

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

César Augusto Vilela da Silva

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DE CEPAS DE**  
***Entamoeba dispar* ASSOCIADAS COM A *Escherichia coli***  
**ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) SOBRE O ABSCESSO HEPÁTICO AMEBIANO:**  
**ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Belo Horizonte

2022

Cézar Augusto Vilela da Silva

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DE CEPAS DE  
*Entamoeba dispar* ASSOCIADAS COM A *Escherichia coli*  
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) SOBRE O ABSCESSO HEPÁTICO AMEBIANO:  
ESTUDO *IN VITRO* E *IN VIVO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia - Área de concentração em Patologia Investigativa.

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari (UFMG)

Coorientador:

Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira  
(Fundação Oswaldo Cruz-MG)

Belo Horizonte  
2022

043

Silva, César Augusto Vilela da.

Avaliação da virulência e da patogenicidade de cepas de Entamoeba dispar associadas com a Escherichia coli Enteropatogênica (EPEC) sobre o abscesso hepático amebiano: estudo in vitro e in vivo [manuscrito] / César Augusto Vilela da Silva. – 2022.

129 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliar. Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira.

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

1. Patologia. 2. Entamoeba. 3. Abscesso Hepático Amebiano. 4. Virulência. 5. Escherichia coli Enteropatogênica. I. Caliar, Marcelo Vidigal. II. Oliveira, Fabrício Marcus Silva. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

### FOLHA DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA E DA PATOGENICIDADE DE CEPAS DE ENTAMOEBA DISPAR ASSOCIADAS COM A ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) SOBRE O ABSCESSO HEPÁTICO AMEBIANO: ESTUDO IN VITRO E IN VIVO”**

**CÉZAR AUGUSTO VILELA DA SILVA**

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

Aprovada em 15 de dezembro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

**Dr. Agostinho Goncalves Viana - EMPRESA SAFETEST**  
**Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima - ICEB/UFOP**  
**Profa. Dra. Annamaria Ravara Vago – ICB/UFMG**  
**Profa. Dra. Milene Alvarenga Rachid, ICB/UFMG**  
**Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira, FIOCRUZ/MG - COORIENTADOR**  
**Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliarí, ICB/UFMG – ORIENTADOR**

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Agostinho Gonçalves Viana, Usuário Externo**, em 05/01/2023, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a)**, em 05/01/2023, às 16:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Wanderson Geraldo de Lima, Usuário Externo**, em 06/01/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício Marcus Silva Oliveira, Usuário Externo**, em 06/01/2023, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Vidigal Caliarí, Professor do Magistério Superior**, em 09/01/2023, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).





Documento assinado eletronicamente por **Annamaria Ravara Vago, Chefe de departamento**, em 09/01/2023, às 19:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2004099** e o código CRC **D8C61907**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me guiou em meio a tantos desafios.

À minha mãe e avó, que não estão mais aqui, mas que de longe me deram forças para continuar.

Ao meu Amor Iago, por toda a paciência, amizade, companheirismo e suporte.

Aos Profs. Dr. Marcelo Vidigal Caliarí e Dra. Maria Aparecida Gomes, pela oportunidade, paciência, e por todos os ensinamentos, sejam eles pessoais ou profissionais.

Ao Prof. Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira, pela orientação e, sobretudo, a amizade, que vai além dos muros da UFMG.

À minha amiga Ruth, que nunca mediu esforços para me ajudar, e que tornou os meus dias mais alegres e a caminhada menos tortuosa.

Ao Joãozinho e Edna, que me ensinaram a maioria das técnicas para se trabalhar com amebíase, e ao Carlos do Biotério da Parasitologia/ICB, que sempre se mostrou solícito em ajudar, a qualquer momento.

Ao César Santana por toda a ajuda e suporte, de suma importância para a finalização do projeto.

Aos ICs Carlos, Mariana e Eduardo, por toda a ajuda oferecida.

Minhas amigas Lucélia e Izabela Gontijo, que mesmo de longe me apoiaram em todos os momentos e que são exemplos de profissionalismo e de amizade.

À minha amiga Helena, que se tornou uma irmã e que de forma incondicional sempre me apoiou e me incentivou, além de me ajudar no pior momento da minha vida.

Ao meu amigo Ailton, me apoiou e me incentivou à busca de todos os meus objetivos.

À minha amiga Eliana, que chegou e se tornou um verdadeiro elo de amizade, obrigado por todos os momentos de confiança!

À minha eterna chefe Ingrid Paulsen, por ensinamentos que sigo para a vida.

Aos meus amigos da Universidade FUMEC por todo o apoio e suporte, em especial a minhas amigas Ana Paula, Patrícia, Jussara e Adriana, que além da amizade me ajudaram em diversos momentos.

A todos os meus colaboradores: Cidinha, Karen Costa, Lucas Teixeira, Patrícia Costa, Camila de Almeida, Elizabeth Neumann e Álvaro Cantini.

**RESUMO:** A amebíase é considerada a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias no mundo. A *Entamoeba dispar* está relacionada aos casos assintomáticos, mas já foi isolada de pacientes portadores de colite não-disentérica e abscesso hepático amebiano (AHA). Bactérias são capazes de potencializar a virulência de cepas de *E. dispar* e, a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é causa importante de diarreia. Não há estudos que avaliam a influência desta bactéria sobre a virulência e patogenicidade das cepas de *E. dispar*. Foi objetivo deste trabalho avaliar a influência da EPEC sobre a virulência e a patogenicidade de cepas de *E. dispar*. Foram utilizadas as cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar*, divididas em dois grupos: ameba e ameba+bactéria. Nos grupos associados foram adicionadas à cultura de trofozoítos  $1 \times 10^6$  UFCs de EPEC. Foi realizado o ensaio de eritrofagocitose dos grupos ACFN e ACFN-EPEC. Foi realizado rt-qPCR para análise da expressão gênica dos fatores de virulência: lectina ligante de Galactose e N-acetil-d-galactosamina (Gal/GalNAc), cisteína proteinase 2 (CP2), amebaporo A (APA) e amebaporo C (APC) das cepas ACFN, ADO e VEJ, associadas ou não à EPEC. Para cada grupo foram inoculados oito hamsters com as cepas ACFN e ADO, associadas ou não à EPEC, cada um com  $1 \times 10^5$  trofozoítos, no lobo esquerdo do fígado. Os hamsters foram eutanasiados e necropsiados no quarto dia após a infecção e o lobo hepático inoculado foi coletado para análise por rt-qPCR da expressão dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2, APA e APC, determinação bioquímica da atividade de mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) e eosinófilos peroxidase (EPO) e, morfometria digital das lesões. A interação da EPEC à cepa ACFN não foi capaz de aumentar a sua capacidade de eritrofagocitose, mas aumentou *in vitro* e *in vivo* a expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc e *in vivo* da CP2, a área de necrose hepática e a atividade de MPO, NAG e EPO. A interação da EPEC à cepa ADO diminuiu a expressão de CP2 *in vitro* e não foi capaz de aumentar a expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc e da CP2 *in vivo*, bem como a área da necrose e a atividade de MPO e EPO. Contudo, tal interação foi capaz de diminuir a atividade de NAG. A interação da EPEC à cepa VEJ não foi capaz de aumentar a expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc e da CP2 *in vitro*. APA não foi expressa em nenhuma das cepas avaliadas e não houve diferença da expressão de APC entre nenhum dos grupos. Nosso estudo demonstrou que a EPEC foi capaz de influenciar de maneiras diferentes a virulência e patogenicidade de distintas cepas de *E. dispar*.

**Palavras-chave:** *Entamoeba dispar*. Abscesso hepático amebiano. Virulência. Patogenicidade. *Escherichia coli* enteropatogênica.

**ABSTRACT:** Amebiasis is considered the second leading cause of death from parasitic diseases in the world. *Entamoeba dispar* is related to asymptomatic cases but has already been isolated from patients with non-dysenteric colitis and amoebic liver abscess (AHA). Bacteria can potentiate the virulence of *E. dispar* strains, and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important cause of diarrhea. There are no studies evaluating the influence of this bacterium on the virulence and pathogenicity of *E. dispar* strains. The objective of this work was to evaluate the influence of EPEC on the virulence and pathogenicity of *E. dispar* strains. The ACFN, ADO and VEJ strains of *E. dispar* were used, divided into two groups: amoeba and amoeba+bacteria. In the associated groups,  $1 \times 10^6$  CFUs of EPEC were added to the trophozoite culture. The erythrophagocytosis assay of the ACFN and ACFN-EPEC groups was performed. rt-qPCR was performed to analyze the gene expression of the virulence factors: Galactose and N-acetyl-d-galactosamine binding lectin (Gal/GalNAc), cysteine proteinase 2 (CP2), amoebapore A (APA) and amoebapore C (APC) of the ACFN, ADO and VEJ strains, associated or not with EPEC. For each group, eight hamsters were inoculated with the ACFN and ADO strains, associated or not with EPEC, each with  $1 \times 10^5$  trophozoites, in the left lobe of the liver. The hamsters were euthanized and necropsied on the fourth day after infection and the inoculated hepatic lobe was collected for rt-qPCR analysis of the expression of the virulence factors lectin-binding Gal/GalNAc, CP2, APA and APC, biochemical determination of myeloperoxidase activity (MPO), N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) and eosinophil peroxidase (EPO) and digital morphometry of the lesions. The interaction of EPEC with the ACFN strain was not able to increase its erythrophagocytosis capacity, but it increased in vitro and in vivo the expression of the Gal/GalNAc-binding lectin and in vivo of CP2, the area of hepatic necrosis and the activity of MPO, NAG and EPO. The interaction of EPEC with the ADO strain decreased the expression of CP2 in vitro and was not able to increase the expression of the Gal/GalNAc-binding lectin and CP2 in vivo, as well as the area of necrosis and the activity of MPO and EPO. However, such interaction was able to decrease NAG activity. The interaction of EPEC with the VEJ strain was not able to increase the expression of the Gal/GalNAc binding lectin and CP2 in vitro. APA was not expressed in any of the evaluated strains and there was no difference in APC expression between any of the groups. Our study demonstrated that EPEC was

able to influence in different ways the virulence and pathogenicity of different strains of *E. dispar*.

**Keywords:** *Entamoeba dispar*. Amoebic liver abscess. Virulence. Pathogenicity. Enteropathogenic *Escherichia coli*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico da <i>Entamoeba</i> sp.....	24
<b>Figura 2:</b> Delineamento experimental das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> .....	40
<b>Figura 3:</b> Delineamento da experimentação animal .....	42
<b>Figura 4:</b> Abscesso hepático amebiano (AHA) de hamster inoculado com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> , associados ou não à EPEC .....	59
<b>Figura 5:</b> Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com a cepa ACFN de <i>E. dispar</i> , associados ou não com a EPEC .....	61
<b>Figura 6:</b> Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com a cepa ADO de <i>E. dispar</i> , associados ou não com a EPEC .....	62
<b>Figura 7:</b> Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> , associados ou não com a EPEC .....	65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Genes utilizados na qPCR e sequência dos primers .....	45 e 46
<b>Tabela 2:</b> Análise semi-quantitativa da inflamação e do parasitismo .....	63



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Eritrofagocitose da cepa ACFN de <i>Entamoeba dispar</i> associada ou não com a <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica .....	51
<b>Gráfico 2:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>Entamoeba dispar</i> .....	52
<b>Gráfico 3:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência cisteína proteinase 2 (CP2) das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>Entamoeba dispar</i> .....	53
<b>Gráfico 4:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência amebaporo C (APC) das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>Entamoeba dispar</i> .....	54
<b>Gráfico 5:</b> Comparação da expressão relativa gênica dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, cisteína proteinase 2 (CP2) e amebaporo C (APC) entre as cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>Entamoeba dispar</i> .....	55
<b>Gráfico 6:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> no fígado de hamster .....	56
<b>Gráfico 7:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência cisteína proteinase 2 (CP2) das cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> no fígado de hamster.....	57
<b>Gráfico 8:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência amebaporo C (APC) das cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> no fígado de hamster .....	58
<b>Gráfico 9:</b> Efeito da associação in vitro da <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) com as cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> sobre a inflamação e parasitismo hepáticos.....	64
<b>Gráfico 10:</b> Área de necrose produzida pelas cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> em associação ou não à EPEC .....	66

