 5×10^5 e 5×10^6 trofozoítos de *E. dispar* em hamsters pela via intra-hepática evidenciaram que após sete dias de infecção havia apenas infiltrado inflamatório focal, sem a formação de necrose e granulomas (Espinosa-Cantellano *et al.*, 1997). Estes achados, aliado às observações “*in vitro*” de que a *E. dispar* secreta produtos tóxicos em menor quantidade e atividade do que a *E. histolytica* reforçaram a

ideia de que a *E. dispar* seria apenas comensal, incapaz de gerar lesões humanas e experimentais. De fato, a cepa axênica SAW 760 de *E. dispar* produziu efeito citopático mais lento sobre células epiteliais MDCK quando comparado com a *E. histolytica* (Cantellano *et al.*, 1998).

Nosso grupo isolou no Brasil, cepas de *E. dispar* de casos sintomáticos e assintomáticos, que cresciam em cultivo xênico, utilizando a microbiota indígena do paciente onde foi isolada a cepa (Martinez *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1997). As cepas isoladas destes casos foram capazes de infectar animais de experimentação e de produzir lesões. A partir de 2000 começaram a ser publicados alguns estudos destas cepas que demonstraram resultados diferentes do observado nos estudos prévios. Tais cepas foram inoculadas em hamsters e ratos, respectivamente no fígado e no ceco. Foram encontradas lesões hepáticas e intestinais semelhantes às produzidas pela *E. histolytica* em todos os modelos utilizados, bem como a presença de trofozoítos (Costa *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2000; Furst *et al.*, 2002). A inoculação da microbiota indígena de cada cepa em hamsters e ratos controles não foi capaz de produzir lesões ou produziu apenas discretas lesões purulentas, evidenciando que foi realmente a inoculação dos trofozoítos de *E. dispar* a responsável pelo desenvolvimento da necrose liquefativa (Gomes *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2010). A utilização de cepa axênica (Cantellano *et al.*, 1997) e monoxênica (Costa *et al.*, 2000; Furst *et al.*, 2002) de *E. dispar* falhou na produção do abscesso amebiano, o que reforça a importância da associação bacteriana para a aquisição de patogenicidade.

Para aprofundar o conhecimento acerca da *E. dispar*, nosso grupo selecionou uma das cepas analisadas por Gomes *et al.* (2000). Foi utilizada a cepa MCR de *E. dispar*, isolada em 1988 de paciente assintomático e com sorologia (ELISA) negativa para *E. histolytica*, no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG e confirmada por zimodema e PCR. A utilização da morfometria digital foi capaz de demonstrar que o abscesso hepático produzido pela cepa MCR de *E. dispar* é tão importante e significativo quanto o produzido pela cepa EGG de *E. histolytica* (Costa *et al.*, 2007). A cinética do abscesso hepático amebiano induzido por esta cepa foi estudada ao longo de 8 dias de infecção, sendo possível descrever alterações tais como as diferentes fases da formação de granulomas epitelióides, trombose, apoptose e fibrose (Costa *et al.*, 2010). A aquisição da patogenicidade de cepas de *E. dispar* estaria ligado à interação com a microbiota indígena de onde foi isolada. As lesões experimentais obtidas pela espécie foram somente em cepas xênicas, que associam os trofozoítos com a bactéria, sugerindo que as bactérias causam lesões iniciais que

favorecem a proliferação e invasão do tecido pelos trofozoítos e/ou aumentam a expressão de fatores de virulência e/ou provocam mudanças genótípicas. Esta simbiose pode alterar propriedades de virulência dos trofozoítos e provocar mudanças fenotípicas (Oliveira *et al.*, 2015).

Foram feitas análises genéticas em indivíduos com infecção assintomática ou com doença invasiva e os resultados mostraram elevado polimorfismo entre as espécies *E. histolytica* e *E. dispar* (Gosh *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2005; Ximénez *et al.*, 2010). Ali e colaboradores (2008) evidenciaram esta diversidade genética através da observação de diferenças nos genótipos da *E. histolytica* isolada de amostras de fezes e de abscesso hepático amebiano obtidas a partir de um mesmo paciente. Outros estudos também detectaram diferentes genótipos de trofozoítos de *E. histolytica* isolados a partir de dois AHAs diferentes de um mesmo paciente (Valenzuela *et al.*, 2009). As cepas de *E. dispar* também podem apresentar diferentes comportamentos biológicos devido ao seu polimorfismo genético (Gomes *et al.*, 2000).

Conforme pôde ser observado na revisão bibliográfica, o Laboratório de Amebíases do ICB/UFMG isolou cepas de *E. dispar* oriundas de paciente sintomáticos e assintomáticos, algumas delas já inoculadas em animais de experimentação, onde foi verificado serem capazes de produzir lesões semelhantes às causadas pela *E. histolytica*. Até o presente momento, das cepas de *E. dispar* disponíveis em nosso acervo, apenas a MCR foi estudada com maiores detalhes a respeito de alguns aspectos imunológicos e patológicos, tais como a cinética do processo inflamatório amebiano desenvolvida entre 12 horas e 8 dias após a infecção experimental, bem como a realização de morfometria das lesões. Além disso, ainda não foi avaliada a virulência destas cepas através do ensaio de eritrofagocitose e, algumas delas ainda não foram testadas quanto à sua patogenicidade. Também são desconhecidos os aspectos morfológicos relativos à evolução do abscesso hepático amebiano induzido pela *E. dispar*, com mais de 8 dias de infecção.

2 – OBJETIVOS

2.1 – Geral

Avaliar a virulência e a patogenicidade das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*.

2.2 – Específicos

2.2.1 – Avaliar a virulência *in vitro* das cepas de *E. dispar*, através do ensaio de eritrofagocitose.

2.2.2 – Em hamsters experimentalmente infectados, avaliar em diferentes períodos de infecção:

- O índice de mortalidade dos hamsters;
- A evolução das lesões hepáticas produzidas pela *E. dispar* através de análise histopatológica;
- Comparar a patogenicidade e o parasitismo no abscesso hepático induzido pelas diferentes cepas.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Cepas de *Entamoeba dispar* e de *Entamoeba histolytica*

Foram utilizadas 5 cepas de *E. dispar* e 1 de *E. histolytica* ambas isoladas no Laboratório de Amebíases do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG sendo elas: MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar* e, EGG de *E. histolytica*. A identificação das espécies foi confirmada através da análise do zimodema e PCR (Gomes *et al.*, 2000). As cepas MCR e ACFN foram isoladas de pacientes assintomáticos e, as cepas ICS, VEJ e ADO, de pacientes portadores de colite não disentérica. Com exceção da cepa ICS, que foi isolada na Colômbia, as demais têm origem brasileira, tendo sido isoladas nos municípios de Belo Horizonte-MG (VEJ e ACFN), Manaus-AM (MCR), Itacarambi (Comunidade indígena Xacriabá)-MG (ADO). A cepa EGG foi isolada de paciente portador de colite disentérica e AHA em Manaus-AM. Todas as cepas são xênicas, ou seja, estão associadas com a microbiota indígena do indivíduo as quais foram isoladas.

3.2 – Ensaio de eritrofagocitose

Em todas as 5 cepas de *E. dispar* e na de *E. histolytica* foi realizado o ensaio de eritrofagocitose *in vitro*, segundo adaptação do método de Trissl *et al.* (1978). Os trofozoítos foram ajustados a uma concentração de 1×10^6 /mL em PBS; 0,4 mL desta suspensão foi interagida com o mesmo volume de uma suspensão de 1×10^8 /mL de eritrócitos tipo A (Diacell ABO A1ccdde, Biorad). A taxa de ameba e eritrócitos foi de 1:100 e o tempo de interação de 40 minutos a 37°C, adaptado dos experimentos de Gomes *et al.* (1997).

Os resultados foram expressos como o percentual de amebas que fagocitaram eritrócitos e o número de eritrócitos fagocitados por ameba na contagem de 100 amebas por lâmina.

3.3 – Avaliação da patogenicidade

3.3.1 – Animais utilizados

Foram utilizados 5 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos, com idade entre 25-30 dias, para cada cepa e período de infecção (3, 8, 12 e 16 dias). Um hamster foi usado para inóculo da microbiota indígena do hospedeiro de quem foi isolada a cepa. Considerando, a grande mortalidade observada nas cepas mais virulentas, foi necessário um número maior de animais para concluirmos os tempos de eutanásia após a infecção. Assim, 98 hamsters foram divididos nos seguintes grupos:

Tabela 1: Grupos experimentais.

Grupo	Descrição do grupo	Número de hamsters
Microbiota-MCR 3DAI	Inoculação com MAC MCR. Eutanásia: 3 DAI	1
Microbiota-MCR 8DAI	Inoculação com MAC MCR. Eutanásia: 8 DAI	1
Microbiota-MCR 12DAI	Inoculação com MAC MCR. Eutanásia: 12 DAI	1
Microbiota-MCR 16DAI	Inoculação com MAC MCR. Eutanásia: 16 DAI	1
Microbiota-ACFN 3DAI	Inoculação com MAC ACFN. Eutanásia: 3 DAI	1
Microbiota-ACFN 8DAI	Inoculação com MAC ACFN. Eutanásia: 8 DAI	1
Microbiota-ACFN 12DAI	Inoculação com MAC ACFN. Eutanásia: 12 DAI	1
Microbiota-ACFN 16DAI	Inoculação com MAC ACFN. Eutanásia: 16 DAI	1
Microbiota-ICS 3DAI	Inoculação com MAC ICS. Eutanásia: 3 DAI	1
Microbiota-ICS 8DAI	Inoculação com MAC ICS. Eutanásia: 8 DAI	1
Microbiota-ICS 12DAI	Inoculação com MAC ICS. Eutanásia: 12 DAI	1
Microbiota-ICS 16DAI	Inoculação com MAC ICS. Eutanásia: 16 DAI	1
Microbiota-ADO 3DAI	Inoculação com MAC ADO. Eutanásia: 3 DAI	1
Microbiota-ADO 8DAI	Inoculação com MAC ADO. Eutanásia: 8 DAI	1
Microbiota-ADO 12DAI	Inoculação com MAC ADO. Eutanásia: 12 DAI	1
Microbiota-ADO 16DAI	Inoculação com MAC ADO. Eutanásia: 16 DAI	1
Microbiota-VEJ 3DAI	Inoculação com MAC VEJ. Eutanásia: 3 DAI	1
Microbiota-VEJ 8DAI	Inoculação com MAC VEJ. Eutanásia: 8 DAI	1
Microbiota-VEJ 12DAI	Inoculação com MAC VEJ. Eutanásia: 12 DAI	1
Microbiota-VEJ 16DAI	Inoculação com MAC VEJ. Eutanásia: 16 DAI	1
MCR-3DAI	Inoculação com cepa MCR. Eutanásia: 3 DAI	5
MCR-8DAI	Inoculação com cepa MCR. Eutanásia: 8 DAI	7
MCR-12DAI	Inoculação com cepa MCR. Eutanásia: 12 DAI	7
MCR-16DAI	Inoculação com cepa MCR. Eutanásia: 16 DAI	7
ACFN-3DAI	Inoculação com cepa ACFN. Eutanásia: 3 DAI	5
ACFN-8DAI	Inoculação com cepa ACFN. Eutanásia: 8 DAI	5
ACFN-12DAI	Inoculação com cepa ACFN. Eutanásia: 12 DAI	7
ACFN-16DAI	Inoculação com cepa ACFN. Eutanásia: 16 DAI	5
ICS-3DAI	Inoculação com cepa ICS. Eutanásia: 3 DAI	5
ICS-8DAI	Inoculação com cepa ICS. Eutanásia: 6 DAI	5
ICS-12DAI	Inoculação com cepa ICS. Eutanásia: 12 DAI	5
ICS-16DAI	Inoculação com cepa ICS. Eutanásia: 16 DAI	5
ADO-3DAI	Inoculação com cepa ADO. Eutanásia: 3 DAI	5
ADO-8DAI	Inoculação com cepa ADO. Eutanásia: 6 DAI	5
ADO-12DAI	Inoculação com cepa ADO. Eutanásia: 12 DAI	5
ADO-16DAI	Inoculação com cepa ADO. Eutanásia: 16 DAI	5

VEJ-3DAI	Inoculação com cepa VEJ. Eutanásia: 3 DAI	5
VEJ-8DAI	Inoculação com cepa VEJ. Eutanásia: 6 DAI	5
VEJ-12DAI	Inoculação com cepa VEJ. Eutanásia: 12 DAI	5
VEJ-16DAI	Inoculação com cepa VEJ. Eutanásia: 16 DAI	5

DAI: dias após a infecção;

MAC: microbiota associada à cepa.

Os hamsters foram obtidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, com idade aproximada de 30 dias. Os hamsters foram alojados no biotério do departamento de Parasitologia/ICB/UFMG e foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura ambiente de 23°C e exposição a luz durante 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*. A manutenção dos hamsters e todos os procedimentos experimentais foram conduzidos e aprovados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 247/2016).

3.3.2 – Preparo do inóculo

Os trofozoítos de cada cepa foram previamente criopreservados em nitrogênio líquido pela técnica de abaixamento gradual a 1°C por minuto, usando DMSO a 1% como crioprotetor, e armazenados no Laboratório de Amebíases do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. Para o cultivo as cepas foram descongeladas em banho-maria à 37°C, por aproximadamente cinco minutos, colocadas em tubos com meio PAVLOVA (Silva, 1972) modificado e introduzidas em estufa à 37° C. Sua viabilidade foi analisada ao microscópio óptico sempre que realizado o repique, ou seja, a cada 48h. Quando as amebas alcançaram um crescimento próximo do ideal, foram transferidas para garrafas de cultura e novamente introduzidas em estufa até atingirem o crescimento máximo (Em média 800.000 trofozoítos/garrafa).

As garrafas foram colocadas em banho de gelo para as amebas destacarem-se da superfície do vidro, em seguida foi desprezado o sobrenadante, acrescentado PBS, centrifugado por cinco minutos e novamente desprezado o sobrenadante. 10µl do meio rico em amebas foram colocados na câmara de Neubauer onde os trofozoítos foram contados. A suspensão foi diluída com salina até atingir o inóculo de 1×10^5 trofozoítos/0.1mL.

3.3.3 – Inoculação

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina 2% (10 mg/Kg) e ketamina 5% (150mg/Kg) e foi feita uma incisão abdominal de aproximadamente 2 cm para visualização do fígado. Cinco hamsters de cada grupo foram inoculados diretamente no lobo esquerdo do órgão com 1×10^5 trofozoítos de *E. dispar* e para cada tempo foi inoculado um animal apenas com microbiota, como controle.

3.3.4 – Necropsia, coleta do material e histopatologia

Os animais foram eutanasiados aos 3, 8, 12 e 16 dias após a infecção (DAI) através de sangria sob anestesia geral (solução de xilazina 2% - 10 mg/Kg e ketamina 5% - 150mg/Kg) e o fígado foi removido *in totum*. Foram feitas três fatias transversais sequenciais de aproximadamente 2mm, sempre do ápice em direção a base do lobo hepático e fixadas em formol tamponado 10% pH 7,2. Após o período de fixação, as três fatias foram desidratadas, diafanizadas, infiltradas e incluídas em parafina, sendo obtidos cortes com 4 μ m de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histopatológica. As lesões foram descritas quanto ao seu tipo, frequência e quanto à presença de parasitos. Os AHA foram classificados como “Em atividade”, quando constituídos predominantemente por necrose e, “Em reparo”, quando ocupados por grande quantidade de tecido de granulação. Após a eutanásia, as carcaças foram imediatamente acondicionadas em sacos de lixo branco, identificados como lixo biológico infectante, autoclavadas e refrigeradas a -20°C em freezer do Departamento de Patologia Geral, que é exclusivamente utilizado para o armazenamento temporário destas carcaças. Posteriormente, as carcaças foram retiradas em um dia específico da semana por funcionário da limpeza interna da UFMG e depois a VIASOLO, uma empresa terceirizada contratada pelo ICB encaminhou os resíduos biológicos para tratamento por incineração e posteriormente, para o aterro sanitário.

3.3.5 – Análise de mortalidade

A análise de mortalidade foi representada pela porcentagem de animais que foram a óbito após o 3º dia de IIP de 100.000 trofozoítos.

3.3.6 – Análise morfométrica do abscesso hepático amebiano

Os cortes histológicos obtidos para a análise histopatológica também foram submetidos a análise morfométrica das áreas de necrose, focos inflamatórios e tecido de granulação, através

do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) (Costa *et al.*, 2007). Todas as áreas de necrose, focos inflamatórios e tecido de granulação foram visualizadas por intermédio da objetiva de 4x do microscópio Axiolab Carl Zeiss, digitalizadas através da microcâmara QColor3 – Olympus (Tokyo, Japão) e delimitadas interativamente com o auxílio do cursor para o cálculo da área em μm^2 . Em seguida, todos os cortes histológicos foram digitalizados por intermédio do scanner Epson, na resolução de 800 dpi. Todos os pixels de cada corte histológico foram totalmente selecionados, com subsequente criação de uma imagem binária e cálculo da área total do corte. A menor área de corte histológico do fígado foi usada como padrão mínimo de parênquima hepático a ser analisado estatisticamente.

3.4 – Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Graphpad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Os dados passaram pelos testes de normalidade Kolmogorov-smirnov e Shapiro-wilk e foram identificados de natureza não paramétrica, sendo então empregado o teste Kruskal-Wallis, para comparações múltiplas de pequenas amostras. Os resultados foram expressos como mediana e interquartis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.1 – Ensaio de eritrofagocitose

A fagocitose de hemácias foi confirmada através da presença das mesmas no citoplasma dos trofozoítos. As hemácias apresentavam coloração marrom devido à sua coloração pela DAB (Figura 1). Ajustes no foco do microscópio descartaram a possibilidade de se contar hemácias sobrepostas aos trofozoítos. Não foram contadas as hemácias simplesmente aderidas à superfície dos trofozoítos. As hemácias foram encontradas no interior dos trofozoítos de todas as cepas analisadas, demonstrando a sua capacidade de realizar eritrofagocitose. A análise estatística por meio do teste de Kurskal-Wallis não mostrou diferença significativa ao número de hemácias fagocitadas entre as cepas de *E. dispar*, contudo foi observada diferença quando comparadas com a cepa EGG de *E. histolytica* ($p < 0,001$). O gráfico 1 mostra a quantidade de amebas que realizaram a fagocitose e a quantidade de hemácias fagocitadas.

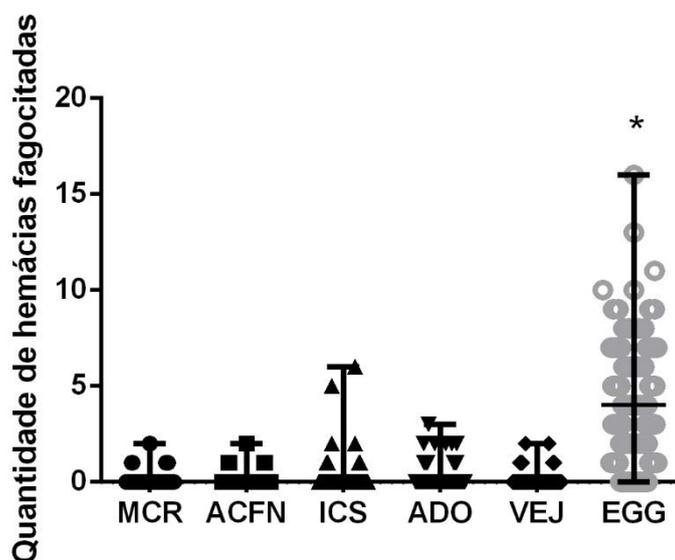


Gráfico 1 – Número de trofozoítos das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGG de *E. histolytica* que realizaram eritrofagocitose e número de hemácias fagocitadas por trofozoíto. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e interquartil, mostrando diferença estatística somente da cepa EGG sobre as demais ($p < 0,001$).

4.2 – Análise de mortalidade

Durante os períodos de infecção a cepa ACFN foi a que apresentou maior percentual de óbitos nos hamsters experimentados (12/22 hamsters - 55% dos animais), seguido da cepa MCR (6/26 hamsters - 23% dos animais). Os hamsters inoculados com as cepas ICS, ADO e VEJ não evoluíram para o óbito.

4.3 – Análise macroscópica e histopatológica do fígado de hamsters infectados com as cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ

O AHA foi observado em todos os grupos de animais, sendo mais frequente nos hamsters inoculados com as cepas MCR e ACFN (Tabela 2). Não foram observadas lesões macroscópicas e microscópicas nos hamsters inoculados com as respectivas microbiotas indígenas. Ao 3º DAI, a frequência de abscessos em atividade foi maior nos grupos MCR e ACFN (100%), seguido dos grupos ICS-3DAI (40%) e VEJ-3DAI (20%), não sendo observados no grupo ADO-3DAI. Quando analisados somente os grupos com 8-DAI, a frequência de abscessos em atividade foi maior no grupo ACFN-8DAI (100%), seguido dos grupos ICS-8DAI (60%) e MCR-8DAI (40%) (Tabela 2). O AHA era constituído por áreas branco-amareladas firmes ou de baixa consistência, correspondendo a áreas de necrose, frequentemente associadas a zonas avermelhadas de hemorragia (Figura 2). Em todos os AHA foram observadas aderências constituídas por espessas membranas fibrinosas, que se estendiam entre os próprios lobos hepáticos e os órgãos circunvizinhos, tais como o estômago, intestino, pâncreas e também com o tecido adiposo visceral, sendo mais extensas nos hamsters inoculados com a cepa ACFN (Figuras 2 e 3). Foi observada alta frequência de abscessos em reparo nos hamsters inoculados com a cepa ADO e eutanasiados ao 3º DAI (80%). Os mesmos foram visualizados também após o 12º DAI nos hamsters inoculados com as cepas MCR, ICS e VEJ, entretanto apresentando baixa frequência, mas de forma semelhante entre os grupos (Figura 4).

Todas as cepas de *E. dispar* produziram lesões amebianas nos grupos experimentais. Todas as cinco cepas testadas foram capazes de produzir zonas de necrose liquefativa frequentemente ricas em trofozoítos (Figura 5). A necrose era caracterizada pela presença de material granuloso e eosinofílico, às vezes com pequenos depósitos basofílicos de calcificação, cuja borda era rica em debris celulares com a presença de grande quantidade de núcleos em picnose, cariorrexe e cariólise (Figuras 2, 3 e 5). Destacaram-se os grupos ACFN-3DAI, ACFN-8DAI e MCR3-DAI pela positividade da necrose em 100% dos hamsters (Tabela 2; Figura 3). Na borda destas zonas de necrose notava-se a presença de discreto ou moderado infiltrado inflamatório misto composto por principalmente por neutrófilos e macrófagos e, por inúmeros trofozoítos, localizados também em meio à necrose (Tabela 3; Figuras 6 e 7). Já nos outros grupos, o parasitismo foi detectado em apenas 1 ou 2 hamsters e, a necrose foi mais frequente no grupo ICS 8DAI (60%), acometendo 3 hamsters (Tabelas 2 e 3). Aos 12 DAI, a necrose e o parasitismo foram encontrados somente no grupo MCR 12-DAI (40%), enquanto

foram ausentes em todos os grupos aos 16 DAI (Tabelas 2 e 3). Todos os hamsters dos grupos ACFN-12DAI e ACFN 16-DAI foram a óbito, não tendo sido realizadas as necropsias.

Os microabscessos apresentaram baixa frequência (variando entre 20 e 40%), sendo principalmente observados nos grupos MCR-8DAI, ACFN-8DAI e ADO-8DAI, de frequência aparentemente semelhante entre os grupos (Tabela 3; Figura 6). A ampliação do tamanho dos microabscessos originou focos necrótico-inflamatórios e necrose em ponte (Figura 8).

Infiltrado inflamatório predominantemente granulocitário, histiocitário ou misto (contendo também eosinófilos e linfócitos), focal e/ou difuso, que não foi mensurado, foi observado com frequência predominante ao 8º DAI nos grupos ICS-8DAI (60%), ADO-8DAI (60%) e VEJ-8DAI (80%) (Tabela 3). Já no 12º DAI, o predomínio foi nos grupos MCR-12DAI (100%), ICS-12DAI (100%) e ADO-12DAI(60%). No 16º DAI a frequência foi maior no grupo ICS-16DAI (60%), seguido dos grupos MCR-16DAI (40%) e VEJ-16DAI (20%) (Tabela 3; Figuras 6 e 7).

A inflamação crônica granulomatosa foi caracterizada como a presença de granulomas constituídos por paliçada de macrófagos xantomizados envolvendo zona central de necrose, células gigantes situadas externamente ao granuloma e trofozoítos presentes tanto na borda quanto na região central (Figura 7). Às vezes tais granulomas não estavam presentes, mas eram encontradas células gigantes associadas a infiltrado inflamatório misto, constituído por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos (Figuras 7 e 9). A inflamação crônica granulomatosa também esteve presente em 100% dos grupos no 8º DAI, com predomínio nos grupos ICS-8DAI (100%), ADO- 8DAI (60%) e VEJ-8DAI (60%) (Tabela 3). Já no 12º DAI foi predominante no grupo MCR-12DAI (80%) e ICS-12DAI (60%), seguido dos grupos ADO-12DAI (40%) e VEJ-12DAI (20%). Com 16 DAI foi observada com pequena frequência apenas nos grupos MCR-16DAI (40%) e ICS-16DAI(20%) (Tabela 3).

A esteatose hepática foi encontrada com baixa frequência (40 a 20%) nos hamsters inoculados com as cepas MCR, ACFN e ADO e, eutanasiados aos 8º ou 12º DAI, não sendo detectada em nenhum grupo no 16º DAI (Tabela 4). Em relação à degeneração hidrópica, sua frequência no 8º DAI foi idêntica à da esteatose, ao contrário do observado no 12º DAI, cuja frequência foi de 100% no grupo MCR-12DAI e de 20% no grupo ICS-12DAI. Aos 16º DAI a frequência continuou elevada no grupo MCR-16DAI e ausente nos demais grupos (Tabela 4; Figuras 6, 7,8 e 9).

A trombose esteve presente em 80% dos hamsters do grupo ACFN-8DAI e em 20% do grupo MCR-8 DAI, sendo ausente em todos os grupos no 12° e 16° DAI (Tabela 4). Os trombos eram venosos, mistos, recentes e parietais, presentes em zonas de necrose ou bem próximos à elas e frequentemente foram encontrados trofozoítos em seu interior (Figura 8). Já a hemorragia esteve presente em 100% nos grupos ACFN-3DAI, ACFN-8DAI e MCR3-DAI (Tabela 4; Figuras 2 e 5). No 12° e 16° DAI foi encontrada com baixa frequência (20%) e apenas nos hamsters inoculados com a cepa MCR (Tabela 4).

Os fenômenos reparativos de formação de tecido de granulação e poucas áreas de fibrose foram detectados em todos os grupos de hamsters do 3° e do 8° DAI, sendo predominante a frequência em quase todos eles (60 a 100%) (Tabela 4). O tecido de granulação estava associado ou não ao infiltrado inflamatório e era caracterizado pela presença de fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos neoformados e deposição de tecido conjuntivo (Figuras 4 e 3). No 12° e 16° DAI mostrou-se bem frequente (60%) nos hamsters inoculados com a cepa MCR. Na maioria dos outros grupos sua frequência variou de 20 a 40%, respectivamente no 12° e 16° DAI (Tabela 4). Ao 16° DAI, a maioria dos hamsters de todos os grupos apresentou preservação da maior parte do parênquima hepático (Figura 4).

Tabela 2: Frequência de abscessos hepáticos amebianos nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção.

Cepa	Número de AHA-3DAI		Número de AHA-8 DAI		Número de AHA-12 DAI		Número de AHA-16 DAI		Total de AHA
	AEA	AER	AEA	EAR	AEA	AER	AEA	AER	
MCR	5/5	0/5	2/5	0/5	2/5	1/5	0/5	1/5	11/15
ACFN	5/5	0/5	5/5	*	*	*	*	*	10/15
ICS	2/5	0/5	3/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	6/15
ADO	0/5	4/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/15
VEJ	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/15

AHA: abscesso hepático amebiano; DAI: dias após a infecção; AEA: abscesso em atividade; AER: abscesso em reparo; *Óbito de todos os hamsters sem a realização de necropsia.

Tabela 3: Frequência de parasitismo e lesões hepáticas nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção.

DAI	Trofozoítos*				Microabscessos				Infiltrado inflamatório não-mensurado				Inflamação crônica granulomatosa			
	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°
Cepa																
MCR	5/5	1/5	2/5	0/5	5/5	2/5	1/5	0/5	5/5	1/5	5/5	2/5	1/5	2/5	4/5	2/5
ACFN	5/5	5/5	-	-	5/5	1/5	-	-	5/5	1/5	-	-	1/5	2/5	-	-
ICS	2/5	2/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	4/5	3/5	5/5	3/5	0/5	5/5	3/5	1/5
ADO	0/5	1/5	0/5	0/5	0/0	2/5	0/5	0/5	3/5	3/5	3/5	0/5	2/5	3/5	2/5	0/5
VEJ	2/5	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	4/5	4/5	2/5	1/5	2/5	3/5	1/5	0/5

*Detecção de trofozoítos através da Hematoxilina e Eosina em zonas de necrose, lúmens vasculares ou no parênquima hepático não-necrosado.

Tabela 4: Frequência de lesões hepáticas nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção.

DAI	Esteatose				Degeneração hidrópica				Trombose				Hemorragia			
	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°	3°	8°	12°	16°
Cepa																
MCR	3/5	1/5	2/5	0/5	1/5	1/5	5/5	3/5	1/5	1/5	0/5	0/5	5/5	1/5	1/5	1/5
ACFN	5/5	2/5	-	-	0/0	2/5	-	-	1/5	4/5	-	-	5/5	5/5	-	-
ICS	0/5	0/5	0/5	0/5	0/0	0/5	1/5	0/5	0/0	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	0/5	0/5
ADO	0/5	2/5	1/5	0/5	0/0	2/5	0/5	0/5	0/0	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5
VEJ	0/5	0/5	0/5	0/5	0/0	0/5	0/5	0/5	0/0	0/5	0/5	0/5	2/5	2/5	0/5	0/5

Tabela 5: Frequência dos fenômenos de reparo nos grupos MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ, após 3, 8, 12 e 16 dias de infecção.