<b>Gráfico 11:</b> Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) da cepa ACFN de <i>Entamoeba dispar</i> em associação ou não à <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) .....	67
<b>Gráfico 12:</b> Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) da cepa ADO de <i>Entamoeba dispar</i> em associação ou não à <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC) .....	68
<b>Gráfico 13:</b> Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) entre as cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> .....	69
<b>Gráfico 14:</b> Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) para as cepas ACFN e ADO de <i>Entamoeba dispar</i> .....	70
<b>Gráfico 15:</b> Análise de correlação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) com a área de necrose dos grupos ACFN e ACFN-EPEC.....	71

## LISTA DE ABREVIÇÕES

- AHA – Abscesso Hepático Amebiano  
APA – Amebaporo A  
APC – Amebaporo C  
COX-2 – Cicloxigenase 2  
CP – Cisteína proteinase  
*E. dispar* – *Entamoeba dispar*  
*E. histolytica* – *Entamoeba histolytica*  
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica  
EPO – Peroxidase de eosinófilos  
Gal/GalNAc – Galactose e N-acetilgalactosamina  
GPI – Glicosilfosfatidilinositol  
IFN $\gamma$  – Interferon-gamma  
IgA – Imunoglobulina A  
IgG – Imunoglobulina G  
IL – Interleucina  
iNOS – Óxido nítrico sintetase induzível  
LPG – Lipofosfoglicanos  
LPPG – Lipofosfopeptideoglicano  
MAP – Fosfatase ácida de membrana  
MPO – Mieloperoxidase  
NAG – N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase  
NF $\kappa$ B – Fator nuclear Kappa B  
OPAS – Organização Pan Americana de Saúde  
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos  
Pb – Pares de bases  
PTPases – Proteínas tirosinas fosfatases  
qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa  
RT – Transcriptase reversa  
SAP – Fosfatase ácida secretada  
SEM – Erro padrão da média  
TGF $\beta$  – Fator de crescimento transformante beta

TLR2 – *Toll like receptor 2*

TLR4 – *Toll like receptor 4*

TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	19
1.1 QUADRO CLÍNICO DA AMEBÍASE .....	20
1.2 EPIDEMIOLOGIA .....	21
1.3 CICLO BIOLÓGICO E PATOGÊNESE.....	23
1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA .....	24
1.4.1 Lectina ligante de Gal/GalNAc.....	25
1.4.2 Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptideoglicanos.....	26
1.4.3 Amebaporos .....	27
1.4.4 Cisteína proteinases .....	28
1.4.5 Fosfatase ácida de membrana e fosfatase ácida secretada.....	29
1.5 IMUNIDADE .....	30
1.6 ABSCESSO HEPÁTICO AMEBIANO (AHA) .....	32
1.7 SIMBIOSE ENTRE ORGANISMOS .....	34
1.8 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica .....	35
2 JUSTIFICATIVA .....	38
3 OBJETIVOS .....	39
3.1 Objetivo geral: .....	39
3.2 Objetivos específicos:.....	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Cepas de <i>Entamoeba dispar</i> .....	40
4.2 Cepa de bactéria .....	40
4.3 Culturas de trofozoítos de <i>E. dispar</i> em associação com a EPEC .....	40
4.4 Ensaio <i>in vitro</i> de eritrofagocitose.....	41
4.5 Experimentação animal .....	41
4.5.1 Animais utilizados e grupos experimentais .....	41
4.5.2 Anestesia e inoculação.....	42
4.5.3 Necropsia, análise macroscópica e coleta do fígado.....	42
4.6 Determinação da expressão de RNAm dos fatores de virulência e das citocinas ...	43
4.6.1 Extração do RNA total dos fatores de virulência e de citocinas hepáticas .....	43
4.6.2 Síntese de cDNA à partir do mRNA de <i>E. dispar</i> e do fígado de hamsters.....	44

4.6.3 Padronização das reações de RT-qPCR com iniciadores para fatores de virulência de <i>E. dispar</i> e citocinas de hamsters.....	44
4.6.4 Quantificação relativa da expressão dos fatores de virulência de <i>E. dispar</i> e citocinas de hamsters.....	47
4.7 Processamento e análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica das lesões hepáticas.....	47
4.8 Quantificação da atividade enzimática de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no homogenato de fígado.....	48
4.9 Análises estatísticas .....	49
5 RESULTADOS .....	51
5.1 Ensaio de eritrofagocitose da cepa ACFN de <i>E. dispar</i> em associação à EPEC ....	51
5.2 Expressão relativa dos fatores de virulência amebianos lectina ligante de Gal/GalNac, CP2, APA e APC de culturas das cepas ACFN, ADO e VEJ associadas à EPEC.....	51
5.2.1 Expressão relativa <i>in vitro</i> do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNac das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC .....	52
5.2.2 Expressão relativa <i>in vitro</i> do fator de virulência CP2 das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> associadas à EPEC.....	53
5.2.3 Expressão relativa <i>in vitro</i> dos fatores de virulência APA e APC das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> associadas à EPEC.....	54
5.2.4 Comparação da expressão relativa <i>in vitro</i> dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNac, CP2 e APC das cepas ACFN, ADO e VEJ de <i>E. dispar</i> .....	55
5.3 Expressão relativa dos fatores de virulência amebianos lectina ligante de Gal/GalNac, CP2, APA e APC no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC .....	56
5.3.1 Expressão relativa do fator de virulência amebiano lectina ligante de Gal/GalNac no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC.....	56
5.3.2 Expressão relativa do fator de virulência amebiano de cisteína proteinase 2 (CP2) no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC.....	57
5.3.3 Expressão relativa dos fatores de virulência amebiano amebaporo A e C (APA e APC) no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC.....	57

5.4 Análise macroscópica do fígado de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> , associadas ou não à EPEC .....	58
5.5 Análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica do AHA induzido pelas cepas ACFN e ADO, associadas ou não à EPEC .....	59
5.6 Atividade de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC .....	66
5.7 Comparação da atividade de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> .....	68
5.8 Comparação entre as atividades de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> .....	69
5.9 Análise de correlação entre a atividade de MPO e a área de necrose no grupo ACFN	71
5.10 Expressão relativa das citocinas IL-5, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ e TGF- $\beta$ do fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de <i>E. dispar</i> associadas ou não à EPEC.	71
6 DISCUSSÃO .....	72
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	84
8 REFERÊNCIAS .....	85
9 APÊNDICE .....	96
9.1 Artigo 96	

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As doenças diarreicas são a segunda principal causa de morte em crianças menores de 5 anos, responsáveis por cerca 1,7 bilhão de casos ao ano e 525.000 óbitos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). No Brasil, 80% das crianças acometidas por essas doenças são menores de um ano. A região Norte possui o maior número de casos e as doenças diarreicas ocupam o 8º lugar nas causas de mortalidade infantil (FONTOURA et al., 2018).

A amebíase, doença provocada pela *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*), é a mais grave provocada por protozoário que atinge o intestino. A *E. histolytica* é responsável pelo desenvolvimento de duas importantes síndromes clínicas: a colite amebiana e o abscesso hepático amebiano (AHA) (STANLEY, 2003). Além de ser uma doença de ampla distribuição geográfica, a amebíase apresenta alta incidência e capacidade de desenvolver quadros graves e fatais. A doença continua sendo considerada um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (HUSTON, 2004).

A *E. histolytica* foi descrita por Lösh há mais de 130 anos (1875, citado por Jackson, 1998). Entretanto, só foi reconhecida como espécie em 1903, por Schaudinn (1903, citado por Clark, 1998). Em 1925, para explicar a alta prevalência de indivíduos assintomáticos, Brumpt propôs a teoria dualista, onde reconhecia a existência de duas espécies de mesma morfologia, entretanto de aspectos biológicos diferentes (BRUMPT, 1925). A *E. histolytica* foi considerada como a única capaz de invadir o epitélio intestinal humano e também de se disseminar para outros locais, provocando a amebíase extra-intestinal. A espécie foi segregada em dois grupos distintos, *E. histolytica* patogênica e não-patogênica, com base na avaliação do perfil de isoenzimas e dos sinais clínicos dos pacientes ao qual foram isoladas (SARGEANT; WILLIAMS; GRENE, 1978). Posteriormente, análises gênicas dos dois grupos clinicamente distintos demonstraram a existência de duas espécies, comprovando então a teoria dualista de Brumpt (DIAMOND; CLARK, 1993). A espécie relacionada aos casos assintomáticos foi denominada de *Entamoeba dispar* (*E. dispar*) e só foi reconhecida pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) em 1997, após análises de isoenzimas, utilização de anticorpos monoclonais e das diferenças genéticas encontradas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1997).



Apesar de ser considerada uma espécie não invasiva, a *E. dispar* já foi isolada de pacientes que apresentavam colite não disentérica (COSTA et al., 2000) e sequências do seu DNA foram detectadas por técnicas de biologia molecular em amostras de pacientes portadores do AHA (XIMÉNEZ et al., 2010). Além disso, alguns estudos também mostram que esta espécie também poderia ser capaz de produzir amebíase sintomática humana, tanto no intestino grosso (GRAFFEO et al., 2014), como no fígado (XIMÉNEZ et al., 2010). A *E. dispar* foi isolada de pacientes com abscesso hepático misto (amebiano e piogênico), amebiano (Juntamente com a *E. histolytica*) e piogênico. Além disso foi observado em amostras de abscessos hepáticos e de cepas de *E. dispar* uma grande variabilidade genética, sugerindo possíveis recombinações, diferenciações gênicas ou até mesmo seleção diferencial para a espécie (XIMÉNEZ et al., 2010).

Os principais produtos amebianos relacionados com a virulência da *E. histolytica* e *E. dispar* são: a lectina ligante de galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) (STANLEY, 2003), as amebaporos (proteínas geradoras de poros) (LEIPPE, 1995) e as enzimas cisteína proteinases (QUE; REED, 1997). Os fatores de virulência contribuem para a sobrevivência da espécie em seu hospedeiro e para o desenvolvimento de lesões, por possibilitarem a invasão tecidual.

## 1.1 QUADRO CLÍNICO DA AMEBÍASE

Muitos indivíduos infectados são assintomáticos e pode haver cura espontânea sem o aparecimento dos sinais clínicos da amebíase. De 4 à 10% dos pacientes desenvolvem sintomatologia após um ano de infecção. Os principais sinais e sintomas da colite amebiana são: diarreia sanguinolenta profusa, dor abdominal generalizada, leucocitose e febre (STANLEY, 2003). As características clínicas da colite amebiana podem se assemelhar às da doença inflamatória intestinal, entretanto, exames de colonoscopia acompanhado de biópsia são úteis ao diagnóstico, pois se observam as úlceras de formato irregular e erosões eritematosas (YUE et al., 2021). Em quadros mais graves, o indivíduo pode apresentar íleo paralítico, perfuração intestinal ou até mesmo amebomas, que são massas anulares de tecido de granulação que se desenvolvem no ceco ou cólon e que se assemelham à uma neoplasia (STANLEY, 2003).

O quadro clínico de pacientes portadores do AHA consiste em anorexia, perda de peso, dor no quadrante superior direito, febre e sensibilidade hepática substancial (STANLEY, 2003). Em casos mais graves pode haver ruptura do AHA, desenvolvimento de fístula broncopulmonar e distúrbios hemodinâmicos, como edema e ascite (ALAM et al., 2014). A icterícia é um achado incomum. Dentre os achados laboratoriais mais comuns, destaca-se a leucocitose, discreta anemia, elevação das enzimas hepáticas fosfatases e aumento do volume de hemossedimentação (STANLEY, 2003).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

Os dados epidemiológicos da amebíase permanecem obscuros devido a falhas diagnósticas, como a distinção entre as espécies do gênero *Entamoeba* e também na diferenciação das cepas patogênicas e não patogênicas da *E. histolytica* (OTHMAN et al., 2020). A doença acomete cerca de 50 milhões de pessoas ao ano em todo mundo, com óbito de aproximadamente 100 mil delas (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 1997). Os continentes e países altamente endêmicos pela *E. histolytica* incluem a África, Índia e Bangladesh, Sudeste Asiático, Américas e Egito, com maior morbidade e mortalidade nas Américas Central e do Sul, África e Índia. As espécies de *Entamoeba* são mais prevalentes em áreas rurais com baixas condições socioeconômicas e saneamento básico, ao passo que para as áreas rurais a alta prevalência se dá pela falta das práticas de higiene pessoal (OTHMAN et al., 2020). Os avanços das técnicas moleculares permitiram identificações mais fidedignas para as espécies do gênero *Entamoeba*. Foi identificado que as cepas patogênicas da *E. histolytica* são menos prevalentes que as não-patogênicas, sendo responsáveis por 1 caso sintomático para cada 5 casos de infecção por *E. histolytica* (XIMÉNEZ et al., 2009).