Tecido de granulação e/ou fibrose				
DAI	3°	8°	12°	16°
Cepa				
MCR	5/5	2/5	3/5	3/5
ACFN	4/5	3/5	-	-
ICS	5/5	4/5	2/5	1/5
ADO	5/5	4/5	2/5	1/5
VEJ	5/5	3/5	0/5	2/5

4.4 – Análise morfométrica do abscesso hepático amebiano

4.4.1 – 3° DAI

A morfometria das áreas de necrose do 3° DAI demonstrou diferença estatística entre a cepa MCR e as cepas ICS ($p=0,0478$), ADO ($p=0,0071$) e VEJ ($p=0,0084$). Já na análise da área dos focos inflamatórios não foi verificada diferença entre todos os grupos ($p=0,09$). Foi observada diferença estatística na área de tecido de granulação do grupo ADO-3 DAI quando comparada com os grupos ACF-3°DAI ($p=0,0236$) e ICS-3°DAI ($P=0,0126$). Os gráficos 2, 3 E 4 demonstram a área de necrose, focos inflamatórios e tecido de granulação no 3° DAI, bem como o resultado do teste de Kurskal-Wallis. ACF-3°DAI e ICS-3°DAI

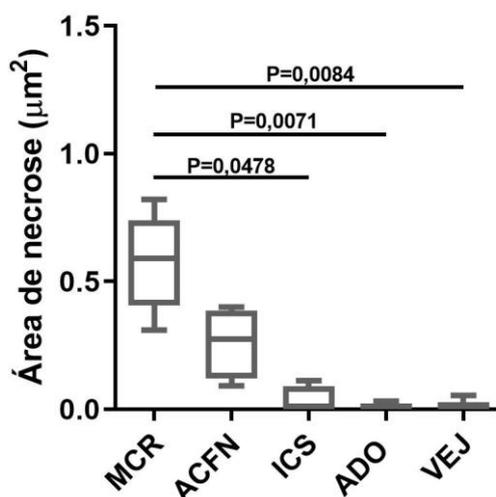


Gráfico 2: Área de necrose hepática produzida pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3° DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartis. Houve diferença significativa da cepa MCR quando comparada com as cepas ICS ($p=0,0478$), ADO ($p=0,0071$) e VEJ ($p=0,0084$).

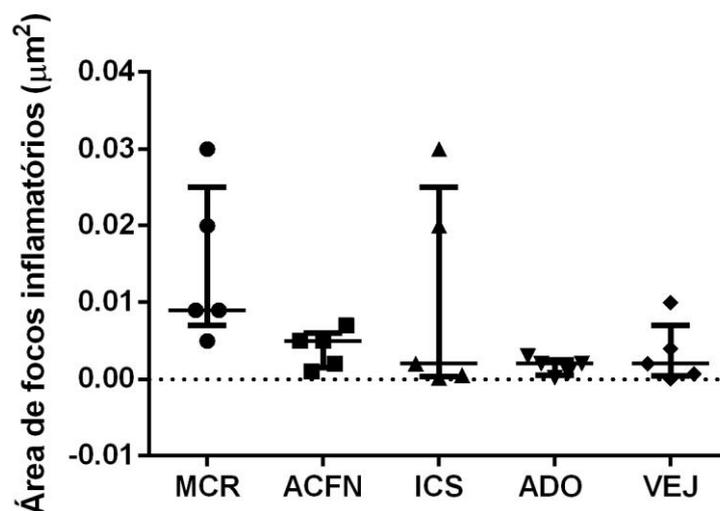


Gráfico 3: Área de focos inflamatórios produzidos pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

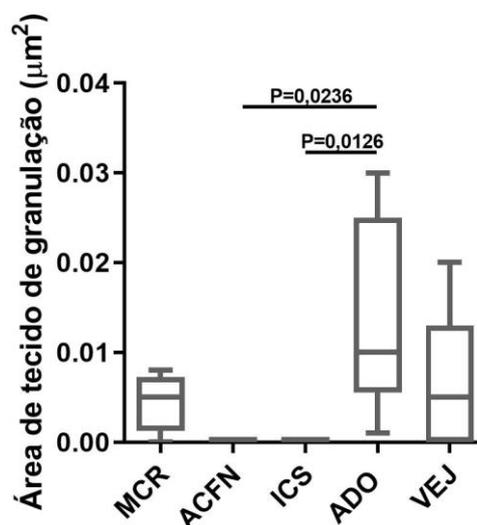


Gráfico 4: Área de tecido de granulação produzido pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 3º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Houve diferença significativa da cepa ADO quando comparada com as cepas ACFN ($p=0,0236$) e ICS ($p=0,0126$).

4.4.2 – 8º DAI

A análise morfométrica das áreas de necrose do 8º DAI demonstrou aumento significativo na área de necrose no grupo ACFN-8º DAI em relação aos grupos ADO-8ºDAI ($p=0,0167$) e VEJ-8ºDAI ($p=0,0167$). Na análise dos focos inflamatórios e tecido de granulação não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p= 0,16$ e $0,68$, respectivamente). Os gráficos 2, 3 e 4 demonstram a área de necrose, focos inflamatórios e tecido de granulação no 8º DAI, bem como o resultado do teste de Kurskal-Wallis.

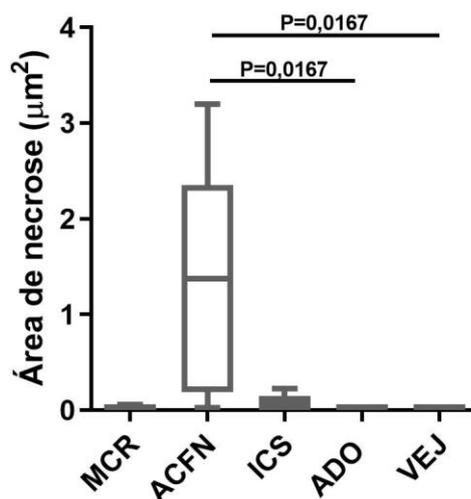


Gráfico 5: Área de necrose hepática produzida pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartis. Houve diferença significativa da cepa ACFN quando comparada com as cepas ADO ($p=0,0167$) e VEJ ($p=0,0167$).

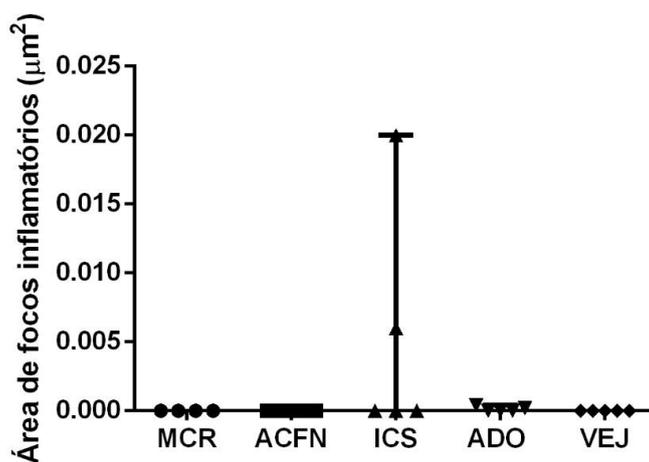


Gráfico 6: Área de focos inflamatórios produzidos pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartis. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

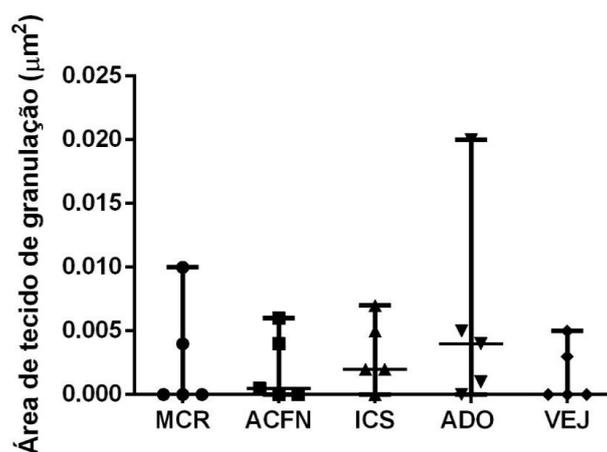


Gráfico 7: Área de tecido de granulação produzido pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 8º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

4.4.3 – 12º DAI

As análises morfométricas das áreas de necrose e de tecido de granulação dos hamsters inoculados com as cepas MCR, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar* e eutanasiados com 12º e 16º DAI não apresentaram diferenças significativas entre os grupos e ainda comprovou a grande substituição das zonas de necrose pela regeneração do parênquima hepático ou por tecido de granulação e fibrose.

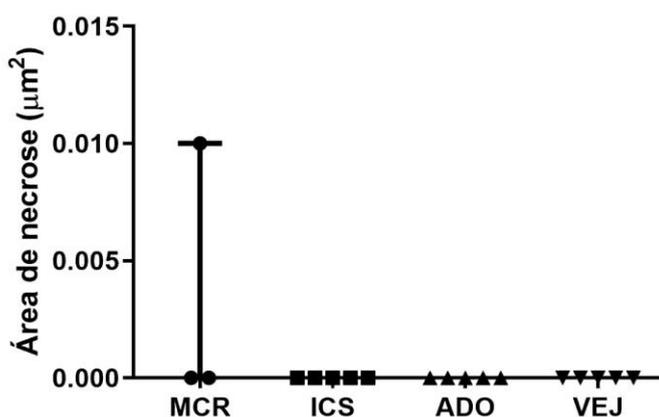


Gráfico 8: Área de necrose hepática produzida pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

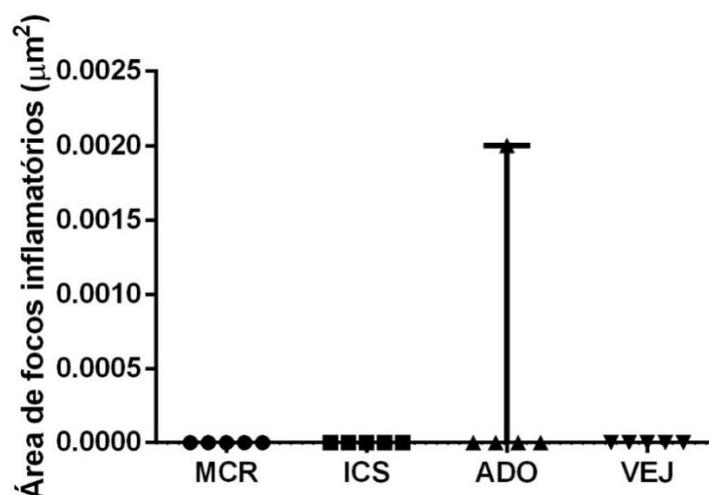


Gráfico 9: Área de focos inflamatórios produzidos pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

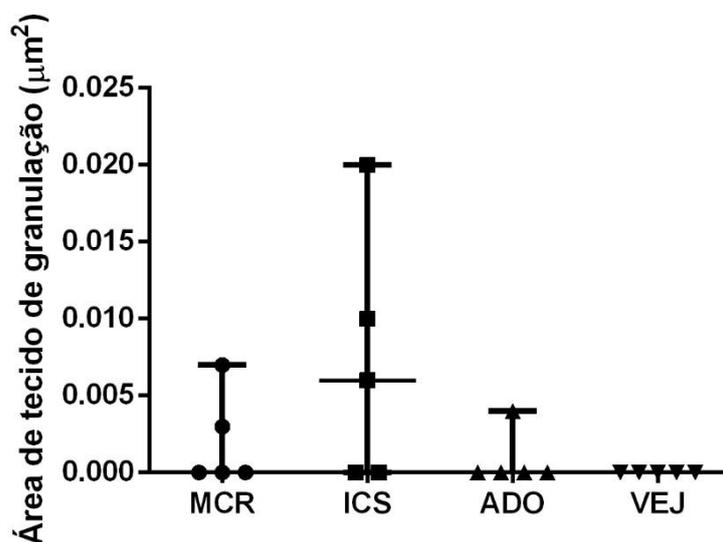


Gráfico 10: Área de tecido de granulação produzido pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 12º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

4.4.4 – 16º DAI

No 16º DAI apenas nos hamsters inoculados com a cepa MCR foram observados focos inflamatórios e tecido de granulação de tamanho significativo e que, por isso, foram mensurados. Entretanto, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos ($p=0,39$). Os gráficos 8 e 9 demonstram a área de focos inflamatórios e tecido de granulação no 16º DAI, bem como o resultado do teste de Kurskal-Wallis.

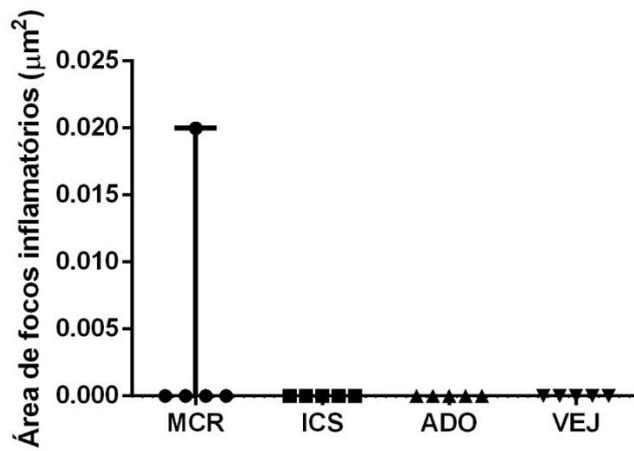


Gráfico 11: Área de focos inflamatórios produzidos pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 16º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

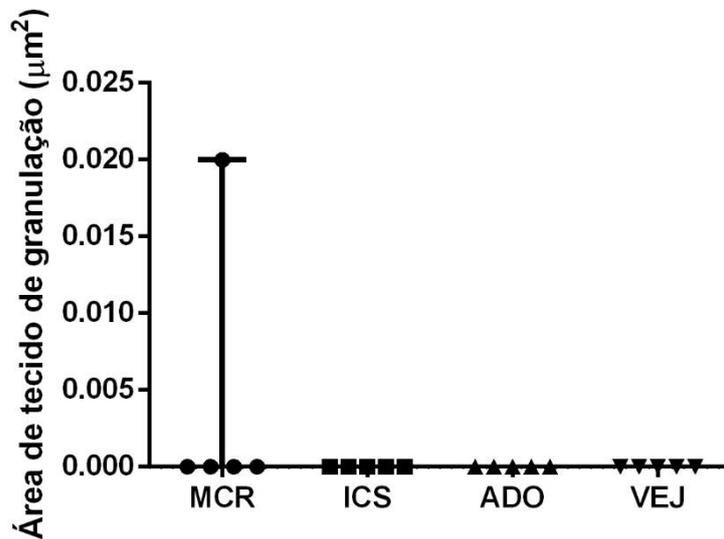


Gráfico 12: Área de tecido de granulação produzido pela *E. dispar* das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ no 16º DAI. Foi utilizado o teste de Kurskal-Wallis, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos no gráfico com mediana e interquartil. Não houve diferença significativa entre as cepas analisadas.