Além da *E. histolytica*, outras espécies do gênero são encontradas no lúmen intestinal: *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. polecki* e *E. bangladeshi*. Recentemente, estudo realizado com a seleção de 110 trabalhos de 47 países para calcular a epidemiologia molecular do gênero *Entamoeba* evidenciou prevalência global da infecção humana pelo gênero de 3,55%, variando de 1,72% na Oceania à 21,58% na América do Norte (CUI et al., 2019). Mundialmente, a *E. dispar* foi a mais

prevalente (49,4%), seguida da *E. histolytica* (32,3%) e *E. moshkovskii* (10,2%) (LI et al., 2021).

No Brasil, a prevalência de amostras positivas para DNA e/ou presença de parasitos do gênero *Entamoeba* sp. é de 22%, sendo o estado com maior prevalência a Paraíba (72%), seguido pelo Distrito Federal (53%) e Rondônia (50%). Ainda em relação à prevalência dentro do gênero *Entamoeba*, a *E. dispar* apresenta maior índice que a *E. histolytica*, com porcentagens de 7,9% e 3,1%, respectivamente. Em pacientes imunodeficientes a prevalência foi de 18%, com o câncer representando a maior causa de imunossupressão (36%) (DOS SANTOS ZANETTI et al., 2021). A região Norte apresenta a maior prevalência de *E. dispar*, com 18,5%, seguido das regiões Nordeste, 13%, e Sudeste, 1,4%. Em comparação à *E. histolytica*, a *E. dispar* é mais prevalente no território brasileiro, com exceção da região Norte, onde a prevalência da *E. histolytica* chega a 28,9%. Na região Sudeste, os estados mais prevalentes para *E. dispar* são Minas Gerais e Rio de Janeiro, respectivamente (DOS SANTOS ZANETTI et al., 2021). Na região de Belo Horizonte, estudo parasitológico envolvendo laboratórios da rede pública e privada evidenciou uma prevalência da infecção por *E. histolytica/E. dispar* de 0,6%. Após a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR) das amostras positivas para *E. histolytica/E. dispar*, observou-se que 86,1% destas amostras se tratava da *E. dispar* (COSTA et al., 2018).

A amebíase extra-intestinal acomete menos de 1% dos pacientes com amebíase invasiva, sendo o AHA a principal manifestação clínica. Cerca de 80% dos pacientes desenvolvem sintomas rapidamente, dentro de duas a quatro semanas. O AHA é cerca de dez vezes mais comum em homens do que mulheres, e, raro em crianças (HAQUE et al., 2003), e os indivíduos entre os 40-50 anos são os mais acometidos (SALLES; MORAES; SALLES, 2003). Estudos evidenciam que a mortalidade pelo AHA podia chegar à 15%, mas com o diagnóstico e tratamento precoces, a taxa caiu para 1-3% (STANLEY, 2003). Embora os dados epidemiológicos do AHA sejam subestimados, sabe-se que a incidência varia entre as regiões do país, sendo incomum no Sul e mais prevalente na região Norte (SALLES; MORAES; SALLES, 2003).

### 1.3 CICLO BIOLÓGICO E PATOGÊNESE

A infecção se inicia através da ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos tetranucleados. Os cistos são redondos e possuem uma parede resistente que os protegem de condições desfavoráveis, como o pH ácido do estômago (OTHMAN et al., 2020). O processo de excistamento ocorre no lúmen do intestino delgado e dá origem a trofozoítos, que se multiplicam por divisão binária. Os trofozoítos são estruturas móveis, emitem pseudópodes e utilizam a lectina ligante de Gal/GalNAc para se conectarem à camada de mucina e colonizar o intestino grosso. Os trofozoítos são incapazes de sobreviver fora do hospedeiro e utilizam a lectina ligante de Gal/GalNAC para se encistar, e os cistos produzidos são excretados nas fezes, perpetuando o ciclo biológico pela via fecal-oral (Figura 1) (HAQUE et al., 2003; OTHMAN et al., 2020).

Contudo, a ligação dos trofozoítos à mucosa intestinal através da lectina de Gal/GalNAc é capaz de levar à atividade amebicida, provocando a morte das células epiteliais e leucócitos (principalmente neutrófilos e linfócitos), dando início à formação de úlceras, principal achado histopatológico da colite amebiana. Esta forma clínica da amebíase é representada por espessamento da mucosa por inflamação e edema, e, múltiplos focos de necrose (úlceras), podendo ocorrer perfuração intestinal (STANLEY, 2003). A secreção das amebaporos também contribuem para a atividade amebicida. Os trofozoítos podem se movimentar de forma lateral na submucosa, originando a clássica úlcera em formato de “botão de camisa” ou “frasco”. (HAQUE et al., 2003).

Após a invasão epitelial pelos trofozoítos ocorre a ativação imunitária, e o processo inflamatório agudo recruta neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, que também contribuem para o dano tecidual, através da liberação em excesso dos seus produtos tóxicos. A infecção amebiana pode se cronicar, pois os trofozoítos são capazes de evadir do sistema imune de diversas maneiras, como o impedimento da formação do complexo C5b-C9 do complemento, degradação das anafilotoxinas C3a e C5a, degradação das imunoglobulinas IgA e IgG, supressão da explosão respiratória dos macrófagos e da apresentação de antígenos (HAQUE et al., 2003).

A amebíase extra-intestinal é caracterizada pela presença de trofozoítos em outros órgãos que não o intestino, e é desenvolvida a partir da disseminação dos mesmos pela via hematogênica, sendo o principal sítio acometido o fígado.

(STANLEY, 2003). De fato, a penetração e o deslocamento dos trofozoítos nos tecidos humanos são dependentes dos fatores de virulência dos trofozoítos, como a lectina ligante de Gal/GalNAc, cisteína proteinases e as amebaporos (HAQUE et al., 2003; LEIPPE, 1995; QUE; REED, 1997; STANLEY, 2003).

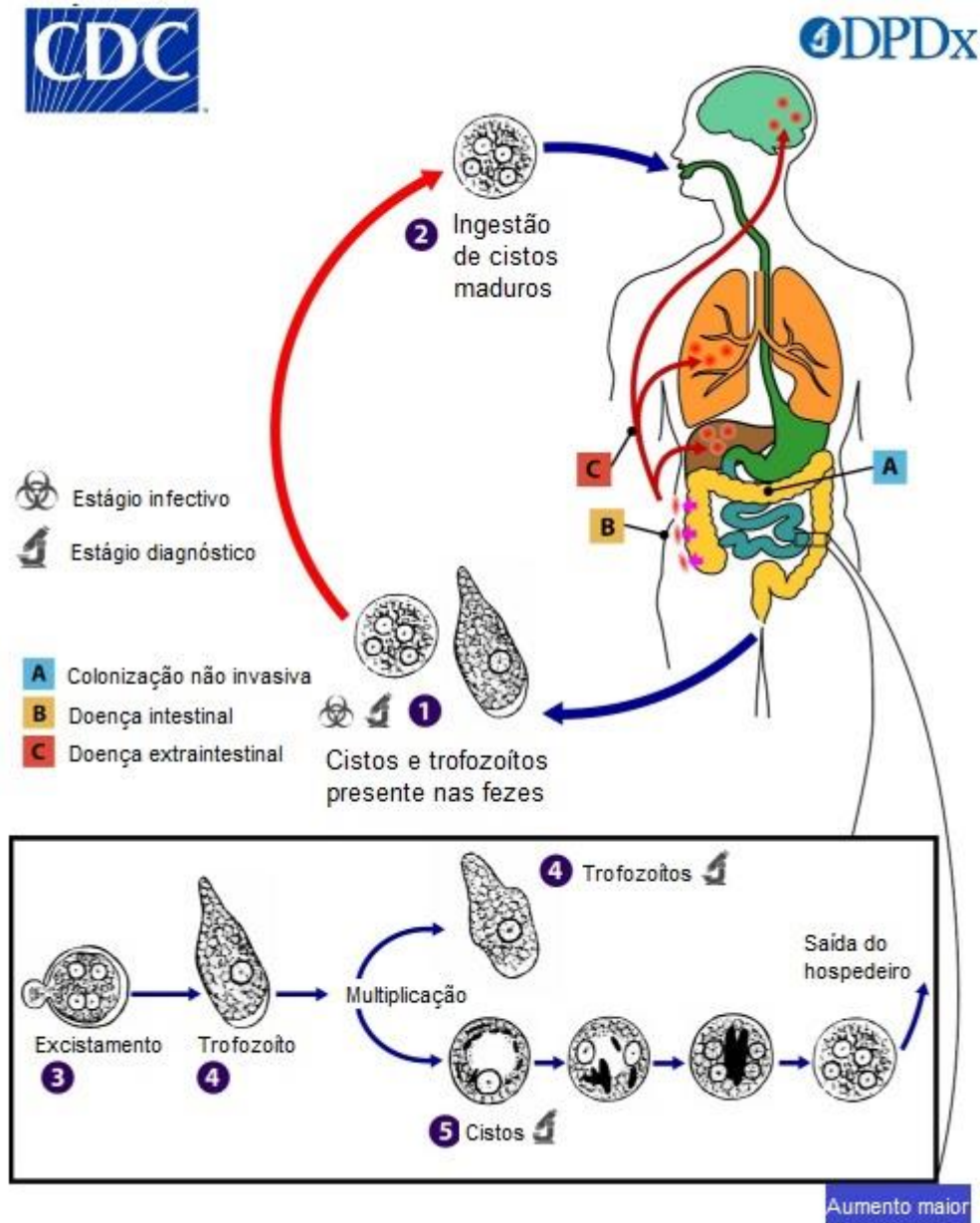


Figura 1: Ciclo biológico da *Entamoeba* sp. Adaptado de: CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION (2019).

#### 1.4 FATORES DE VIRULÊNCIA

Além dos fatores de virulência já mencionados, os trofozoítos são capazes de secretar lipofosfoglicanos, lipofosfopeptieoglicanos e fosfatases ácidas, que estão relacionadas ao desenvolvimento de lesões (AGUIRRE-GARCÍA; ANAYA-RUIZ;

TALAMÁS-ROHANA, 2003; HAQUE et al., 2003; LAUWAET et al., 2004; LEIPPE, 1995; MOODY et al., 1997a; QUE; REED, 1997; STANLEY, 2003).

#### 1.4.1 Lectina ligante de Gal/GalNAc

A lectina ligante de galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal/Gal/NAc) é utilizada pelos trofozoítos para a aderência ao muco, resultando na colonização do cólon. Além disso, a lectina também participa do processo de encistamento, responsável pela formação de cistos e consequente perpetuação da espécie (HAQUE et al., 2003). A adição de soluções de galactose e N-acetil-D-Galactosamina à culturas de trofozoítos é capaz de inibir em 90% a aderência dos mesmos à camada de mucina, reforçando que a lectina utiliza destes carboidratos para colonizar o intestino humano (PETRI; HAQUE; MANN, 2002). A lectina de Gal/GalNAc é um complexo composto por uma subunidade pesada de 170KDa (HgL) e uma leve de 31-35KDa (Lgl), sendo estas unidas por pontes dissulfeto e associadas a uma proteína de 150KDa (Igl). Tanto a *E. histolytica* quanto a *E. dispar* expressam a lectina ligante de Gal/GalNAc, porém a estrutura na *E. dispar* possui 86% de similaridade para as cadeias pesadas e 79% para as leves em relação à *E. histolytica* (MANN, 2002).

A lectina é capaz de externalizar a molécula de fosfatidilserina das hemácias, sendo reconhecidas e fagocitadas pelos trofozoítos. A *E. dispar*, quando comparada à *E. histolytica*, possui capacidade substancialmente menor de fagocitar eritrócitos, provavelmente devido à menor expressão e à diferenças na estrutura de suas lectinas. A eritrofagocitose é uma forma de avaliar a virulência das cepas, visto que são visualizados em pacientes portadores de abscesso hepático amebiano e colite amebiana inúmeros trofozoítos com hemácias internalizadas (BOETTNER et al., 2005).

A lectina ligante de Gal/GalNAc tem papel citotóxico: durante a interação dos trofozoítos com as células do hospedeiro ocorre a transferência da lectina para estas células, precedendo a morte delas. A lectina é observada na superfície lateral de células epiteliais do hospedeiro cinco minutos após a interação dos trofozoítos da *E. histolytica* (PETRI; HAQUE; MANN, 2002). Estudo identificou através de imunomarcção a lectina ligante de Gal/GalNAc em trofozoítos, hepatócitos, células sinusoidais e inflamatórias. As células imunomarcadas com a lectina apresentavam sinais de dano celular (PACHECO, 2004). Além disso, a lectina induz o aumento das

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de diminuir as enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutatona, contribuindo para o dano celular (RAWAL et al., 2004).

Além de participar do processo de morte das células do hospedeiro, a lectina ligante de Gal/GalNAc também contribui para a evasão do sistema imune pelos trofozoítos, pois possui homologia com a molécula CD59 humana, inativando o complexo C5b-C9 de ataque à membrana, impedindo a morte amebiana (HAQUE et al., 2003; PETRI; HAQUE; MANN, 2002).

#### 1.4.2 Lipofosfoglicanos e Lipofosfopeptideoglicanos

Tais moléculas estão presentes na superfície dos trofozoítos e provavelmente contribuem para evasão do sistema imune, pela inativação do complemento, e para a citotoxicidade amebiana. Os peptídeos ancorados via glicosilfosfatidilinositol (GPI), lipofosfoglicanos (LPG) e lipofosfopeptideoglicanos (LPPG) são proteofosfoglicanos e cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* (patogênicas e não patogênicas) apresentam diferenças estruturais em tais moléculas, apresentando quantidades diferentes de aminoácidos em suas composições. Além disso, os glicoconjugados da *E. dispar* são semelhantes aos identificados nas cepas de *E. histolytica* não-patogênica. Os LPPGs estão presentes em ambas as espécies, ao passo que os LPGs somente são expressos na *E. histolytica* (MOODY et al., 1997b; PRASAD et al., 1992).

Os LPGs são importantes fatores de virulência de cepas de *Leishmania* sp., e tais moléculas são semelhantes estruturalmente às encontradas nas *E. dispar* e *E. histolytica*. Alguns epítomos dos LPGs são imunogênicos em humanos e, ao que parece a microbiota pode ser capaz de modificar tais estruturas, levando ao não reconhecimento destes epítomos pelos anticorpos (PRASAD et al., 1992).

Os LPPGs possuem ação semelhante ao antígeno VSG (Variant surface glycoprotein) do parasito *Trypanosoma brucei*, pois se inserem na membrana via GPI. Além disso, os trofozoítos transferem o LPPG para o lado apical das células epiteliais, o que contribui para a colonização do intestino grosso. A capacidade de ligação da *E. histolytica* e *E. dispar* às células epiteliais via LPPG foi avaliada e a *E. dispar* não foi capaz de se ligar aos enterócitos, por não ultrapassar a camada de mucina (LAUWAET et al., 2004). Os LPPGs são considerados Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs), reconhecidos por receptores do tipo Toll-like 2 e 4, o que leva à liberação de citocinas de macrófagos e células dendríticas. Além disso,

o LPPG ativa células natural-killer, que contribui para a limitação no desenvolvimento do AHA, contribuindo esclarecer o porquê a grande maioria dos indivíduos infectados por *E. histolytica* não desenvolvem a forma extra-intestinal da doença (WONG-BAEZA et al., 2010).

A LPPG está relacionada com a proteção dos trofozoítos à ação do complemento, pois cria uma camada impermeável a estas moléculas, impedindo a ligação das proteínas à superfície amebiana. Estudos demonstraram que os trofozoítos de *E. dispar* sensíveis à ação do complemento possuem uma estrutura de glicocálice contendo LPPG muito mais delgada, evidenciando que tal molécula também contribui para a evasão do sistema imune (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016).

### 1.4.3 Amebaporos

As amebaporos são proteínas formadoras de poros de 4-5 Kda, com estrutura  $\alpha$ -helicoidal. Purificações dos grânulos citoplasmáticos de trofozoítos demonstraram a existência de três isoformas: A, B e C. A comparação entre as isoformas demonstra similaridades estruturais, principalmente na localização dos resíduos de cisteína. Apesar disso, também são encontradas diferenças substanciais: as amebaporos possuem funções semelhantes, entretanto a amebaporo C (APC) exerce efeito antibactericida menor. A APC é capaz de inserir na membrana com maior eficácia, provavelmente por seu terminal C ser mais hidrofóbico, mas os poros formados apresentam um menor tamanho (LEIPPE et al., 1994). As amebaporos são semelhantes do ponto de vista estrutural e funcional a um polipeptídeo produzido por células natural killer e linfócitos T CD8<sup>+</sup>, a NK-lisina, porém, as amebaporos apresentam atividade de formação de poros cinco vezes maior, pois são estruturas mais hidrofóbicas (BRUHN et al., 2003).

Isolados de cepas não-patogênicas de *E. histolytica* possuem menor concentração de amebaporos. Análises genéticas evidenciaram 95% de similaridade para a estrutura primária das amebaporos das cepas de *E. histolytica* não-patogênicas em comparação com as patogênicas. A estrutura secundária pareceu também ser muito semelhante. Todavia, a atividade específica da proteína na cepa não-patogênica foi 60% menor, e análises proteômicas posteriores evidenciaram quatro substituições de aminoácidos na estrutura (LEIPPE; MÜLLER-EBERHARD, 1994).



A função principal das amebaporos é degradar as bactérias fagocitadas pelos trofozoítos, à fim de evitar o crescimento das mesmas no vacúolo digestivo (LEIPPE; MÜLLER-EBERHARD, 1994). Os amebaporos também são capazes de provocar lise celular de células do hospedeiro, entretanto possuem baixa atividade hemolítica, provavelmente pela ausência de moléculas carregadas negativamente na membrana plasmática (LEIPPE; ANDRÄ; MÜLLER-EBERHARD, 1994).

A *E. dispar* é capaz de produzir todas as isoformas das amebaporos, porém, as amebaporos A e B apresentam cerca de 60% menor atividade quando comparadas a *E. histolytica*. Além disso, as amebaporos da *E. histolytica* apresentam 25 vezes mais eficiência frente à interação ao *Bacillus megaterium*, demonstrando então maior atividade bactericida (NICKEL et al., 2001).

#### 1.4.4 Cisteína proteinases

As cisteína proteinases (CPs) são proteinases extracelulares, importantes fatores de virulência para a patogênese da amebíase. As CPs desempenham papel fundamental na invasão tecidual pelos trofozoítos, pois degradam a camada de muco e moléculas como laminina, fibronectina e colágeno do tipo IV, principal componente das membranas basais. Além disso, as CPs apresentam efeito citopático, sendo capazes de contribuir para a destruição *in vitro* de monocamadas de células, e, também, degradam as anafilotoxinas C3a e C5a e as imunoglobulinas A e G (IgA e IgG), protegendo os trofozoítos da opsonização (HAQUE et al., 2003; QUE; REED, 1997, 2000; REED et al., 1995).

As CPs são produtos da tradução dos transcritos dos genes ACP1, ACP2, ACP3 e EhCP112, apresentando 7 isoformas: CP1, CP2, CP3, CP4, CP5, CP6 e CP112. Estudos prévios identificaram mRNA de CP1, CP2 e CP3 em cepas de *E. dispar*, entretanto, recentemente foi identificado a isoforma CP5 (QUE; REED, 2000; SILVA OLIVEIRA et al., 2021). A atividade das CPs de cepas de *E. histolytica* são cerca de 10 a 1000 vezes maior que as de cepas de *E. dispar* (QUE; REED, 2000). Mais de 90% da atividade é representada pelas CP1, CP2 e CP5, entretanto, a atividade predominante é da CP5, onde a inibição da mesma reduz substancialmente a atividade proteolítica da enzima e os trofozoítos deficientes não superam a camada de muco em cultivo celular (CORNICK; CHADEE, 2017). O emprego de inibidores de CPs a culturas foi capaz de reduzir o crescimento de trofozoítos em 50%, o que sugere

também a participação destas enzimas para o aporte nutricional das amebas. O bloqueio em culturas de outros parasitos também é capaz de levar a alterações importantes, como o impedimento da transformação de epimastigotas em tripomastigotas e de amastigotas em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e, o bloqueio da invasão às células do hospedeiro pelo *Plasmodium falciparum*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* e até mesmo pelo *T. cruzi* (QUE; REED, 2000).

O ciclo de vida de alguns parasitos também parece depender das CPs. Estudo realizando o bloqueio das CPs durante o encistamento da *Entamoeba invadens* (*E. invadens*) observou uma diminuição do número de cistos quando comparado aos controles (sem bloqueio das CPs). Tal fato parece ser secundário à diminuição da divisão celular dos trofozoítos. Além disso, o bloqueio da CPs foi capaz de diminuir a transmissão, demonstrando que as enzimas são essenciais para a sobrevivência da espécie (QUE; REED, 2000).

#### **1.4.5 Fosfatase ácida de membrana e fosfatase ácida secretada**

As fosfatases de membrana (MAP) e as fosfatases ácida secretadas (SAP) são enzimas da família das proteínas tirosinas fosfatases (PTPases) e funcionam juntamente com as tirosinas quinases para modular a fosforilação da tirosina que está envolvida no processo de transdução de sinais. (AGUIRRE-GARCÍA; ANAYA-RUIZ; TALAMÁS-ROHANA, 2003). Estas MAPs e SAPs são enzimas que possuem ótima atividade em pH ácido, por isso recebem este nome. Nos tripanossomatídeos, o pH ácido e a localização superficial das enzimas MAPs contribuem para adaptação do parasita no meio intracelular ou no fagossomo, auxiliando o parasito a escapar do sistema imune (GOMES; LOPES; MEYER-FERNANDES, 2011). As MAPs são secretadas por ambas as espécies, ao passo que as cepas de *E. dispar* não secretam as SAPs. A sinalização é um mecanismo importante para a conformação do citoesqueleto, e, as PTPases ligadas à membrana da *E. histolytica* são capazes de provocar a ruptura dos filamentos de actina no citoesqueleto de células HeLa. Diante do exposto, a dissociação dos microfilamentos de actina impossibilita células do sistema imune, como macrófagos, de emitir pseudópodes para realizar fagocitose. Esta ação contribui para a resistência do parasita diante do sistema imune do hospedeiro (AGUIRRE-GARCÍA; ANAYA-RUIZ; TALAMÁS-ROHANA, 2003). Além

disso, a comparação da atividade da ectofosfatase MAP de trofozoítos da ameba de vida livre *Entamoeba moshkovskii* com trofozoítos da *E. histolytica* patogênica demonstrou que a espécie patogênica apresenta atividade muito maior quando comparada à outra espécie. Então, as MAPs parecem ser fatores de virulência importantes para o desenvolvimento da amebíase invasiva (DE SÁ PINHEIRO et al., 2007).

As PTPases são importantes para a interação entre parasitos e células do hospedeiro, pois os sítios catalíticos estão voltados para o meio extracelular. Tais enzimas já foram descritas em diversos protozoários, como *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, algumas espécies de *Leishmania*, dentre outros (GOMES; LOPES; MEYER-FERNANDES, 2011).

## 1.5 IMUNIDADE

A defesa primária do hospedeiro contra a infecção por trofozoítos é a barreira epitelial colônica, constituída de três porções: uma camada de células epiteliais ao topo da lâmina própria, a camada de muco intermediária e a microbiota com os produtos secretados na camada mais externa. A camada de mucina possui dois compartimentos, sendo um em contato com o epitélio e desprovido de bactérias, e o outro mais superficial e frouxo, colonizado por microrganismos comensais. Quando os trofozoítos chegam ao intestino grosso, eles são reconhecidos pelas células residentes e, para evitar o contato do parasito com os enterócitos, as células caliciformes hiperplasiam e hipertrofiam, levando ao aumento da secreção de muco. Para que *E. histolytica/dispar* invadam o tecido e provoquem lesão, os trofozoítos necessitam superar a camada de muco (LEON-CORIA; KUMAR; CHADEE, 2020). Após o reconhecimento da lectina ligante de Gal/GalNAc ocorre a produção e secreção da imunoglobulina A (IgA) na mucosa intestinal (HAQUE et al., 2003). As IgAs são capazes de inibir *in vitro* a adesão de trofozoítos de *E. histolytica* às monocamadas de células epiteliais. Logo, a resposta imune secretora se mostra importante para a proteção epitelial contra a amebíase (CARRERO et al., 2007). Além disso, a presença de IgA específico contra a lectina ligante de Gal/GalNAc se correlaciona com a redução da taxa de reinfecção pela *E. histolytica* e, pacientes pós-

AHA mantiveram a memória imunológica e apresentaram maior responsividade imunológica (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016).