5 – DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar comparativamente as cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar*, avaliando o seu grau de virulência através do ensaio de eritrofagocitose e, de patogenicidade, através da investigação da capacidade destas cepas em produzir lesões amebianas hepáticas, tais como o AHA. Vale ressaltar que até o momento, poucas cepas de *E. dispar* foram estudadas com a profundidade proposta neste trabalho. Este foi o primeiro trabalho a avaliar a cinética da inflamação hepática produzida por cepas de *E. dispar* no 12º e 16º DAI. Os achados mais relevantes deste estudo foram que as cepas utilizadas são diferentes em relação à sua patogenicidade e que, apesar de existir esta diferença, a capacidade de fagocitar hemácias é similar. A cepa ACFN se mostrou mais patogênica, seguida das cepas MCR, ICS, VEJ e ADO. Além disso, com exceção da cepa ACFN, todas as outras foram capazes de produzir danos hepáticos autolimitados, sendo a regeneração a forma de reparo predominante e quase completa no 16º DAI.

A eritrofagocitose é uma técnica utilizada por vários autores para determinar a virulência das cepas de *E. dispar* e *E. histolytica*, servindo para diferenciar as cepas patogênicas das não-patogênicas (Lösh, 1875). A *E. histolytica* possui atividade fagocítica superior à da *E. dispar*, sendo evidenciado também pela maior concentração de hemoglobina em seu interior após o processo de fagocitose (Talamas-Lara *et al.*, 2014). A lectina ligante de GAL/GALNAc é importante no processo de adesão e ingestão das hemácias e também provoca a exposição da molécula de fosfatidilserina eritrocítica, que é reconhecida pelo trofozoíto. Assim como outros autores, nosso estudo demonstrou uma baixa capacidade de fagocitar hemácias pelas cepas de *E. dispar*, o que pode estar relacionado há uma menor expressão da lectina GAL/GALNAc, que é essencial para este processo. Boettner e colaboradores (2005) verificaram que a deficiência fagocítica da *E. dispar* envolve a sua menor capacidade de adesão, citólise e fagocitose. Além disso, uma mesma cepa pode apresentar subpopulações de trofozoítos com diferentes capacidades de realizar a eritrofagocitose (Talamas-Lara *et al.*, 2014). Tal fato está de acordo com os achados do nosso estudo, onde verificamos que a maioria dos trofozoítos das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO e VEJ de *E. dispar* não fagocitaram hemácias. Diferentemente do estudo realizado por Talamas-Lara (2014), as nossas cepas de *E. dispar* não fagocitaram grandes quantidades de hemácias. Em nosso estudo contabilizamos somente as hemácias fagocitadas e, ao que parece, no estudo de Talamas-Lara e colaboradores (2014), foram contadas também as hemácias aderidas à membrana dos trofozoítos. Durante o período de padronização da técnica de

eritrofagocitose, nós não observamos atividade fagocítica pelos trofozoítos após 20 minutos de interação, o que também difere dos outros estudos realizados, que observaram fagocitose pelos trofozoítos de *E. dispar* a partir de 5 minutos de interação (Boettner *et al.*, 2005). Acreditamos que este fato se deve provavelmente por utilizarmos cepas xênicas, e as bactérias da microbiota indígena poderiam estar envolvidas na regulação do processo.

As bactérias parecem ter um papel importante na patogênese da amebíase pela *E. dispar*. Estudos sugerem que a patogenicidade da *E. dispar* está relacionada à sua associação com a microbiota indígena do hospedeiro. (Ximénez *et al.*, 2010). Furst e colaboradores (2002) verificaram que ao retirar as bactérias indígenas da cepa Will₁ e associá-la com *Crithidia fasciculata*, a cepa perdeu a sua virulência e não foi capaz de produzir necrose em hamsters experimentalmente infectados. Acredita-se que a influência da microbiota na patogenicidade da *E. dispar* seja devida à um provável sinergismo com bactérias específicas ou à recombinação entre as duas espécies (Ximénez *et al.*, 2010). A fagocitose de bactérias da microbiota é capaz de aumentar a expressão da lectina ligante de GAL/GALNAc, que é essencial para a internalização de eritrócitos (Galván-Moroyoqui *et al.*, 2008). Estes achados sugerem que as bactérias podem regular o processo de fagocitose. São necessários maiores estudos para compreender a regulação deste processo nas cepas xênicas. Além disso, estudos de nosso grupo já verificaram que bactérias patogênicas são capazes de aumentar a patogenicidade das cepas de *E. dispar*. Os trofozoítos de *E. dispar* da cepa MCR, quando cocultivados com a enterobactéria *Salmonella Typhimurium*, aumentaram a expressão de fatores de virulência, como a lectina ligante de GAL/GALNAc, CP-5 e Amebaporo A. Além disso, essa associação aumentou a intensidade da colite ulcerativa induzida experimentalmente em ratos e também expressão de mediadores pró-inflamatórios, tais como a IL-1- α e COX-2 (Oliveira, 2016).

As CP's também estão envolvidas na fagocitose e participam na degradação da hemoglobina pelos trofozoítos. O uso de inibidor de CP's E64 é capaz de inibir o processo de fagocitose e reduzir a quantidade de hemácias ingeridas (Ankri, 1998).

Apesar de a cepa ACFN ter apresentado lesões amebianas mais intensas e em maior número de hamsters e, ter produzido maior mortalidade, a sua capacidade de eritrofagocitose foi semelhante às outras cepas de *E. dispar*. Tal achado nos permite concluir que a análise de virulência por meio da eritrofagocitose não se mostrou um método eficaz para avaliar a patogenicidade entre as cepas de *E. dispar*, mas apenas para comparar entre a *E. dispar* e a *E. histolytica*.

O AHA é a mais importante forma extra-intestinal da amebíase, sendo caracterizada principalmente pela necrose liquefativa (Brandt & Tamayo, 1970). Os primeiros estudos utilizando cepas de *E. dispar* não foram capazes de produzir o AHA em animais de experimentação, sendo apenas observados focos inflamatórios pouco expressivos (Espinosa-Cantellano *et al.*, 1997). Nosso grupo vem ao longo de alguns anos conseguindo reproduzir o AHA em animais de experimentação de forma semelhante ao observado na doença humana (Gomes *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2006; Furst *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2011).

Este trabalho demonstrou que apesar destas cepas de *E. dispar* terem sido isoladas de pacientes com sintomatologia clínica diferentes (assintomáticos ou com colite não disentérica), todas elas mostraram-se patogênicas, sendo observado o desenvolvimento de pelo menos um AHA após a inoculação de cada uma destas cepas. Além disso, outros tipos de alterações resultantes da agressão provocada pelo parasito também foram observadas, tais como os microabscessos, infiltrado inflamatório granulocitário, histiocitário ou misto, inflamação crônica granulomatosa, degenerações por acúmulo de lípidos e água, trombose, hemorragia, tecido de granulação e fibrose. Paradoxalmente, as cepas oriundas de pacientes sintomáticos mostraram-se as menos patogênicas no hamster.

Levando em consideração o número de animais que desenvolveram o AHA em nosso estudo, as cepas VEJ e ADO foram menos patogênicas se comparadas com as cepas ACFN e MCR. De forma geral, os hamsters inoculados com as cepas VEJ, ICS e ADO que desenvolveram necrose de liquefação, apresentaram lesões menos intensas que as produzidas pelas cepas ACFN e MCR.

Em estudo prévio nosso grupo demonstrou que a inoculação de 500.000 trofozoítos das cepas JCAO, ICS e VEJ, todas isoladas de pacientes com colite não-disentérica, foi capaz de produzir AHA em hamsters e colite amebiana em ratos no 6º DAI (Gomes *et al.*, 2000). Contudo, não analisamos detalhadamente e quantificamos as lesões e, nem avaliamos períodos mais longos de infecção. Neste mesmo estudo, observamos que de três outras cepas de *E. dispar* (MCR, SC e WILL), todas isoladas de pacientes assintomáticos, somente as duas primeiras produziram lesões amebianas, porém mais discretas e nem sempre presentes em todos os hamsters. A diferença de resultados obtidos em relação à cepa MCR deste trabalho de 2000 em relação aos dados publicados em anos posteriores (Costa *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2010a; Costa *et al.*, 2010b), inclusive quanto a capacidade de produzir colite amebiana

(Oliveira, 2016), talvez seja devido ao fato de termos analisado 3 diferentes períodos de infecção ou a mudanças na virulência da cepa.

Em relação à cepa ADO, a inoculação de 250.000 trofozoítos produziu AHA no 7º DAI, porém os autores não mencionam o número de hamsters acometidos e a frequência dos AHA (Shibayama *et al.*, 2007). Já Costa *et al.* (2000) obtiveram 100% de lesões extensas hepáticas no 6º DAI, inoculando 250.000 trofozoítos da cepa ADO em hamsters. Novamente percebemos que os resultados observados por nós não foram os mesmos que os de outros autores, provavelmente devido à redução da virulência desta cepa.

Uma vez identificadas cepas de *E. dispar* patogênicas, iniciamos estudos comparativos sistemáticos em relação à *E. histolytica*. Observamos que a área de necrose produzida pela cepa MCR foi semelhante à produzida pela cepa EGG de *E. histolytica* do 1º ao 3º DAI, sendo superada no 6º e 8º DAI (Costa *et al.*, 2007). Apesar disso, não foi verificada diferença estatística entre as áreas de necrose produzidas pelas duas espécies. A significativa patogenicidade desta cepa é corroborada pelo fato de ser a responsável pelo segundo maior índice de mortalidade dentre as cepas estudadas, apesar de sua capacidade de realizar eritrofagocitose ser a mesma.

A cinética dos danos hepáticos produzidos pela *E. histolytica* foi analisada por Tsutusumi *et al.* (1984), de 30 minutos após a inoculação, seguida de algumas das primeiras horas e, diariamente, do 1º ao 7º DAI. Resultados bastante semelhantes foram observados pelo nosso grupo ao analisar a cinética destas lesões produzidas pela *E. dispar*, de 12 horas após a inoculação, seguida do 1º, 2º, 3º, 6º e 8º DAI (Costa *et al.*, 2010). Durante as fases iniciais de inoculação os trofozoítos encontram-se nos espaços porta, capilares sinusóides e veias centrais. Invadem então o parênquima hepático e, a partir daí, ocorre a ativação da resposta inflamatória, que recruta principalmente neutrófilos para o local da infecção, e também macrófagos. Há então a formação de pequenos focos inflamatórios ricos em neutrófilos (microabscessos) que envolvem os trofozoítos para eliminá-los. Acredita-se que durante este processo ocorreria a seleção dos trofozoítos resistentes, tanto de *E. histolytica* (Rigothier *et al.*, 2002), quanto de *E. dispar* (Costa *et al.*, 2010), que vão ser os responsáveis pelo desenvolvimento da extensa necrose de liquefação posterior. Após 24 horas de inoculação, alguns focos inflamatórios já coalesceram, iniciando-se a formação de áreas de necrose, com borda repleta de debris celulares e discreto infiltrado inflamatório misto, constituído de neutrófilos e macrófagos. Os trofozoítos são encontrados principalmente nas bordas da lesão, entre o tecido hepático preservado e o necrosado. Produtos imunorreativos

são encontrados nas células inflamatórias, indicando a presença citoplasmática de restos de trofozoítos (Costa *et al.*, 2010). Além de trofozoítos, o centro necrótico pode ainda conter pequenas zonas de calcificação. À medida que a infecção vai cronificando, ocorre predomínio de células mononucleares e também a formação de granulomas constituídos por células epitelióides, macrófagos, poucos linfócitos e células gigantes. Os trofozoítos são encontrados frequentemente nesta fase, principalmente se há necrose no centro do granuloma (Costa *et al.*, 2010).

Utilizando-se o número total de AHA em atividade desenvolvidos no 3º DAI é possível concluir que as cepas mais patogênicas foram as seguintes, em ordem decrescente: ACFN (100%), MCR (100%), ICS (40%), VEJ (20%) e ADO (0%). Por outro lado, se tomarmos por base o 8º DAI, as cepas mais patogênicas foram as seguintes, em ordem decrescente: ACFN (100%), ICS (60%), MCR (40%), VEJ (20%) e ADO (20%). Não foi possível fazer uma análise comparativa no 12º e 16º DAI, pois todos os hamsters inoculados com a cepa ACFN destes dois períodos foram à óbito e não foram necropsiados. Além disso, o número de AHA's quantificados aos 12º e 16º DAI parece não ser um parâmetro preciso de patogenicidade, pois os AHA pequenos já podem ter sido reabsorvidos e evoluídos para fenômenos de regeneração e/ou cicatrização. Contudo, mesmo supondo que tais fenômenos tenham ocorrido e, levando em consideração o número total de AHA detectados nestes dois períodos da infecção, poderíamos então concluir que a 2ª cepa mais patogênica seria a MCR e não a ICS. Além da cepa ACFN se destacar dos demais grupos por apresentar o maior percentual de mortalidade, as lesões encontradas durante a necropsia foram mais exuberantes.

No 8º DAI todos os hamsters inoculados e eutanasiados com a cepa ACFN apresentaram necrose de liquefação e apenas um apresentou microabscessos. Os microabscessos hepáticos correspondem a uma das primeiras lesões amebianas que surgem após a chegada dos trofozoítos ao fígado. Em nossa experiência, eles podem ser detectados 12 horas após a inoculação intra-hepática em hamsters (Costa *et al.*, 2010). À medida que os microabscessos aumentam de tamanho, desenvolve-se a necrose em ponte, novas fusões de focos necróticos-inflamatórios, até a formação do AHA (Costa *et al.*, 2010). Microabscessos foram observados somente em alguns hamsters inoculados com as cepas MCR, ACFN e ADO. Assim, a ausência de microabscessos em boa parte dos grupos pode indicar que eles já se fundiram, originando zonas maiores de lesão ou que já houve a reparação do dano. O tecido de granulação foi observado na maioria dos hamsters de todos os grupos experimentais. Este achado indica a pré-existência da necrose em tempos inferiores, que foi substituída por

tecido cicatricial. A cepa MCR, única a ser estudada em outros trabalhos neste aspecto, reproduziu comportamento similar.

Muito frequentemente as amplas zonas de necrose são acompanhadas por intenso parasitismo, especialmente nas bordas destas zonas. No entanto, os trofozoítos nem sempre são facilmente identificáveis pela Hematoxilina & Eosina, tornando-se necessária a utilização da imuno-histoquímica. Apesar disso, no grupo ACFN-8 DAI, onde foram observados incontáveis trofozoítos, a intensidade da necrose foi diretamente proporcional ao parasitismo.

A inflamação tem papel importante na formação do abscesso hepático. Alguns autores a consideram como o principal fator responsável pelo aumento da área do AHA. Tais autores acreditam que a migração dos neutrófilos para o parênquima hepático após a infecção favoreceria a liberação de vários tipos de produtos microbicidas que contribuiriam para a morte dos hepatócitos (Campos-Rodríguez *et al.*, 2016). Entretanto outros autores demonstraram que a inflamação não seria o principal fator responsável pelo desenvolvimento da necrose, e sim a ação dos trofozoítos. Hamsters tratados com dexametasona e inoculados com trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica* mostraram uma discreta diminuição da área de necrose se comparado com os não tratados. Tal fato corrobora a ideia de que os produtos secretados pelos trofozoítos seriam os responsáveis pelo maior dano tecidual (Costa *et al.*, 2011). O infiltrado inflamatório observado em nosso estudo era neutrofílico, histiocitário ou misto, também constituído por linfócitos e eosinófilos. No 8º DAI o infiltrado inflamatório foi mais frequente justamente nos grupos onde a frequência do AHA foi menor, ou seja, nos hamsters inoculados com as cepas ICS, ADO e VEJ. Apesar de esta inter-relação ser mantida em relação aos grupos ICS-12 DAI, ICS-16 DAI, ADO-12 DAI e ADO-16 DAI, o mesmo não foi observado no grupos MCR-12 DAI, MCR-3DAI e ACFN-3DAI, mostrando que a intensidade deste infiltrado não se comportou da mesma maneira em todos os grupos.

Na amebíase, o infiltrado inflamatório mencionado anteriormente evolui para uma inflamação crônica granulomatosa que pode formar granulomas bem estruturados, constituídos principalmente por paliçada de macrófagos xantomizados, células gigantes na periferia e zona central de necrose contendo trofozoítos íntegros e destruídos. A presença deste tipo de inflamação aumenta as chances do hospedeiro em eliminar os trofozoítos e de vencer a infecção. De fato, no 8º DAI ela foi mais frequente em grupos onde não houve óbitos: ICS (100%), ADO (60%) e VEJ (60%). Contudo, ela foi observada com baixa frequência (40%) no grupo MCR-8 DAI onde também não foram verificados óbitos. Isso

pode significar que a presença da inflamação crônica granulomatosa é importante para o combate à infecção, mas que outros mecanismos também podem estar envolvidos.

Esteatose e degeneração hidrópica são lesões reversíveis que, na amebíase, parecem estar mais relacionadas indiretamente a fenômenos isquêmicos e/ou inflamatórios. Apesar disso, não foi observada inter-relação entre a frequência da inflamação e da trombose com a esteatose e a degeneração hidrópica. Enquanto a esteatose foi observada com baixa frequência nos hamsters inoculados com as cepas MCR, ACFN e ADO, a degeneração hidrópica se mostrou intensa e frequente naqueles inoculados com a cepa MCR.

Geralmente a trombose e a hemorragia são mais frequentes onde há extensas zonas de necrose. De fato, isso foi observado nos grupos ACFN-8 DAI e MCR-8 DAI. A trombose portal parece estar relacionada à chegada dos trofozoítos em ramos da veia porta (Brandt & Tamayo, 1970). Trofozoítos foram encontrados na parede vascular, no trombo e no lúmen vascular, conforme descrito por Costa *et al.* (2010).

Pela primeira vez nosso estudo demonstrou que a infecção por algumas cepas de *E. dispar* é autolimitada. A frequência de AHA em atividade tende a diminuir ao longo da infecção, ao mesmo tempo em que, em geral, percebe-se redução da quantidade de tecido de granulação e aumento da área de parênquima normal. O Tecido de granulação a ser desenvolvido é diretamente proporcional à extensão das áreas de necrose e, sua presença, indica que já estão ocorrendo fenômenos de cura, mesmo diante da presença de trofozoítos. Ao longo do tempo, o tecido de granulação vai reduzindo a celularidade e aumentando a deposição de matriz extracelular, especialmente de fibras colágenas. Contudo, apenas poucas áreas de fibrose foram encontradas em alguns hamsters. Isso significa que ao invés de gerar fibrose, o tecido de granulação foi remodelado e substituído por regeneração do parênquima hepático. Mesmo a cepa mais patogênica como a ACFN também apresentou tecido de granulação em 60% dos hamsters no 8º DAI. Apesar disso, os hamsters não conseguiram sobreviver além deste período da infecção, provavelmente porque a ampliação das zonas de necrose levou a uma insuficiência hepática. Nos demais grupos, especialmente com 16 DAI, aliado ao tecido de granulação e à fibrose, as amplas regiões de parênquima normal, a ausência de trofozoítos e a redução substancial da inflamação indicaram a cura da amebíase experimental.

Nosso estudo morfométrico demonstrou que existem diferenças estatísticas quanto à área de necrose entre os grupos MCR-3 DAI e ICS-3 DAI, ADO-3 DAI, VEJ-3 DAI, ACFN-8 DAI, ADO-8 DAI, VEJ-3 DAI. Além disso, a análise histopatológica e o nível de

mortalidade dos hamsters nos permitiu concluir que existem outras diferenças entre estas cepas de *E. dispar*. Maiores estudos serão necessários para compreender as diferenças no comportamento biológico das cepas testadas, como a influência do sinergismo das bactérias da microbiota indígena da qual foram isoladas, além da análise da expressão de fatores de virulência, como as cisteína proteinases, amebaporos e a lectina ligante de GAL/GALNAc.

6 – CONCLUSÕES

- 6.1 – Todas as cepas de *E. dispar* analisadas são capazes de fagocitar eritrócitos humanos, porém em quantidades inferiores em relação à *E. histolytica*;
- 6.2 - A eritrofagocitose parece não ser um método eficaz para avaliar a virulência entre as cepas de *E. dispar* analisadas, mas somente entre espécies (*E. dispar* e *E. histolytica*);
- 6.3 - A cepa ACFN é patogênica no hamster, sendo capaz de produzir o AHA;
- 6.4 – A cepa mais patogênica foi a ACFN, seguida da MCR. A terceira mais patogênica foi a ICS, seguida da VEJ e ADO com patogenicidades similares.
- 6.5 – O parasitismo pareceu ser o agente mais importante responsável pelo surgimento da necrose;
- 6.6 – A infecção amebiana produzida pela *E. dispar* é autolimitada, com exceção da produzida pela cepa ACFN;
- 6.7 – A inflamação crônica granulomatosa parece ser bastante eficaz no combate à infecção;
- 6.8 – A regeneração é o mecanismo de cura predominante na amebíase experimental produzida pela *E. dispar*, concluindo-se no 16º DAI. A cicatrização ocorre em pequenas áreas, a despeito das grandes extensões de tecido de granulação.

7 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami P, Zarate M, Mollan-Velasco F, Schooinick G, *et al.* Application of the polimerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:58-70.

Aguirre-García MM, Anaya-Ruiz M, Talamas-Rohana P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology* 2003;126:195-202.

Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol* 2008;8:698-707.

Ankri S, Stolarsky T, Mirelman D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases does not affect *Entamoeba histolytica* cytopathic or haemolytic activity but inhibits phagocytosis. *MolMicrobiol* 1998;28:777-785.

Benetton ML, Gonçalves AV, Meneghini ME, Silva EF, Carneiro M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* complex: An epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005;99:532-40.

Boettner DR, Hudson CD, Sullivan JA, Petri WA. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. *Infection and Immunity* 2005;73:3422-30.

Brandt H, Tamayo RP. Pathology of human amebiasis. *Hum Pathol* 1970;1:351-85.

Calderon J, Schreiber RD. Activation of the alternative and classical complement pathways by *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1985;50(2):560-5.

Calegar DA, Nunes BC, Monteiro KJL, Santos JP, Toma HK, Gomes TF, Lima MM, Bóia MN, Carvalho-Costa FA. Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2016;111(2):114-19.

Campos-Rodríguez R, Gutiérrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Drago-Serrano ME, Abarca-Rojano E, Ventura-Juárez J, Cárdenas-Jaramillo LM, Pacheco-Yeppez J. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite* 2016;23:6.

Carrero JC, Cervantes-Rebolledo C, Aguilar-Diaz H, Diaz-Gallardo MY, Laclette JP, Morales-Montor J. The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 2007;29:331-8.

Cervantes-Rebolledo C, Moreno-Mendoza N, Morales-Montor J, De La Torre P, Laclette JP, Carrero JC. Gonadectomy inhibits development of experimental amoebic liver abscess in hamsters through downregulation of the inflammatory immune response. *Parasite Immunol* 2009;31(8):447-56.

Chadee K, Smith JM, Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: Electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Am J Trop Med Hyg 1985;34:870-8.

Clark CG. Royal society of tropical medicine and hygiene meeting at manson house, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998;92:361-4.

Cornick S, Chadee, K. *Entamoeba histolytica*: host parasite interactions at the colonic epithelium. Tissue Barriers 2017;06:18.

Costa AO, Viana JC, Assis D, Rocha OA, Silva EF. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. Arch Med Res 2000;31:247-8.

Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. Parasite 2007;14:329-34.

Costa CA, De Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. Eur J Histochem 2010;54:e39.

Costa CA, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliarí MV. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. Parasit Vectors 2010;3:23.

Costa CA, Fonseca TH, Oliveira FM, Santos JF, Gomes MA, Caliarí MV. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: An immunohistochemical and morphometric study. Parasit Vectors 2011;4:27.

Cruz-Baquero A, Cárdenas Jaramillo LM, Gutiérrez-Meza M, Jarillo-Luna RA, Campos-Rodríguez R, Rivera-Aguilar V, et al. Different behavior of myeloperoxidase in two rodent amoebic liver abscess models. PLoS ONE 2017;12(8).

Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993;40:340-4.

Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, Leo BM, Schroeder JW, Mann BJ. Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitology 1997;46:225-35.

Duggal P, Haque R, Roy S, Mondal D, Sack RB, Farr BM, Beaty TH, Jr WAP. Influence of Human Leukocyte Antigen Class II Alleles on Susceptibility to *Entamoeba histolytica* Infection in Bangladeshi Children. The Journal of Infect Diseases 2004;189(3):520-6.

- Espinosa Cantellano M, Castañón Gutiérrez G, Martínez-Palomo A. *In vivo* pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 1997;28:204-6.
- Espinosa-Cantellano M, Gonzáles-Robles A, Chávez B, Castañón G, Argüello C, Lázaro-Haller A, *et al.* *Entamoeba dispar*: Ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. J Eukaryot Microbiol 1998;45:265-72.
- Evangelopoulos A, Legakis N, Vakalis N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. Parasit Intern 2001; 50:185-89.
- Ferreira CB, Marçal-Júnior O. Intestinal parasitic infections among schoolchildren Martinésia district, Uberlândia-MG: A pilot study. Rev Soc Bras Med Trop 1997;30:373-7.
- Furst C, Gomes MA, Tafuri WL, Silva EF. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. Pathologica 2002;94:22-7.
- Galván-Moroyoqui JM, Domínguez-Robles MC, Franco E, Meza I. The interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. PLOS Neglected Tropical Diseases 2008;2(7):e266.
- GBD 2013. Mortality and Causes of Death Collaborators, I. for H. M. and *et al.* Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet 2015;385:117-71.
- Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez OA, *et al.* Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: Evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. J Clin Microbiol 2000;38:3815-21.
- Gil FF, Busatti HG, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. Pathog Glob Health 2013;107:320-4.
- Gomes MA, Melo MN, Macedo AM, Pena GP, Caliarí MV, Silva EF. Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical, and molecular parameters. Arch Med Res 2000;31:249-50.
- Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN. LSSP-PCR for characterization of stains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. Parasitology 1997;114:517-20.
- Gomes MA, Melo MN, Pena GPM, Silva EF. Virulence parameters in the characterization of strains of *Entamoeba histolytica*. Rev Inst Med Trop São Paulo 1997;39:65-69.
- Guzmán CE, López ME, Reyes P, Gómez JE, Corredor A, Agudelo C. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in stool samples for detection of the adhesion *E.histolytica* by ELISA. Biomédica 2001;21:167-71.
- Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. N Engl J Med 2003;348:1565-73.

Hegazi MA, Patel TA, El-Deek BS. Prevalence and characters of *Entamoeba histolytica* infection in Saudi infants and children admitted with diarrhea at 2 main hospitals at South Jeddah: Are-emerging serious infection with unusual presentation. *Braz J Infect Dis* 2013;17:32-40.

Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol* 2004;20:23-6.

Huston CD, Houpt ER, Mann BJ, Hahn CS, Petri WA Jr. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* 2000; 2:617-25.

Jackson TF. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol* 1998;28:181-6.

Kato K, Makiuchi T, Cheng X, Tachibana H. Comparison of hemolytic activity of the intermediate subunit if *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* lectins. *PLoS One* 2017; 27;12(7).

Lauwaet T, Oliveira MJ, De Bruynen G, Bruchhaus I, Duchene M, Mareel M, Leroy A. *Entamoeba histolytica* transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. *International Journal for Parasitology* 2004; 34:549-556.

Leippe M. Amoebapores. *Parasitol Today* 1997;13:178-83.

Leippe M, Andrä J, Müller-Eberhard HJ. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(7):2602-06.

Leippe M. Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. *Cell* 1995;83(1):17-8.

Leiva B, Lebbad M, Winięcka-Krusnell J, Altamirano I, Téllez A, Linder E. Over diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006;37:529-34.

Levecke B, Dreesen L, Barrionuevo-Samaniego M, Ortiz WB, Praet N, Brandt J, *et al.* Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105:737-9.

Lotter H, Jacobs T, Gaworski I, Tannich E. Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun.* 2006;74(1):118-24.

Martinez AM, Gomes MA, Viana J Da C, Romanha AJ, Silva EF. Isoenzyme profile as parameter to differentiate pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1996;38:407-12.

- Monroy VS, Flores OM, García CG, Maya YC, Fernández TD, Ishiwara DGP. Calpain-like: A Ca²⁺ dependent cystein protease in *Entamoeba histolytica* cell death. *Exp Pathology*. 2015;59:245-51.
- Moody S, Becker S, Nuchamowitz Y, Mirelman D. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology* 1997;114:95-104.
- Nickel R, Ott C, Dandekar T, Leippe M. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. Similarity and divergence to amoebapores in structure, expression and activity. *Eur J Biochem* 1999;265:1002-7
- Noor Z, Watanabe K, Abhyankar MM, Burgess SL, Buonomo EL, Cowardin CA, Jr WAP. Role of Eosinophils and Tumor Necrosis Factor Alpha in Interleukin-25-Mediated Protection from Amebic Colitis. *mBio* 2017;8(1):e0329-16.
- Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, Caliani MV. *Entamoeba dispar*: could it be pathogenic. *Trop Parasitol* 2015;5(1):9-14.
- Oliveira, FMS. Influência da *Salmonella enterica* sorovar *typhimurium* sobre a virulência da *Entamoeba dispar* e da *Entamoeba histolytica* *in vitro* e na colite amebiana experimental. Belo Horizonte, 2016.106p. Tese de Doutorado – Departamento de Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Orozco E, Guarneros G, Martinez-Palomo A, Sanches T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. *J Exp Med* 1983;158(5):1511-21.
- Ouattara M, N'Guéssan NA, Yapi A, N'Goran EK. Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e574.
- Pacheco-Yepes J, Campos-Rodriguez R, Rojas-Hernandez S, *et al*. Differential expression of surface glycoconjugates on *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol Int* 2009;58:171–7.
- Peterson KM, Shu J, Duggal P, Haque R, Mondal D, Petri WA Jr. Association between TNF- α and *Entamoeba histolytica* diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 2010;82: 620-25.
- Que X; Reed SL. The role of extra cellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol Today* 1997;13:190-4.
- Ralston, KS, Petri, WA. The ways of a killer: how does *Entamoeba histolytica* elicit host cell death? *Essays Biochem* 2011;51:193–210.
- Ramos F, García G, Valadez A, Morán P, González E, Gómez A, *et al*. *E. dispar* strain: Analysis of polymorphism as a stool for study of geographic distribution. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:175-7.