Os trofozoítos se ligam à camada de muco através da lectina ligante de Gal/GalNac e secretam as cisteínas proteinases que são capazes de degradar a mucina, laminina, fibronectina e colágeno do tipo I, permitindo a superação da camada de muco e a mobilidade na parede intestinal (HAQUE et al., 2003; QUE; REED, 1997, 2000). Além de contribuir para invasão e mobilidade tecidual, as CPs podem amplificar a inflamação por induzir a síntese de Interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), pois imitam a enzima conversora de IL-1, ativando o seu precursor (STANLEY, 2003).

Assim que os trofozoítos entram em contato com o epitélio intestinal, as células epiteliais reconhecem a lectina ligante de Gal/GalNac via receptor Toll-Like 2 e 4 (TLR2 e TLR4), ativando o NF $\kappa$ B e cursando com a secreção das interleucinas 1 $\beta$ , 6, 8, 12 (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e IL-12), interferon-gama (IFN $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e também cicloxigenase-2 (COX-2), com posterior recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016; STANLEY, 2003). Um dos métodos utilizados para medir a infiltração leucocitária precoce em um tecido é através da dosagem das enzimas mieloperoxidase (MPO), N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) e eosinófilo peroxidase (EPO), respectivamente para neutrófilos, macrófagos e eosinófilos (BAILEY, 1988; LANNA et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2016). A enzima MPO se liga à superfície dos trofozoítos e é capaz de realizar atividade amebicida utilizando do peróxido de hidrogênio produzido pelas próprias amebas (PACHECO-YÉPEZ et al., 2011).

Estudos *in vitro* verificaram que os neutrófilos e macrófagos ativados pelo IFN $\gamma$  desempenham atividade amebicida, contribuindo para a erradicação da infecção. Em modelos *in vivo*, quando o parênquima apresentava pouca quantidade de macrófagos, os neutrófilos se encontravam de forma abundante, demonstrando importância no papel amebicida desempenhado por eles. Tanto os macrófagos quanto os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, através de NADPH oxidase e da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), respectivamente, importante para a morte de trofozoítos (NAKADA-TSUKUI; NOZAKI, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a infecção amebiana é capaz de induzir a produção de citocinas: a) Th1, tais como a IL-1, IL-2, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ; b) Th2, tais como a IL-4 e IL-10; e; c) Th17, pela secreção da IL-17a (DELOER et al., 2017;

IVORY; CHADEE, 2007; SILVA OLIVEIRA et al., 2021; TALAMÁS-ROHANA et al., 1995). Estudos experimentais demonstraram que o IFN $\gamma$  está associado a um papel protetor, contribuindo para a eliminação dos trofozoítos da mucosa intestinal, ao passo que a IL-4 se mostrou responsável pela cronicidade da doença (GUO; STROUP; HOUP, 2008). Além disso, a IL-17, pré-condicionada pela vacinação experimental ou modulação da microbiota intestinal, mostrou contribuir para a persistência do parasito e modulação da resposta imune, através da redução da razão IFN $\gamma$ /IL-4 (DELOER et al., 2017).

### **1.6 ABSCESSO HEPÁTICO AMEBIANO (AHA)**

Com o auxílio dos fatores de virulência amebianos, tais como a lectina ligante de Gal/GalNAc, as cisteína proteinases e as amebaporos, os trofozoítos chegam à submucosa intestinal e atingem a via hematogênica, se disseminando para outros órgãos, sendo o fígado o principal órgão acometido (HAQUE et al., 2003). Vários fatores estão relacionados à predisposição ao desenvolvimento do AHA, como fatores inerentes ao parasito, fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro, como a genética, o gênero e o estado nutricional, bem como condições de saneamento básico inadequado (DUGGAL et al., 2004; SALLES; MORAES; SALLES, 2003). Estudos identificaram que alguns indivíduos possuem um alelo de MHC Classe II (DQB1\*0601) que os protegem contra a forma invasiva da amebíase, pois alteram a apresentação de antígeno para os linfócitos T auxiliares (TCD4+) (DUGGAL et al., 2004). Estudo experimental revelou através da gonadectomia de hamsters uma redução da indução do AHA de 50% em machos e 15% em fêmeas, com diminuição do infiltrado inflamatório. Além disso, notou-se que houve repolarização da resposta imune de Th1 para Th2 e Th3 nos hamsters gonadectomizados, o que explica a diminuição do infiltrado inflamatório (CERVANTES-REBOLLEDO et al., 2009).

O AHA geralmente é único e situa-se principalmente no lobo direito do fígado, contiguamente à cápsula do órgão, possui tamanho variável e em alguns casos chega a ocupar mais de 80% da superfície do órgão. O lobo hepático direito é o que recebe a maior parte da drenagem venosa do cólon (região mais acometida pelos trofozoítos), explicando a maior prevalência de abscessos amebianos nesta região. As lesões no lobo esquerdo são menos comuns, e, em casos mais graves, pode ocorrer a formação de múltiplas lesões amebianas no órgão (SALLES; MORAES; SALLES, 2003). O

modelo que melhor mimetiza o AHA que ocorre no homem é o uso do hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental (SANTI-ROCCA; RIGOTHIER; GUILLÉN, 2009). O AHA é caracterizado por uma zona central de necrose liquefativa, circunscrita por área rica em debris celulares, trofozoítos e escasso infiltrado inflamatório misto. Também após a indução experimental do abscesso hepático amebiano por cepas de *E. dispar*, verifica-se a presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos (DA SILVA et al., 2021). Três horas após a inoculação intraportal de trofozoítos já se observa grande número de focos inflamatórios, onde, neutrófilos e posteriormente macrófagos circundam os parasitos, na tentativa da eliminação dos mesmos. Após doze horas de infecção já não se observam mais trofozoítos na maioria dos focos inflamatórios, pois as células imunes ali presentes foram capazes de eliminá-los. Entretanto, os trofozoítos sobreviventes são capazes de se multiplicar e os focos inflamatórios se desenvolvem em abscessos e, como se movimentam, se disseminam pelo parênquima e formam múltiplos focos inflamatórios e/ou necróticos. À partir do terceiro dia de infecção ocorre coalescência dos microabscessos e a formação de uma grande zona de necrose liquefativa, assim como observado em humanos. Além de possuir atividade citolítica através dos fatores de virulência, os trofozoítos também induzem a apoptose de células inflamatórias, endoteliais e hepatócitos, contribuindo para a expansão da lesão (SANTI-ROCCA; RIGOTHIER; GUILLÉN, 2009).

Diante da observação de sequências de DNA da *E. dispar*, espécie considerada não invasiva, em AHAs, algumas hipóteses foram criadas para explicar a presença desta espécie no fígado: a) Co-infecção intestinal por *E. histolytica* e *E. dispar*. Os trofozoítos da *E. histolytica* seriam responsáveis por provocar a ulceração do epitélio e permitir a invasão por ambas as espécies, permitindo que os trofozoítos da *E. dispar* atinjam a via hematogênica e se disseminem para o fígado. b) A *E. dispar*, assim como a *E. histolytica*, seria capaz de provocar lesão no intestino e fígado de seres humanos. Assim, ambas as espécies seriam capazes de migrar para o fígado. c) A microbiota intestinal (indígena ou transitória) poderia possibilitar ou aumentar a infectividade da *E. dispar*, provocando modificações na virulência dos trofozoítos e possibilitando a invasão. d) Recombinação genética entre as espécies do gênero *Entamoeba*, levando ao aumento da expressão dos fatores de virulência, contribuindo para as ações de invasão (XIMÉNEZ et al., 2010).

## 1.7 SIMBIOSE ENTRE ORGANISMOS

O microbioma pode ser definido como comunidade de organismos comensais, simbióticos e patogênicos que estão em um ambiente ou espaço corporal (BERG et al., 2020). A associação entre organismos pode ser observada como comunidade de espécies que sofrem diferentes pressões de seleção, mesmo sendo interdependentes. Um organismo dentro de um hospedeiro pode ser mutualista (ambos se beneficiam desta relação), parasito (unilateralidade de benefícios, onde o parasita espolia o hospedeiro) ou comensal (unilateralidade de benefícios, porém sem espoliação do hospedeiro) (DHEILLY et al., 2019). A microbiota do hospedeiro é capaz de interagir com os parasitos e esta ação poderia influenciar a interação parasito-hospedeiro. Além disso, esta relação pode ser utilizada para se obter benefícios em tratamentos. Estudo recente avaliou a interrelação entre o rato e seu microbioma intestinal, associado à infecção pelo helminto *Hymenolepis diminuta* (*H. diminuta*), que agora é considerado um simbionte intestinal. A infecção controlada por este helminto protege os ratos contra a colite inflamatória grave, pois induzem resposta imune do tipo Th2 com consequente melhora do quadro inflamatório. O *H. diminuta* já é utilizado para autotratamento humano de doenças inflamatórias intestinais e atende aos critérios para terapia de helmintos (YURCHENKO; LUKEŠ, 2018).

As relações entre organismos podem apresentar efeitos benéficos ou deletérios para o hospedeiro, a depender da interação espécie-espécie. A infecção vaginal pelo *Trichomonas vaginalis* é prejudicial aos *Lactobacillus* sp., favorecendo o crescimento de bactérias patogênicas associadas à vaginose bacteriana; Nematóides filariais infectados com a bactéria *Wolbachia* levam à perda da viabilidade e fertilidade do helminto e elevam a eficácia do tratamento antifilaria; o helminto *Trichuris* sp. é capaz de interagir com a microbiota intestinal de seu hospedeiro, favorecendo o crescimento de bactérias que degradam muco; *Leishmania* sp. infectada com Leishmaniavirus 1 (LRV1) aumenta sua patogenicidade e refratariedade ao tratamento; o protozoário *Blastocystis* coloniza o intestino de aproximadamente 1 bilhão de pessoas e estudos observaram maior prevalência deste gênero em indivíduos saudáveis, quando comparados com aqueles com doença gastrointestinal (DHEILLY et al., 2019; YURCHENKO; LUKEŠ, 2018).

O poliparasitismo de pessoas em países de baixa renda é comum, estudo realizado com um grupo de crianças em Ruanda e Zanzibar, na África Ocidental,

demonstrou que 65% das amostras de fezes analisadas continham mais de um patógeno, dentre eles Rotavírus, Adenovírus, Astrovírus, Norovírus, Sapovírus, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter* e *Cryptosporidium*. Foi demonstrado correlação positiva forte das amostras de pacientes coinfetados com a EPEC e *Shigella*, e, adicionalmente, estes pacientes apresentaram maior frequência de diarreia, corroborando com os dados da correlação (ANDERSSON et al., 2018).

As lesões experimentais intestinais e hepáticas utilizando cepas de *E. dispar* são obtidas somente quando a cultura está associada à microbiota intestinal do indivíduo da qual foi isolada (cultura polixênica) (COSTA et al., 2006, 2010a, 2007, 2010b, 2011; DA SILVA et al., 2021; FURST et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2015, 2021). Tal fato reforça a ideia de que as bactérias modulam a atividade dos trofozoítos amebianos e favorecem o desenvolvimento destas lesões experimentais (COSTA et al., 2006). De fato, estudos tem demonstrado que a simbiose entre bactérias e amebas pode modular fenótipos e propriedades de virulência e a patogenicidade das amebas (BHATTACHARYA et al., 1992; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2021; SHIBAYAMA; et al., 2007).

O processo de interação dos trofozoítos com outros microrganismos ainda não está compreendido, bem como suas consequências. Nosso grupo de pesquisa recentemente verificou que a interação entre a *E. dispar* e a enterobactéria *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) foi capaz de aumentar a expressão gênica dos fatores de virulência amebianos amebaporo A, cisteína proteinase-5 e lectina ligante de Gal/GalNAc. Além disso, foi observado aumento na intensidade da colite amebiana ulcerativa, com produção de maiores zonas de erosão e ulceração da parede intestinal e, maior intensidade do infiltrado inflamatório, acompanhada pelo aumento da expressão dos mediadores pró-inflamatórios ciclooxigenase 2, IL-1 e TNF $\alpha$  (OLIVEIRA et al., 2021). Diante do exposto, concluiu-se que a associação da cultura de *E. dispar* com a *S. typhimurium* foi capaz de aumentar a virulência e a patogenicidade das cepas estudadas nos modelos experimentais realizados.

### **1.8 *Escherichia coli* enteropatogênica**

Além da *S. typhimurium*, a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é outra bactéria gram-negativa causadora de diarreia (CLARKE et al., 2003), principalmente



em crianças pequenas, causando surtos epidêmicos em lugares fechados, como creches e hospitais (DEBORAH CHEN; FRANKEL, 2005a; PIRES et al., 2015). Tal bactéria pode ser isolada de diferentes fontes, como alimentos processados e crus, animais domésticos e silvestres, ambientes naturais (água e solo) (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016). A infecção pela EPEC pode gerar casos moderados à fatais, com mortalidade chegando a 40%, com enfoque aos países em desenvolvimento (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016). No ano de 2010 a EPEC foi a segunda maior causa global de óbitos causada por patógenos que são veiculados por alimentos e levam às doenças diarreicas, reponsável por duas mortes para cada 100.000 habitantes (PIRES et al., 2015) .

A fisiopatologia da infecção pela EPEC se inicia pela aderência da bactéria à célula epitelial intestinal, através de flagelo e pili tipo IV (BFP: *bundle-forming pilus*). Após a ligação, ocorre translocação de sinais intracelulares, que é facilitada pelo sistema de secreção tipo 3 (T3SS – Sistema de secreção do tipo III), codificado pela ilha de patogenicidade (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016). A EPEC codifica genes de proteínas secretoras (Esp) tais como os tipos A, (EspA), B (EspB), C (EspC), D (EspD), entre outros. As EspA formam condutores ou filamentos, as EspB e EspD poros para a translocação de proteínas na membrana celular e as EspC realiza funções de citotoxicidade durante a adesão da EPEC, formando pedestais e poros. A EPEC provoca alteração da organização do citoesqueleto e dano nas microvilosidades dos enterócitos, que perdem sua função (FARFÁN-GARCÍA et al., 2016). Tais mecanismos formam as lesões denominadas de fixação e apagamento (A/E: *attaching/effacing*), pois provocam o desaparecimento das vilosidades e formação do pedestal (CEPEDA-MOLERO et al., 2017). A patogênese da EPEC a nível celular ainda não está totalmente compreendida, mas sabe-se que a formação dos pedestais com conseqüente perda das microvilosidades, má absorção por deficiência enzimática da borda em escova, alteração do transporte de eletrólitos e abertura de canais iônicos contribuem para o quadro diarreico (DEBORAH CHEN; FRANKEL, 2005b).

Estudo “*in vivo*” e “*in vitro*” demonstraram o aumento da virulência da cepa HM1:MSS de *Entamoeba histolytica* diante da sua interação com a EPEC. A coinfeção entre as espécies levou ao aumento de destruição das monocamadas de células CaCO<sub>2</sub> (Células de adenocarcinoma colorretal humano, utilizada como

modelo de barreira epitelial intestinal), bem como o aumento da expressão dos genes de fatores de virulência: amebaporo A, cisteínas proteinases 1 a 5 e lectina ligante de Gal/GalNAc. Além disso, foi evidenciado que quanto maior o tempo de interação, maior a expressão dos genes de virulência (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

Além da *E. dispar* apresentar prevalência global maior que a *E. histolytica*, muitos indivíduos em todo o mundo são infectados por mais de um patógeno ao mesmo tempo. Diversos estudos têm comprovado aumento de virulência e patogenicidade de organismos em simbiose, mas ainda existem muitas dúvidas acerca da relação entre amebas e bactérias, como a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). Além disso, não sabe se a EPEC pode influenciar a virulência e a patogenicidade dos trofozoítos e contribuir para a patogênese da amebíase, especialmente sobre as lesões hepáticas experimentais produzidas pela *E. dispar*.

Não existem estudos sobre a resposta imune contra a *E. dispar* associada à EPEC, bem como análises “*in vitro*” e “*in vivo*” sobre a correlação da expressão gênica de fatores de virulência de *E. dispar* com a intensidade das lesões, e sobre o desenvolvimento do abscesso hepático em modelos experimentais de infecção amebiana associada à EPEC.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral:

Avaliar a interação entre a bactéria *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e as cepas ACFN, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar* sobre a expressão dos fatores de virulência amebianos *in vitro* e *in vivo*, a resposta imune, o parasitismo e a intensidade das lesões hepáticas.

#### 3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar em diferentes cepas de *E. dispar* associadas ou não à EPEC:
  - 3.2.1 – Grau de eritrofagocitose;
  - 3.2.2 – A expressão dos genes dos fatores de virulência amebianos: cisteína proteinases 2 e 5, amebaporos A e C, e da lectina ligante de Gal/GalNAc.
- Avaliar no fígado de hamsters inoculados com a *E. dispar*, associados ou não à EPEC:
  - 3.2.3 – A intensidade da necrose e do processo inflamatório;
  - 3.2.4 – A intensidade do parasitismo tecidual;
  - 3.2.5 – O perfil de ativação celular de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos;
  - 3.2.6 – A expressão dos genes dos fatores de virulência amebianos: cisteína proteinases 2 e 5, amebaporos A e C, e da lectina ligante de Gal/GalNAc;
  - 3.2.7 – Perfil da resposta imune, por meio da análise da expressão das citocinas IL-5, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$  e TGF- $\beta$ .

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Cepas de *Entamoeba dispar*

Foram utilizadas 3 cepas de *E. dispar* isoladas pelo Laboratório de Amebíases e Protozooses Intestinais (LAPI) do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. Elas foram escolhidas com base no grau de patogenicidade descrito por Silva e colaboradores (2021), sendo a cepa ACFN de alta patogenicidade, a cepa ADO de média patogenicidade, e, a cepa VEJ de baixa patogenicidade. A cepa ACFN foi isolada de paciente assintomático, do município de Belo Horizonte/MG. As cepas ADO e VEJ foram isoladas de pacientes portadores de colite não disentérica, dos municípios de Itacarambi (Comunidade indígena Xacriabá)/MG e Belo Horizonte/MG, respectivamente. A identificação da espécie foi confirmada através da análise do zimodema e PCR. As cepas ACFN, ADO e VEJ foram destinadas aos experimentos *in vitro* e, com base nos resultados obtidos, foram selecionadas a ACFN e ADO para a experimentação animal (*in vivo*) (Figura 2):



Figura 2: Delineamento experimental das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar*.

### 4.2 Cepa de bactéria

Foi utilizada a *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) (INCQS 00184), de origem humana, fornecida pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do ICB/UFMG e cultivada em meio BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas a 37°C, sem agitação.

### 4.3 Culturas de trofozoítos de *E. dispar* em associação com a EPEC

As cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* foram cultivadas em meio PAVLOVA (SILVA; MAYRINK, 1974) e mantidas em estufa à 37° C por um período de 36 horas, até constatado o crescimento ideal. A bactéria EPEC foi associada a algumas culturas de cada uma das cepas amebianas, na concentração de 1x10<sup>6</sup> Unidades Formadoras

de Colônia (UFCs) em 10 µl, com auxílio de pipeta estéril em capela de fluxo. A associação foi mantida por um período de 16 horas em estufa à 37°C. Após este tempo, o sobrenadante da cultura associada foi descartado e acrescentado 3 mL de PBS (Phosphate-buffered saline) estéril. A garrafa de cultura foi mantida no gelo por 10 minutos, para o desprendimento das amebas do frasco. Posteriormente, o conteúdo foi transferido para tubos Falcon de 15 mL, centrifugados a 1500 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos, o sobrenadante descartado e acrescentado mesmo volume de PBS. Em seguida, os trofozoítos foram coletados das culturas associadas ou não a bactéria EPEC para realização de inóculo intra-hepático e extração do RNA. Para a extração de RNA das amostras *in vitro*, os trofozoítos foram transferidos para microtubos contendo 1mL de Trizol e armazenados a -80°C para posterior análise por rt-qPCR.

#### **4.4 Ensaio *in vitro* de eritrofagocitose**

O ensaio de eritrofagocitose *in vitro* foi realizado segundo adaptação do método de Trissl (TRISSEL et al., 1978). Os trofozoítos da cepa ACFN foram contados em Câmara de Neubauer e ajustados para  $1 \times 10^6$ /mL em PBS; 0.4 mL da suspensão foi acrescentada ao mesmo volume de uma suspensão de  $1 \times 10^8$ /mL de eritrócitos (Diacell ABO Alccdde, Bio-Rad). A proporção ameba/eritrócito foi de 1:100, com tempo de interação de 60 minutos em estufa à 37°C, baseado em experimentos prévios do nosso grupo (GOMES et al., 1997). Foram realizadas duplicatas, sendo um tubo com cultura polixênica (representando a microbiota indígena do indivíduo da qual foi isolado) e outro, com cultura polixênica cocultivada com EPEC. Foi contabilizado a quantidade de amebas que fagocitaram eritrócitos e o número de eritrócitos fagocitados por cada uma, na contagem de 100 amebas por grupo.

#### **4.5 Experimentação animal**

##### **4.5.1 Animais utilizados e grupos experimentais**

Foram utilizados no presente estudo 45 hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*), machos, com a idade aproximada entre 30-45 dias, obtidos do Biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG e divididos em grupos, conforme descrito na figura 3:



Hamsters eutanasiados 4 dias após a inoculação de:

<p><b>1x10<sup>5</sup> trofozoítos co-cultivados com 10<sup>6</sup> UFC's de EPEC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ACFN-EPEC (n=8)</li> <li>• ADO-EPEC (n=8)</li> </ul>	<p><b>1x10<sup>5</sup> trofozoítos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ACFN (n=8)</li> <li>• ADO (n=6)</li> </ul>	<p><b>10<sup>6</sup> UFCs de EPEC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• EPEC (n=8)</li> </ul>	<p><b>0,1mL de cloreto de sódio 0,9%</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Salina (n=7)</li> </ul>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Figura 3: Delineamento da experimentação animal.**

Todos os procedimentos adotados à experimentação animal foram conduzidos de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais, sob protocolo de número 252/2018. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura ambiente em torno de 23°C e exposição à luz durante 12 horas, recebendo água filtrada e com dieta *ad libitum*. Após a inoculação, foram perdidos 2 hamsters do grupo ADO e 1 do grupo Salina, por hemorragia.

#### 4.5.2 Anestesia e inoculação

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina 2% (10mg/Kg) e quetamina 5% (150mg/Kg) e, após anestesia, foi realizada uma incisão abdominal de aproximadamente um centímetro para visualização do fígado. Todos os hamsters foram inoculados diretamente no lobo esquerdo do órgão com: 1x10<sup>5</sup> trofozoítos das cepas de *E. dispar* polixênicas cultivadas, associadas ou não associadas com a bactéria EPEC, contidas em 100µL de meio de cultura; Bactéria EPEC, concentração de 1x10<sup>6</sup>, contida em 100µL de meio BHI; e; salina, 100µL de solução de cloreto de sódio a 0,9%. Após a inoculação, todos os hamsters foram suturados com fio cirúrgico e observados diariamente.

#### 4.5.3 Necropsia, análise macroscópica e coleta do fígado

No quarto dia após a infecção, os animais foram eutanasiados com uma overdose de anestésico (solução de xilazina 2% e quetamina 5%). Durante a retirada

do órgão foi realizada a análise macroscópica, com descrição da(s) lesão(ões) e digitalização das imagens. Cinco fatias do lobo esquerdo do fígado foram coletadas, sendo: a) uma embebida em solução de RNAlater (Sigma-Aldrich, USA), destinada para a análise da expressão de citocinas e fatores de virulência amebianos; b) três fixadas em formol tamponado (Concentração:10%; pH: 7,2), para análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica; e c) uma amostra à fresco para as dosagens bioquímicas de MPO, NAG e EPO. As fatias embebidas no RNAlater e à fresco foram acondicionadas em freezer -80°C para posteriores análises por biologia molecular e ensaios bioquímicos.

## **4.6 Determinação da expressão de RNAm dos fatores de virulência e das citocinas**

### **4.6.1 Extração do RNA total dos fatores de virulência e de citocinas hepáticas**

Trofozoítos foram coletados das culturas associadas ou não a bactéria EPEC para realização de inóculo intra-hepático e extração do RNA. Para a extração de RNA, os trofozoítos foram transferidos para microtubos contendo 1mL de Trizol.

Os fragmentos hepáticos foram descongelados e a trituração dos tecidos foi feita mecanicamente utilizando um triturador elétrico, após serem lavados para retirada dos resíduos de RNAlater e terem permanecido por 10 a 15 minutos imersos em Trizol. Clorofórmio foi adicionado para a separação em fases, onde foi retirada a fase líquida transparente, contendo o RNA. O produto foi então precipitado com isopropanol gelado e posteriormente lavado com etanol (Merck), a 70%, em água DEPC (Água tratada com Dietil Pirocarbonato – Livre de endonucleases). O pellet de RNA foi suspenso com 50 a 100µl de água DEPC, após a secagem do etanol residual, e quantificado por espectrometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Foi anotada a relação de absorbância em 260/280 nanômetros (nm) e 260/230 nm, que indicam o grau de pureza. O RNA foi armazenado a -20°C. Além disso, foi realizado eletroforese em gel de agarose 1% e coloração por Brometo de Etídio para avaliar a integridade do RNA.