Ramos F, Moran P, González E, García G, Ramiro M, Gómez A, *et al.* High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:87-91.

Reed SL, Gigli I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. *J Clin Invest* 1990;86:1815-1822.

Reed SL, Keene WE, McKerrow JH. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Microbiol* 1989;27:2772-7.

Reyes L, León R. Differentiation of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* and new findings in Pathogenesis of the Intestinal amebiasis. *Rev Costarric Cienc Méd* 2002;23:3-4.

Rigothier MC, Khun H, Tavares P, Cardona A, Hueree M, Guillen N. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect Immun.* 2002; 70: 3208-15.

Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:916-21.

Rivero Z, Brach A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, *et al.* Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by polymerase chain reaction in a community in Zulia State, Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2009;25:151-9.

Santi-Rocca J, Rigothier MC, Guillen N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Rev* 2009;65-75.

Santos FL, Cerqueira EJ, Soares NM. Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:196-8.

Sargeant PG. The reliability of *Entamoeba histolytica* Zymodemes in Clinical Diagnosis. *Parasitol Today*;3(2):40-43.

Sargeant PG, Williams JE, Grene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978;72:519-21.

.

Shibayama M, Dolabella SS, Silva EF, Tsutsumi V. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. *Annals of hepatology* 2007;6(2):117-18.

Silva, EF. *Entamoeba moshkovskii* TCHALAIA, 1941: Novos focos na América do Sul; aspectos da morfologia e biologia em comparação com a *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903 e *Entamoeba ranarum* GRASSI, 1879. Belo Horizonte, 1972.141p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais.

Silva MC, Monteiro C Do S, Araújo B Dos A, Silva JV, Póvoa MM. Determination of *Entamoebahistolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belém, Pará, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection. *Cad Saúde Pública* 2005;21:969-73.

Stanley SL Jr. Amoebiasis. *Lancet* 2003;361:1025-34.

Stauffer W, Abd-Alla M, Ravdin JI. Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. *Arch Med Res* 2006;37:266-9.

Talamás-Lara D, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Talamás-Rohana P, Salazar-Villatoro L, Durán-Díaz Á, Martínez-Palomo A. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: a comparative study. *Biomed Res Int* 2014;626259.doi: 10.1155/2014/626259

Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5118-22.

Trissl D, Martinez-Palomo A, De-la-Torre M, De-la-Hoz R, Perez S. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J Exp Med* 1978;148:1137-43.

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

Valenzuela O, Morán P, Ramos F, Cardoza JI, García G, Valadez A, *et al.* Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: A case report. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:51-4.

Velazquez C, Shibayama-Salas M, Aguirre-Garcia J, Tsutsumi V, Calderon J: Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol* 1998;20:255-62.

Villalba-Magdaleno JD, Pérez-Ishiwara G, Serrano-Luna J, Tsutsumi V, Shibayama M. *In vivo* programmed cell death of *Entamoeba histolytica* trophozoites in a hamster model of amebic liver abscess. *Microbiology society* 2011;157:1489-99.

Vohra H, Bhatti HS, Ganguly NK, Mahajan RC. Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea-pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:648-50.

Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 1986;8:228-38.

World Health Organization (WHO). Report of a consultation of experts on Amoebiasis (México). Geneva: *Weekly Epidemiological Record* 1997:97-100.

Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, *et al.* Human amebiasis: Breaking the paradigm? *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:1105-20.

Yan L, Stanley SL Jr. Blockade of caspases inhibits amebic liver abscess formation in a mouse model of disease. *Infect Immun* 2001;69:7911-4

Zhang Z, Mahajan S, Zhang X, Stanley SL Jr. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestinal xenograft model of disease. *Infect Immun* 2003;71(9):5355-9.

8 – ANEXOS

8.1 – Documento de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação da virulência e da patogenicidade de cepas de Entamoeba dispar oriundas das regiões norte e sudeste do Brasil.", protocolo do CEUA: 247/2016 sob a responsabilidade de Marcelo Vidigal Caliani que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 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 23/11/2016.

Vigência do Projeto	01/10/2016 a 01/10/2019
*Espécie/Inhagem	Hamster207
Nº de animais	75
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia/ICB
*Espécie/Inhagem	Hamster208
Nº de animais	75
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia/ICB
*Espécie/Inhagem	Hamster209
Nº de animais	75
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia/ICB
*Espécie/Inhagem	Hamster211
Nº de animais	15
Peso/Idade	140g / 30(dias)
Sexo	masculino
Origem	Biotério do Departamento de Parasitologia/ICB

Considerações posteriores:

23/11/2016	Aprovado na reunião do dia 21/11/2016
------------	---------------------------------------

Belo Horizonte, 14/12/2016.

Atenciosamente,

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

8.2 – Figuras

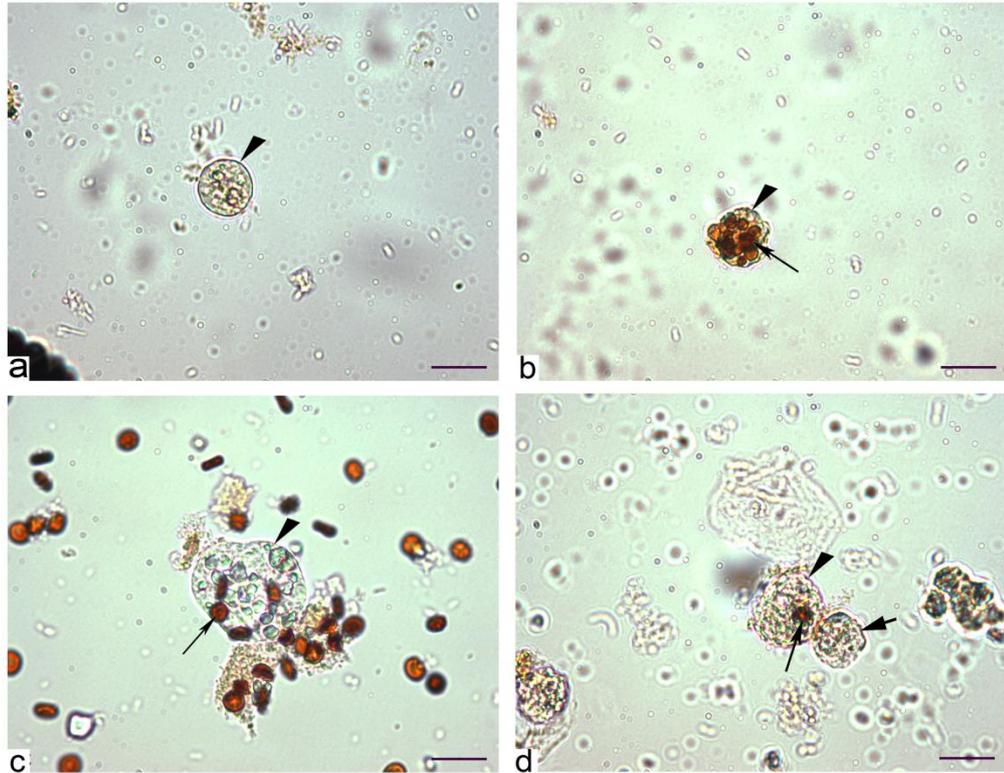


Figura 01 - Ensaio de eritrofagocitose: a) Trofozoito da cepa EGG (cabeça de seta) sem eritrócitos fagocitados; b) Trofozoito da cepa EGG (cabeça de seta) com vários eritrócitos fagocitados (seta), corados em tons de marrom pela diaminobenzidina – DAB; c) Trofozoito da cepa MCR (cabeça de seta) com alguns eritrócitos fagocitados (seta); d) Trofozoito da cepa ICS (cabeça de seta) com um eritrócito fagocitado (seta). Trofozoito da mesma cepa sem eritrócito fagocitado. Revelação pela DAB. Barras = 20 μ m.

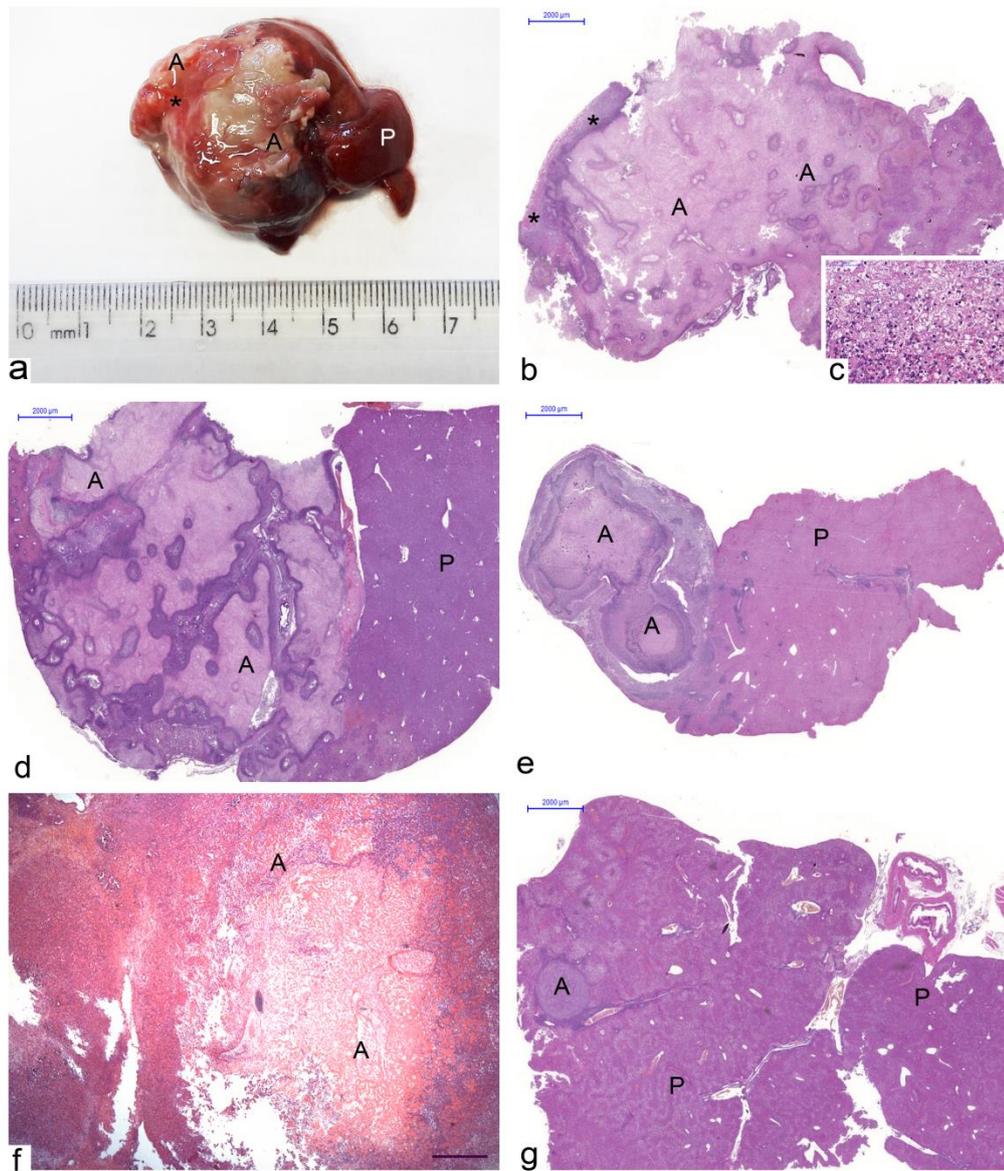


Figura 2 - Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar*: a) Macroscopia do abscesso hepático amebiano - AHA (A) produzido pela cepa ACFN, eutanásia 8 dias após a infecção (DAI), evidenciando áreas de necrose de coloração branco-amarelada, firmes ou de baixa consistência, associadas a zonas de hemorragia (*). Áreas hepáticas sem necrose (P); b) AHA (A) produzido pela cepa ACFN, 8 DAI. Zonas de aderência (*); c) Maior aumento da figura anterior mostrando necrose liquefativa; d) AHA (A) produzido pela cepa MCR, 12 DAI. Parênquima hepático não necrosado (P); e) AHA (A) produzido pela cepa ICS, 8 DAI. Parênquima hepático não necrosado (P); f) AHA (A) produzido pela cepa VEJ, 8 DAI; g) AHA (A) produzido pela cepa ADO, 8 DAI. Parênquima hepático não necrosado (P). b, d, e, g: Hematoxilina & Eosina (H&E). Barra = 2.000µm. c: H&E Barra = 50 µm. f: H&E. Barra = 200 µm.