Os tubos contendo amostras de RNA que apresentam quantificação acima de 200 ng/µl e relação de A260/A280 entre 1,7 e 2,1 foram selecionados para a obtenção do DNA complementar (cDNA). Foi calculado o volume necessário para obtenção de 50 µl, em concentração de 200ng/µl, para proceder com o tratamento amostral. As



amostras de mRNA foram previamente tratadas com a enzima Turbo DNAase I (Life Technologies, Grand Island, NY, USA), de acordo com a recomendação do fabricante, objetivando-se eliminar algum DNA residual. Em seguida foi efetuada nova diluição do RNA, adicionando-se de 50 µl de água DEPC, que resultou em 100µl do produto, contendo 100 ng/µl de RNA.

#### **4.6.2 Síntese de cDNA à partir do mRNA de *E. dispar* e do fígado de hamsters.**

Todo o RNA tratado foi usado para a reação de transcrição reversa (RT-PCR Reverse transcription polymerase chain reaction) para produção de cDNA com o kit High Capacity (Life Technology, Grand Island, NY, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado 1,0µg de RNA para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20°C.

#### **4.6.3 Padronização das reações de RT-qPCR com iniciadores para fatores de virulência de *E. dispar* e citocinas de hamsters.**

A padronização das condições da RT-qPCR foram feitas de acordo com a concentração dos iniciadores, eficiência das reações, curva de dissociação e temperatura de anelamento (60°C).

Para os ensaios de amplificação dos iniciadores, confeccionados para fatores de virulência dos trofozoítos de *E. díspar* e citocinas de hamsters, a padronização foi realizada com o cDNA obtido a partir do RNA extraído dos tecidos dos animais do grupo controle. Os parâmetros utilizados foram a concentração dos iniciadores, temperatura de anelamento e diluição das amostras de cDNA. Em cada placa, preparada com triplicatas das variáveis e submetidas ao PCR em tempo real foram inseridos os iniciadores para os genes constitutivos (Beta-actina, Microglobulina e GAPDH). Os iniciadores foram confeccionados por Integrated DNA Technologies (IDT), conforme descrito abaixo:

**Tabela 1: Genes utilizados na qPCR e sequência dos primers**

<b>Gene</b>	<b>Sequência dos primers</b>
<b>Amebaporo A (APA)</b> Referência: OLIVEIRA et al., 2021 Tamanho do amplicon: 97pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TCACTGCTACTCACCAAGGA 3' R 5' CTTTATCAGCTCCCTTAGTGGT 3'
<b>Amebaporo C (APC)</b> Referência: GenBank:EDR24723.1 Tamanho do amplicon: 105pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TGTGCTAAAGCAGATGGTGTAT 3' R 5' AAGTTTAGCACTTCCCTCCCTCT 3'
<b>Cisteína proteinase 2 (CP2)</b> Referência: OLIVEIRA et al., 2021 Tamanho do amplicon: 86pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' GTTTGTGCTGTTGGATATGGTGT 3' R 5' CCTTTATCCCCATCCTGTTCC 3'
<b>Cisteína proteinase 5 (CP5)</b> Referência: OLIVEIRA et al., 2021 Tamanho do amplicon: 93pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' AGAGACCAAGCATCATGTGGA 3' R 5' TCTTTGATCCAGCAACCAACA 3'
<b>Lectina ligante de Gal/GalNAc</b> Referência: OLIVEIRA et al., 2021 Tamanho do amplicon: 94pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TGCGAAACTGCAACATGTGATC 3' R 5' GGTGTGATTGTGGGAATTCTTC 3'
<b>IFN<math>\gamma</math></b> Referência: RIBEIRO-ROMAO et al., 2016 Tamanho do amplicon: 130pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TGTTGCTCTGCCTCACTCAGG 3' R 5' AAGACGAGGTCCCCTCCATTC 3'
<b>TGF<math>\beta</math></b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 205pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' CCAATGCCACCACAGGAGAT 3' R 5' TTGGGTTGAGTGACCACCAC 3'
<b>IL-4</b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 174pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TCCACGGAGAAAGACCTCATC 3' R 5' GGAATCATTACATTGCAGCTC 3'
<b>IL-5</b> Referência: ATKINS et al., 2018 Tamanho do amplicon: 72pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' CAAAAAGAGCAGTGTGGCC 3' R 5' ACCAAGGAACTCTTGCAGGT 3'
<b>IL-10</b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 183pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TGGGAAACCTCGTTGTACCT 3' R 5' AATACTACCACGCGTCCCT 3'
<b>IL-12</b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 73pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' GGCCTTCCCTGGCAGAA 3' R 5' ATGCTGAAAGCCTGCAGTAGAAT 3'

<b>IL-17</b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 243pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TCCAAACACTGAGGCCAAGAA 3' R 5' ACAGAGTTCATGTGGTGGTCC 3'
<b>GAPDH- hamster</b> Referência: YANG et al., 2021 Tamanho do amplicon: 171pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' TCATCAATGGGAAGGCCAACA 3' R 5' AAGGTGTGGAGATGATGACCC 3'
<b>Microglobulina hamster</b> Referência: DA SILVA et al., 2020 Tamanho do amplicon: 95pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' GGTCTTTCTATCTCTTGGCTCA 3' R 5' CTTGGGCTCCTTCAGAGTTATG 3'
<b>Beta actina – ameba</b> Referência: OLIVEIRA et al., 2021 Tamanho do amplicon: 119pb Temperatura de anelamento: 60°C	F 5' AAGCTGCATCAAGCGTGAA 3' R 5' ACCAAGGAATGATGGAGA 3'

**F: Forward, R: Reverse**

As reações de qRT-PCR foram efetuadas na plataforma QuantStudio 1 (AppliedBiosystems, Massachusetts, EUA) pertencente ao Departamento de Microbiologia-ICB/UFMG, com o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies), em placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, fechadas com selante MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies, Grand Island, NY, USA).

As curvas de eficiência foram obtidas a partir de diluições seriadas do cDNA (50ng; 5 ng; 0,5ng, 50pg e 5pg), para todos os genes dos fatores de virulência dos trofozoítos, citocinas de hamsters e os genes constitutivos. Os parâmetros de avaliação da qualidade das reações foram: a eficiência de amplificação (90-100%) e o perfil da curva de dissociação. A eficiência (E) das reações foi calculada através da inclinação da curva de diluição (slope), quantidade do cDNA versus Cq (ciclo de quantificação ou Ct). Os padrões foram estabelecidos para cada um dos genes amplificados, que apresentaram eficiência entre 90-100% e com apenas um pico nas curvas de dissociação.

Em todas as reações de amplificação foram usados programas de ciclagem contendo um passo inicial de 50° C/2min; 95° C/10min seguido por 40 ciclos, contendo um passo de 95° C/ 15s e outro, de 60° C/1minuto.

#### **4.6.4 Quantificação relativa da expressão dos fatores de virulência de *E. dispar* e citocinas de hamsters**

A normalização foi fundamentada nos resultados dos níveis de expressão dos genes constitutivos Beta-actina, microglobulina e GAPDH. A concentração desconhecida de uma amostra foi calculada pela comparação do seu ponto de cruzamento (Cp), com o correspondente na curva padrão. O número de ciclos no Cp (eixo Y) foi representado graficamente em função do log da quantidade do molde inicial dos padrões (eixo X).

Para calibração foram utilizados os dados da expressão gênica dos grupos controles dos experimentos. Os resultados foram expressos graficamente usando-se a média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de RNAm de cada fator de virulência amebiano e citocina de hamster, normalizado através da média geométrica das quantidades relativas de RNAm dos genes constitutivos, para cada grupo experimental.

Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE) foi empregado o método derivado do RQ (relative quantification) =  $E\Delta\Delta Cq$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os resultados da análise de expressão gênica dos experimentos *in vitro* e *in vivo* foram expostos em seguida, para título de comparação.

#### **4.7 Processamento e análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica das lesões hepáticas**

As fatias fixadas em formol foram diafanizadas em xilol, desidratadas em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, parafinizadas e incluídas em parafina para obtenção de cortes com 4  $\mu$ m de espessura, para coloração com hematoxilina e eosina e, posterior análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica das lesões.

Durante a análise histopatológica, as lesões foram descritas quanto a sua intensidade, topografia e a presença de parasitos. Para a análise da inflamação foi realizada análise semi-quantitativa, caracterizando cada corte histológico em: 0 – ausência de inflamação, 1 – Inflamação discreta, 2 – Inflamação moderada e 3 – Inflamação intensa. Da mesma forma foi realizada a avaliação da presença de trofozoítos, em: 0 – ausência de Trofozoítos, 1 – presença discreta de trofozoítos, 2 – presença moderada de trofozoítos e 3 – presença acentuada de trofozoítos.

Todos os cortes histológicos foram visualizados pela objetiva de 10X do microscópio Axiolab – Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) e digitalizado todo o parênquima hepático presente nas lâminas, por meio da microcâmara Q-Color3 (Olympus, Toquio, Japão). Por intermédio do software KS300, contido no analisador de imagens Carl Zeiss, todas as áreas de necrose hepática contidas nas imagens foram mensuradas em  $\mu\text{m}^2$  através da delimitação interativa com a ajuda de um cursor, utilizando algoritmos construídos no mesmo analisador de imagens (DA SILVA et al., 2021). Posteriormente, todos os cortes histológicos foram digitalizados por meio do Scanner Epson, com resolução de 800 dpi, e os pixels de cada um foram inteiramente selecionados, para criação de uma imagem binária e cálculo da área total do corte. O corte histológico com menor área foi utilizado como padrão mínimo do parênquima hepático a ser analisado estatisticamente.

#### **4.8 Quantificação da atividade enzimática de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos no homogenato de fígado**

A avaliação da atividade de MPO, NAG e EPO foi realizada nos homogenatos de fígado e mensuradas de acordo com o método descrito por STRATH e colaboradores (1985), modificado por SILVEIRA e colaboradores (2002). Após a homogeneização do tecido (TissueLyser LT® - Qiagen, Hilden, Alemanha), o homogenato foi centrifugado a 10000rpm durante 10 minutos a 4 °C e o sedimento resultante foi examinado para determinar a atividade das enzimas.

Para o ensaio MPO, o sedimento foi homogeneizado em 200  $\mu\text{L}$  de solução de tampão 1 (NaCl 0,1M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,02M, Na<sub>2</sub> EDTA 0,015M, pH 4,7) seguido de centrifugação (10000rpm, 10 minutos a 4°C,). O sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado ao sedimento 800  $\mu\text{L}$  de solução tampão 2 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 M, brometo de hexadeciltrimetilamônio a 0,5%), as amostras foram homogeneizadas e depois submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento utilizando nitrogênio líquido. O lisado foi centrifugado novamente (10000 rpm, 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para a realização do ensaio, 25  $\mu\text{L}$  das amostras foram distribuídas em todos os poços de placas com 96 poços (Corning®, EUA). Posteriormente foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de substrato TMB 1,6mM (3,3'-5,5, - tetrametilbenzina diluído em dimetilsulfóxido - DMSO) seguida pela incubação por cinco minutos à 37°C. Após esse período foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

a 0,002% e incubado por cinco minutos à 37°C, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M). A absorbância das amostras foi determinada por um leitor de microplacas VersaMax® ELISA (Molecular Devices, EUA) em um comprimento de onda de 450 nm.

Para o ensaio de atividade da NAG tecidual, o sedimento foi homogeneizado em 800 µL de NaCl 0,9% Triton 100 0,1%, as amostras foram homogeneizadas no vortex e em seguida centrifugadas a 3000rpm, 10 minutos 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio, sendo que a reação foi iniciada com a adição de 100 µl do substrato p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminida (Sigma Chemical Co®, EUA) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,5) e incubado a 37 °C por 10 minutos. A reação foi terminada pela adição de 100 µl de tampão glicina 0,8 M (glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M, pH 10,6) e a absorbância foi determinada a 405 nm.