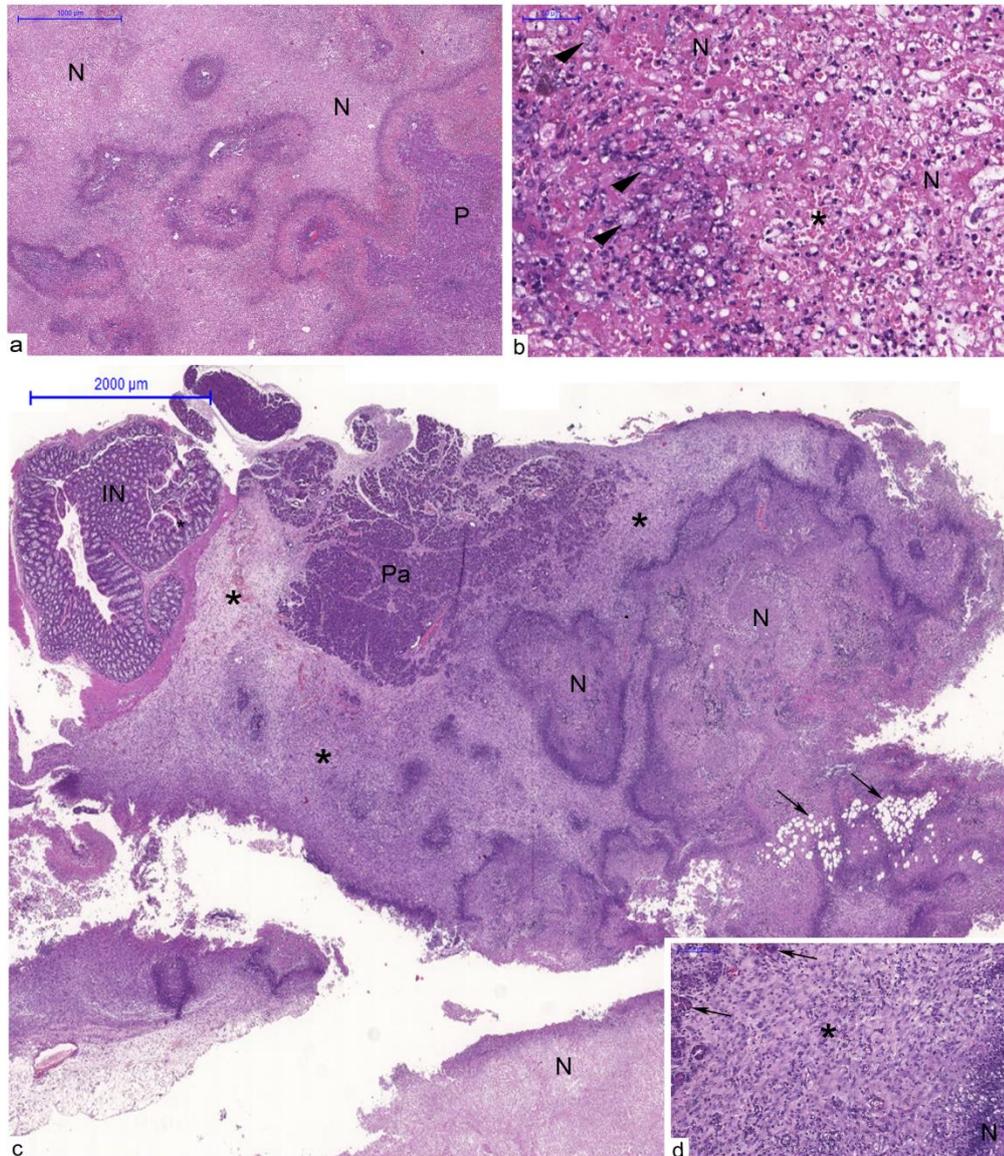


Figura 3 - Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar* da cepa ACFN e eutanasiado 8 dias após a infecção (DAI): a) Extensa área de necrose de liquefação (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Hematoxilina & Eosina (H&E). Barra = 1000µm; b) Maior aumento da figura anterior mostrando grande número de trofozoítos (cabeças de seta) na área de necrose (N). Hemorragia (*). H&E. Barra = 50µm; c) Aderências do parênquima hepático necrosado (N) ao pâncreas (Pa), intestino (IN) e tecido adiposo visceral (setas), constituídas por tecido de granulação (*). H&E. Barra = 2000µm; d) Maior aumento da figura anterior mostrando tecido de granulação (*) junto aos ácinos pancreáticos (setas) e à área de necrose (N). H&E. Barra = 100µm.

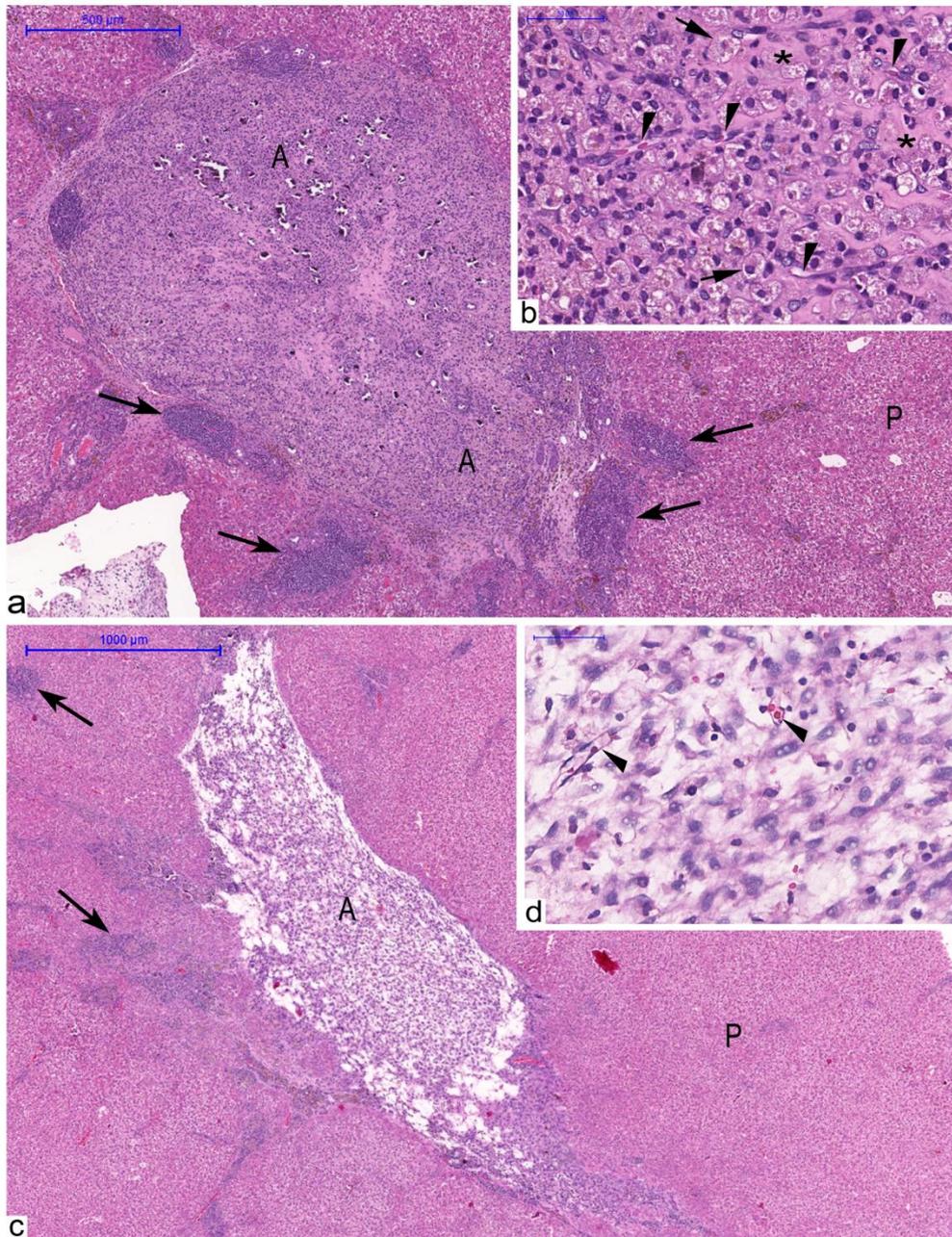


Figura 4: Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar*. **a)** Inóculo com a cepa MCR, 12 DAI. AHA (A) em reparação, circundado por alguns focos inflamatórios (Setas). Parênquima hepático não necrosado (P). Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra = 500µm; **b)** Maior aumento da figura anterior mostrando detalhes do tecido de granulação. Fibrose (*), capilares neoformados (cabeças de seta), macrófagos xantomizados (setas curtas) e infiltrado inflamatório constituído por granulócitos e linfócitos. (H&E). Barra = 50µm; **c)** Inóculo com a cepa ICS, 12 DAI. AHA (A) em reparação, circundado por alguns focos inflamatórios (Setas). Parênquima hepático não necrosado (P). (H&E). Barra = 1000µm; **d)** Maior aumento da figura anterior mostrando detalhes do tecido de granulação constituído principalmente por macrófagos, fibroblastos e capilares neoformados (cabeças de seta). (H&E). Barra = 50µm.

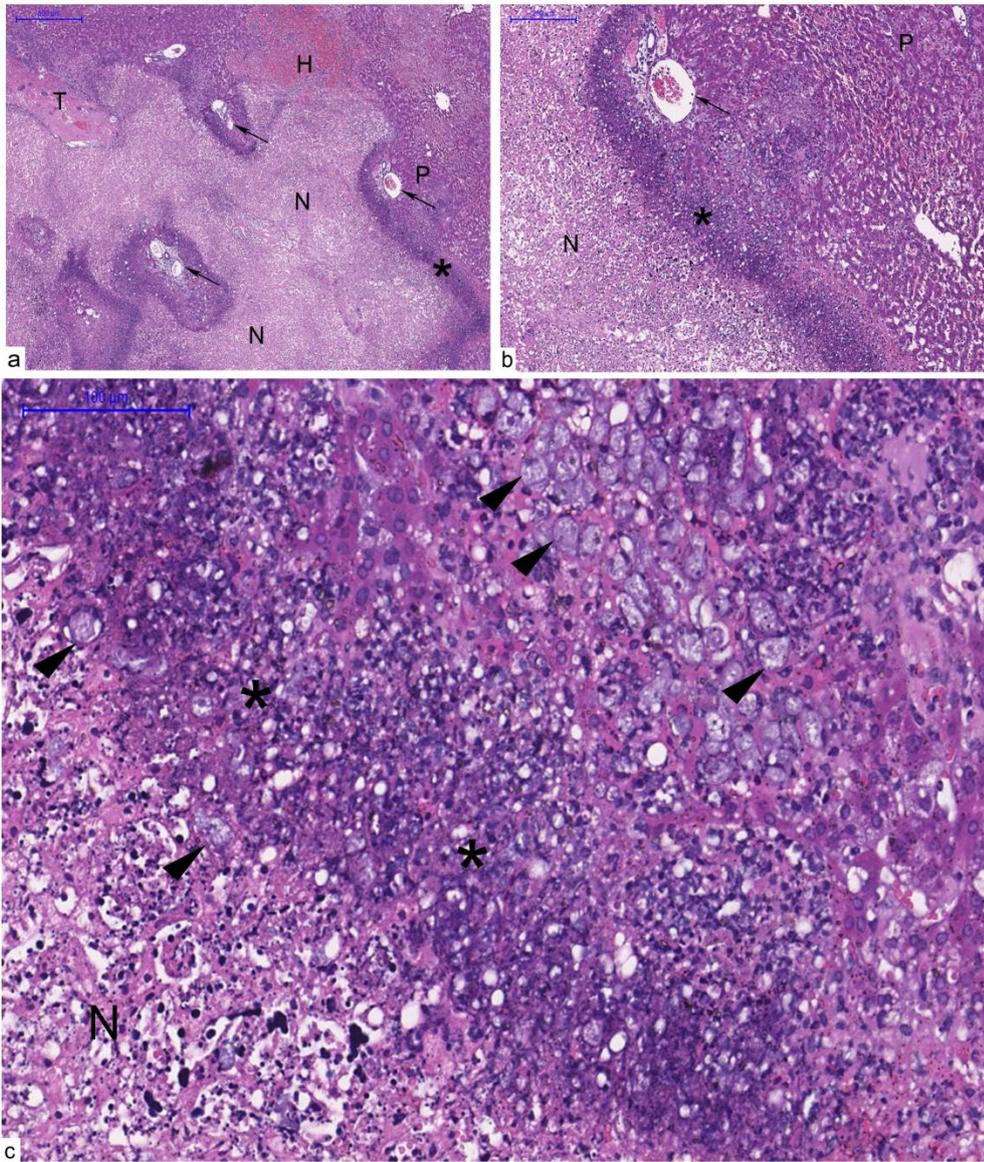


Figura 5 - Fígado de hamsters inoculados com a *Entamoeba dispar* da cepa MCR e eutanasiados 12 dias após a infecção (DAI): a) Necrose de liquefação (N) circunscrita por áreas basofílicas constituídas por debris celulares (*). Zona de hemorragia (H) e trombo venoso (T). Parênquima hepático não necrosado (P). Espaços porta (setas). Hematoxilina & Eosina (H&E). Barra = 500μm; b) Maior aumento da figura anterior evidenciando a área de debris celulares (*) que circunda a zona de necrose (N). Parênquima hepático não necrosado (P). Espaço porta (seta). H&E. Barra = 200μm; c) Maior aumento da figura anterior evidenciando a presença de grande número de trofozoítos (cabeças de seta) às margens da zona de debris celulares (*) e também junto à área de necrose (N). H&E. Barra = 100μm.

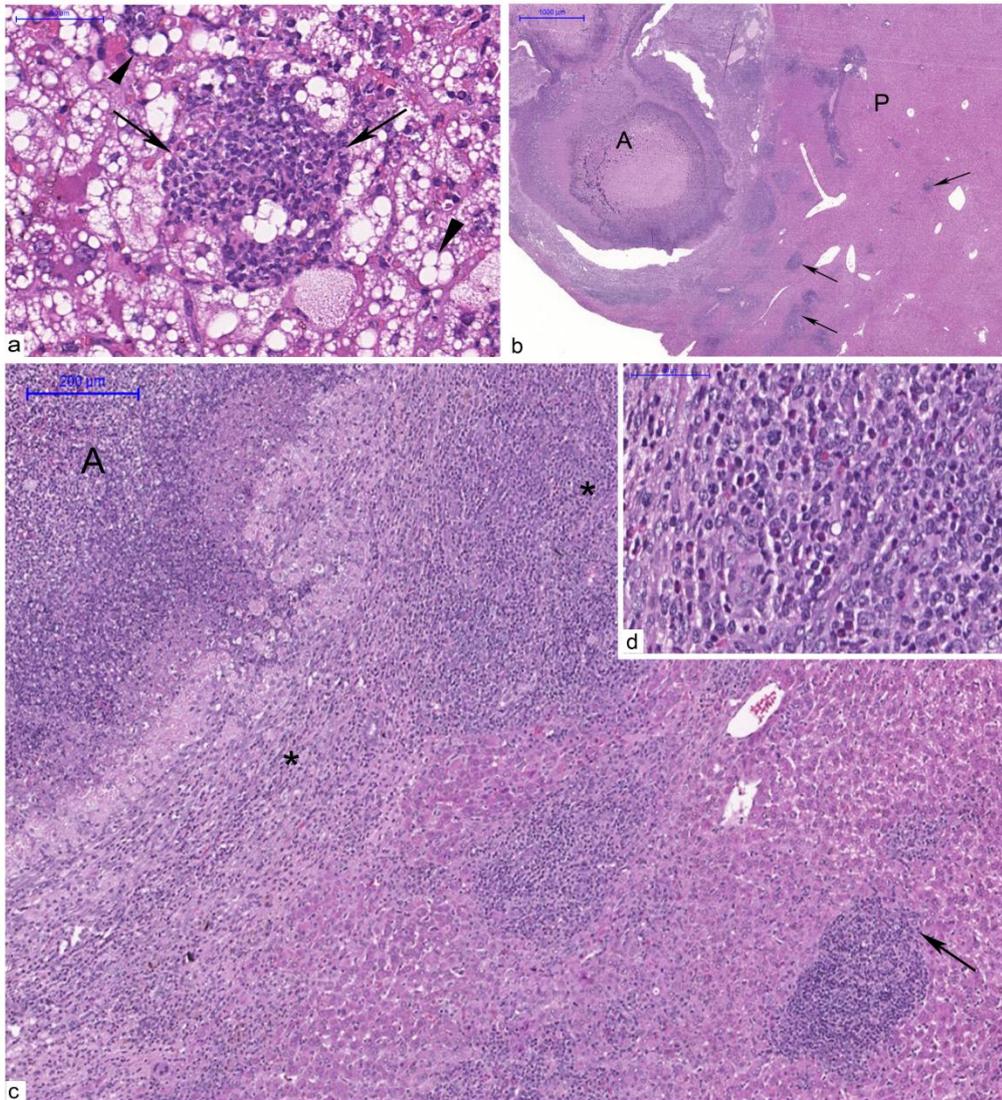


Figura 6 - Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar*. a) Inóculo com a cepa MCR. Eutanásia com 12 dias após a infecção (DAI). Microabscesso (setas) e hepatócitos aumentados de volume, com vacúolos citoplasmáticos claros e núcleo empurrado para a periferia, caracterizando esteatose hepática (cabeças de seta). Hematoxilina & Eosina (H&E). Barra = 50µm; b) Inóculo com a cepa ICS, 8 DAI. Focos inflamatórios (setas) próximos a abscesso hepático amebiano - AHA (A). Parênquima hepático não necrosado (P). H&E. Barra = 1000µm; c) Maior aumento da figura anterior mostrando abscesso hepático amebiano (A), áreas de inflamação difusa (*) e focal (seta). H&E. Barra = 200µm; d) Maior aumento da figura anterior mostrando área de inflamação difusa, caracterizada por infiltrado inflamatório misto, constituído por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos. H&E. Barra = 50µm.

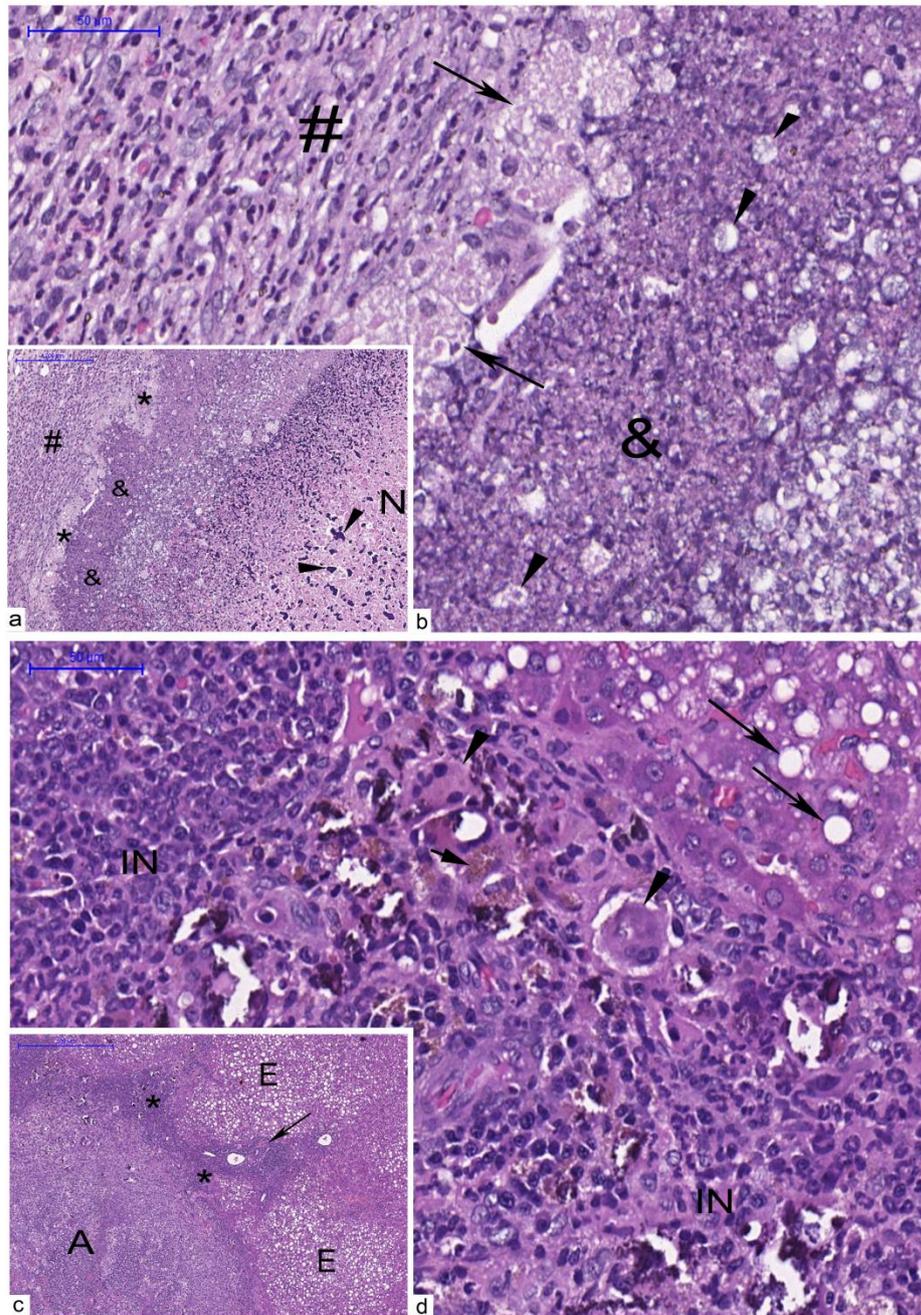


Figura 7 - Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar* e eutanasiado 8 dias após a infecção (DAI): a) Inóculo com a cepa ICS. Granuloma composto por zona central de necrose de liquefação (N) e áreas de calcificação (cabeças de seta), envolto por debris celulares (&), grande número de trofozoítos (setas) e paliçada de macrófagos xantomizados (*). Externamente, infiltrado inflamatório (#) envolve a paliçada de macrófagos. H&E. Barra = 200µm; b) Maior aumento da figura anterior mostrando o infiltrado inflamatório misto (#) composto por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, paliçada de macrófagos xantomizados (setas) e debris celulares (&) com grande número de trofozoítos (cabeças de seta). H&E Barra = 50µm; c) AHA (A) produzido pela cepa ADO, circunscrito por infiltrado inflamatório (*). Nota-se ainda a presença de zonas de esteatose hepática (E). Espaço porta (seta). H&E. Barra = 500µm; d) Maior aumento da figura anterior mostrando inflamação crônica granulomatosa cujo infiltrado inflamatório (IN) é constituído por células gigantes (cabeças de seta), às vezes contendo em seu interior material granuloso e basofílico fagocitado, tratando-se de calcificação e, neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Nota-se a presença de hepatócitos aumentados de volume e com vacúolos citoplasmáticos, caracterizando esteatose hepática (setas). Macrófagos com hemossiderina (seta curta). H&E. Barra = 50µm.

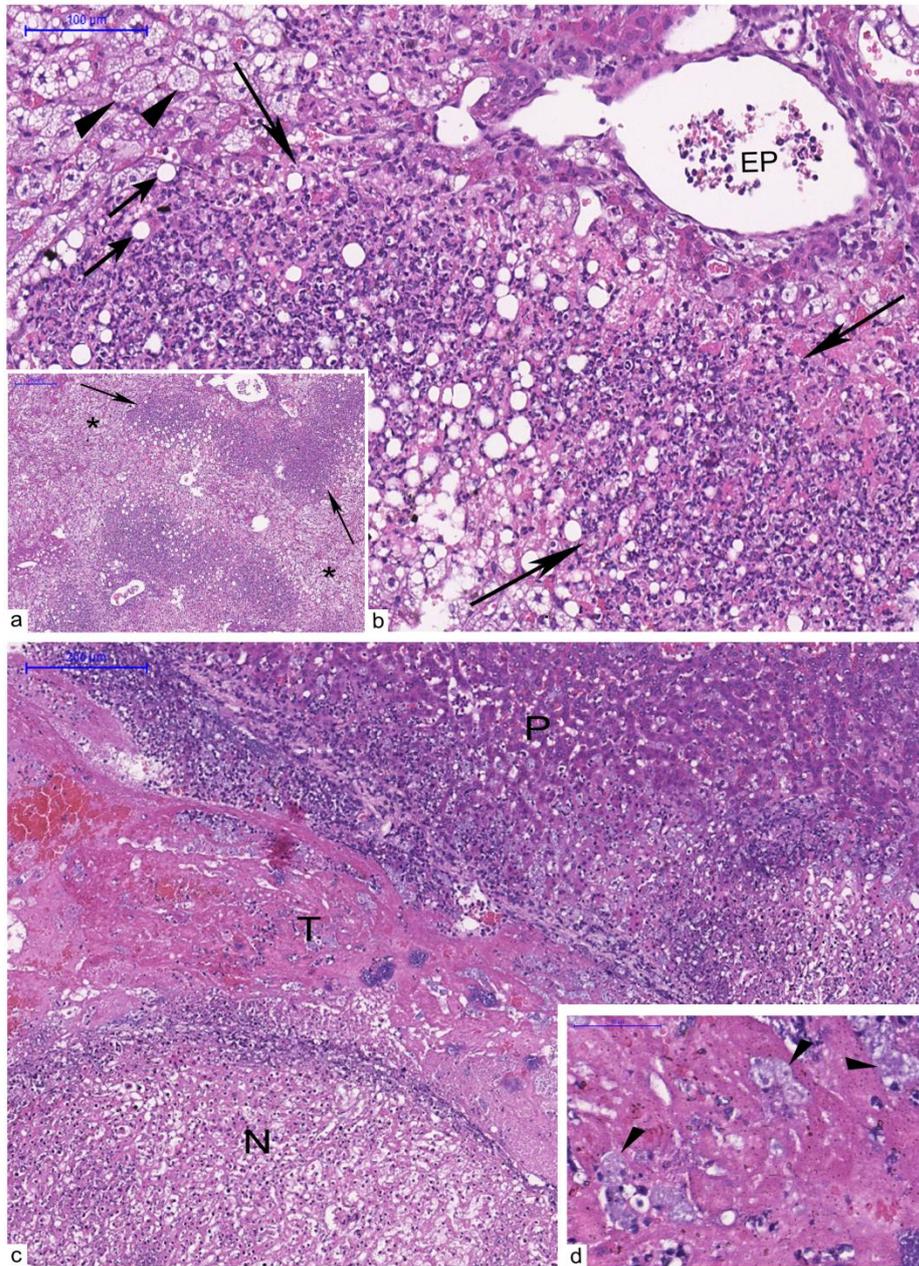


Figura 8 - Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar* da cepa MCR e eutanasiado 12 dias após a infecção (DAI): a) Parênquima hepático mostrando extensas áreas de degeneração (*). Focos necrótico-inflamatórios originando necrose em ponte (setas). Hematoxilina & Eosina (H&E). Barra = 200 μm; b) Maior aumento da figura anterior mostrando grande quantidade de hepatócitos com degeneração hidrópica (cabeças de seta) e esteatose (setas curta). Focos necrótico-inflamatórios originando necrose em ponte (setas). H&E. Barra = 100μm; c) Ver panorâmica desta imagem na figura 2d. Trombo venoso, misto e parietal (T) junto à zona de necrose de liquefação (N). Parênquima hepático não necrosado (P). H&E. Barra = 200μm; d) Maior aumento da figura anterior mostrando detalhes do trombo. Vários trofozoítos (cabeças de seta) em meio à rede de fibrina (*). H&E. Barra = 50μm.

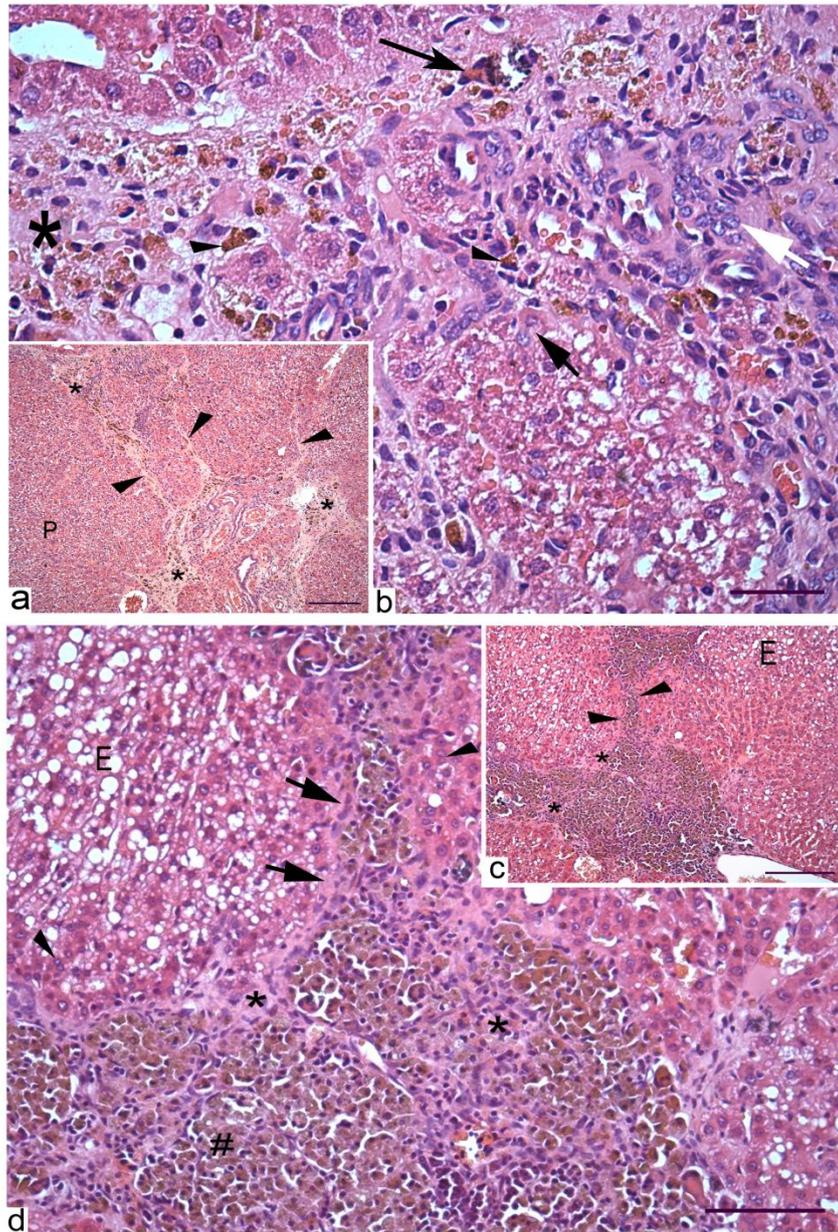


Figura 9: Fígado de hamster inoculado com a *Entamoeba dispar*: a) Inóculo com a cepa VEJ, 16 DAI. Fibrose portal (*) caracterizada por pequeno alargamento do espaço portal, de aspecto estrelado, com emissão de delgados e curtos septos fibrosos (cabeças de seta). Parênquima hepático não necrosado (P). Hematoxilina e Eosina (H&E). Barra = 100µm; b) Maior aumento da figura anterior mostrando a fibrose portal com pequeno alargamento do espaço portal (*). Hepatócito (seta curta) e epitélio ductal (seta branca) em atividade regenerativa. Célula gigante (seta), com material calcificado fagocitado e, macrófagos com hemossiderose (cabeças de seta). (H&E). Barra = 20µm; c) Inóculo com a cepa ADO, 8 DAI. Alargamento fibroso do espaço portal (*) com formação de septos que ligam os tratos portais entre si (cabeças de seta). (H&E). Barra = 100µm; d) Maior aumento da figura anterior mostrando detalhes do alargamento fibroso do espaço porta (*), com formação de septos fibrosos (setas curtas). Muitos hepatócitos com atividade regenerativa (cabeças de seta). Esteatose hepática (E) e grande número de macrófagos com hemossiderose (#). (H&E). Barra = 50µm