Para o ensaio de EPO, o sedimento foi homogeneizado em 950 µL de PBS e 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma Chemical Co®, EUA), em seguida as amostras foram homogeneizadas e foram realizados três ciclos de congelamento e descongeladas em nitrogênio líquido para a lise de vesículas. O lisado foi então centrifugado (10000rpm, 10 minutos a 4°C,) e o sobrenadante foi distribuído (75 µL/poço) numa microplaca de 96 poços (Corning®, EUA), seguida da adição de 75 µL de substrato (1,5 mM OPD e 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 0,075 M em tampão Tris-HCl, pH 8,0). Após a incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M e a absorbância foi determinada a 492 nm.

#### **4.9 Análises estatísticas**

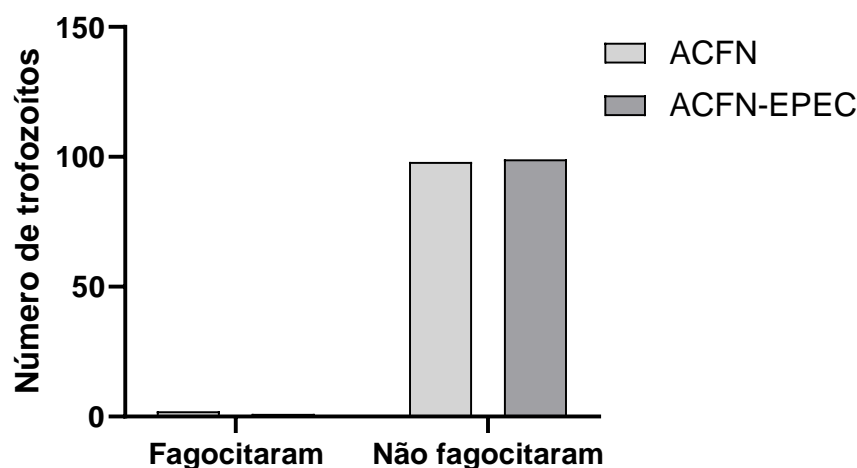
As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico Graphpad Prism® 8.0. Primariamente foi feito o teste Shapiro-Wilk, para verificar a distribuição dos dados. Para as análises de: dois grupos, foi empregado o teste-t para os dados categorizados como paramétricos e os testes Mann-Whitney e Exato de Fisher para os não-paramétricos; três ou mais grupos, o teste ANOVA para os dados paramétricos e o Kruskal-Wallis para os não-paramétricos; correlação, o teste de Pearson para os dados paramétricos e Spearman para os não-paramétricos. Os resultados foram expressos como média ± SEM (erro padrão da média) para os dados paramétricos e

para os não-paramétricos como mediana, máximo e mínimo. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de eritrofagocitose da cepa ACFN de *E. dispar* em associação à EPEC

A fagocitose foi confirmada através da observação das hemácias no citoplasma dos trofozoítos. Não foram contabilizados os eritrócitos que estavam sobrepostos aos trofozoítos, nem os que estavam aderidos à sua membrana. Não houve diferença estatística entre a fagocitose da cepa ACFN e ACFN associada à EPEC (Teste de Mann Whitney,  $p=0,104$ ) (Gráfico 1). Silva e colaboradores (2021) não identificaram diferenças na capacidade de eritrofagocitose entre as cepas de *E. dispar*, dentre elas a ACFN e a ADO. Diante do exposto e com base na capacidade de eritrofagocitose da cepa ACFN em associação à EPEC, optou-se por não realizar o ensaio em associação para as demais cepas.



**Gráfico 1: Eritrofagocitose da cepa ACFN de *Entamoeba dispar* associada ou não com a *Escherichia coli* enteropatogênica.** ACFN: Grupo inoculado com *E. dispar* sem associação bacteriana; ACFN-EPEC: Grupo inoculado com a *E. dispar* com associação bacteriana. Foi utilizado o teste de Teste Exato de Fisher. Não houve diferença estatística entre os grupos analisados ( $p > 0,9999$ ).

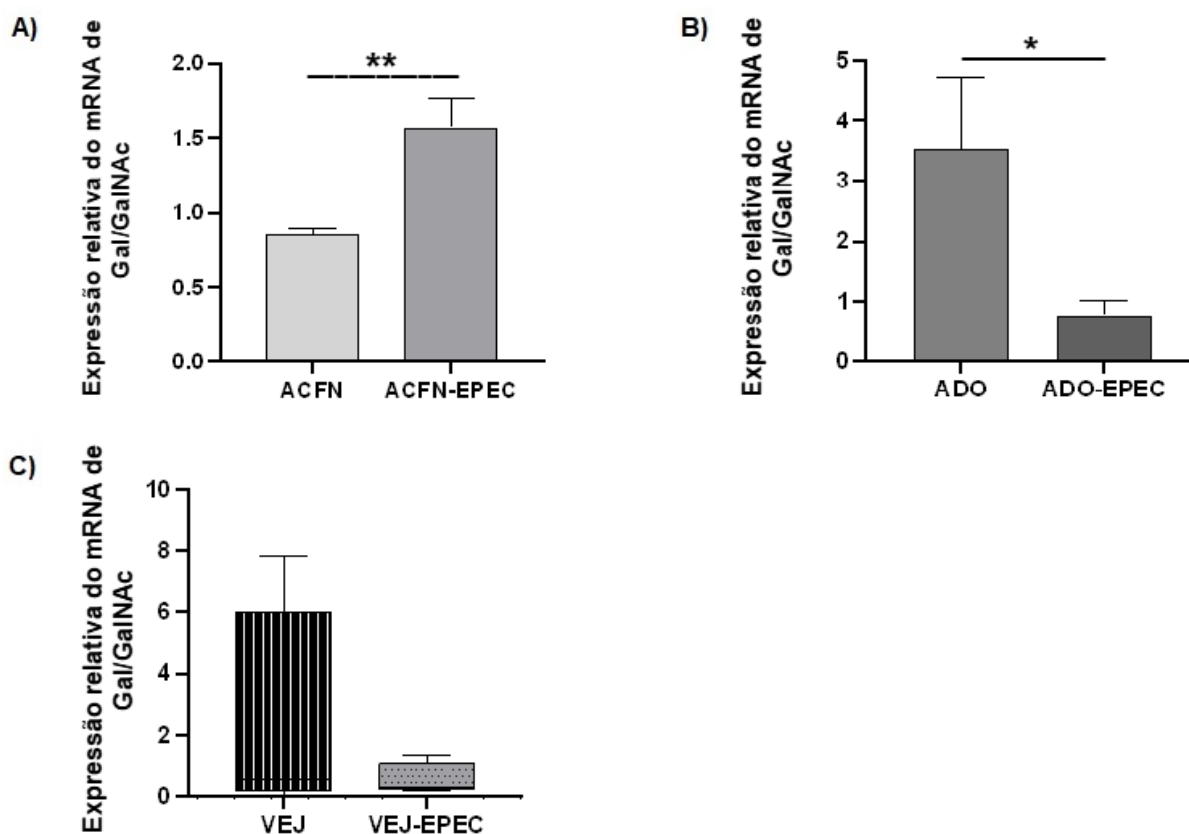
### 5.2 Expressão relativa dos fatores de virulência amebianos lectina ligante de Gal/GalNac, CP2, APA e APC de culturas das cepas ACFN, ADO e VEJ associadas à EPEC

Os resultados da interação entre a EPEC sobre a cultura dos trofozoítos das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* foram expressos como quantificação relativa de mRNA dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNac, CP-2, APA e APC, conforme descrito anteriormente por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2021).



### 5.2.1 Expressão relativa *in vitro* do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

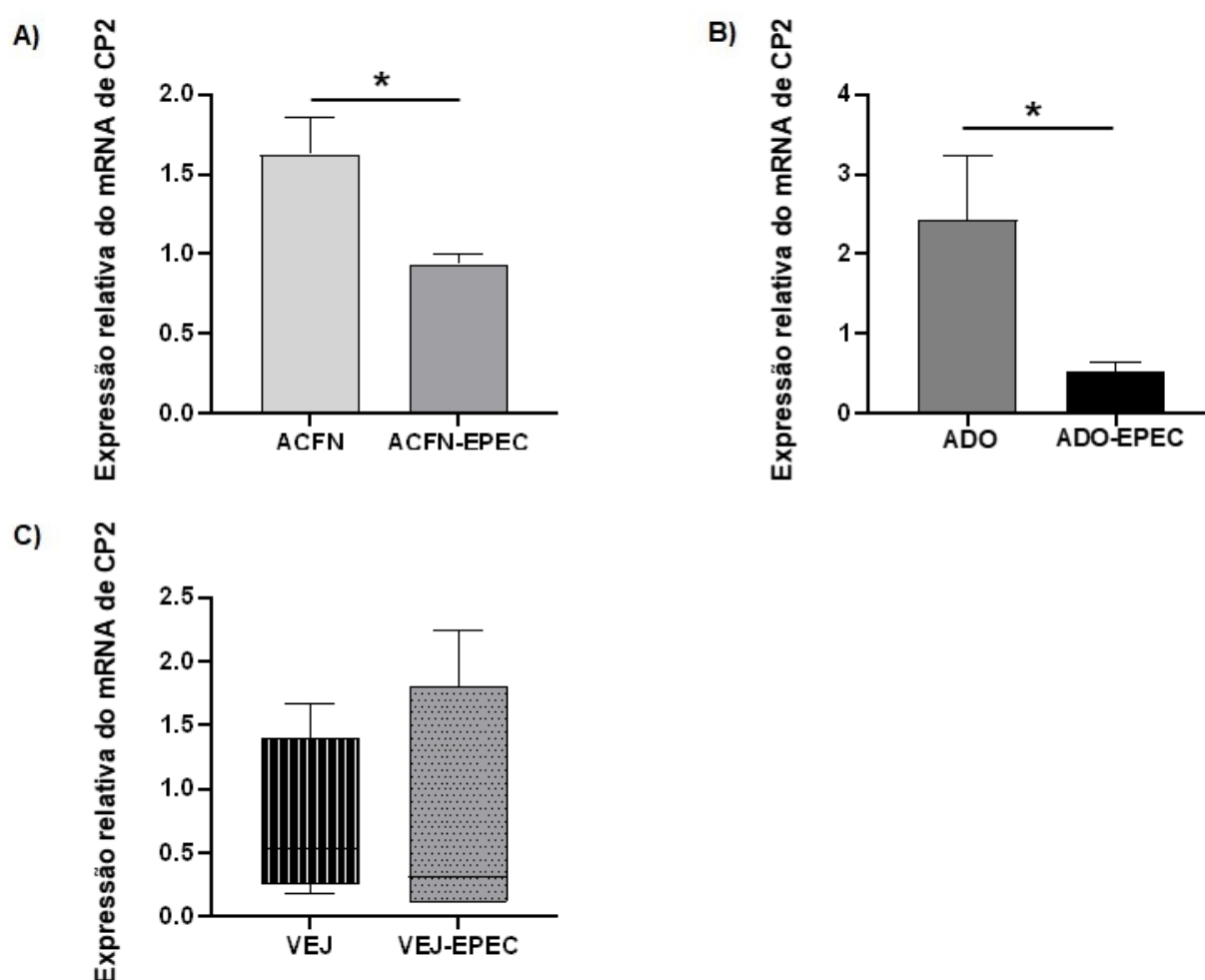
Após 18 horas de associação das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* com a EPEC foi evidenciado um aumento da expressão relativa do gene da lectina ligante de Gal/GalNAc do grupo ACFN-EPEC ( $1,57 \pm 0,19$ ) quando comparado ao grupo ACFN ( $0,85 \pm 0,05$ ),  $p=0,009$  (Gráfico 2 A), e, diminuição no grupo ADO ( $3,53 \pm 1,19$ ) quando comparado ao grupo ADO-EPEC ( $0,77 \pm 0,23$ ),  $p=0,04$  (Gráfico 2 B). Não foi observada diferença significativa na expressão relativa de Gal/GalNAc no grupo VEJ ( $0,61$ ) ( $0,54-7,82$ ) quando comparado ao grupo VEJ-EPEC ( $0,25$ ) ( $0,19 - 0,30$ ),  $p=0,1$  (Gráfico 2 C).



**Gráfico 2: Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*.** **A)** ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC,  $*p= 0,009$ . **B)** ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $*p= 0,04$ . **C)** VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à EPEC. VEJ-EPEC: Cultura da cepa VEJ associada à EPEC,  $p= 0,1$ . **A e B)** Teste T não-pareado. Resultados expressos em média e SEM. **C)** Teste de Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana, máximo e mínimo.

### 5.2.2 Expressão relativa *in vitro* do fator de virulência CP2 das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* associadas à EPEC

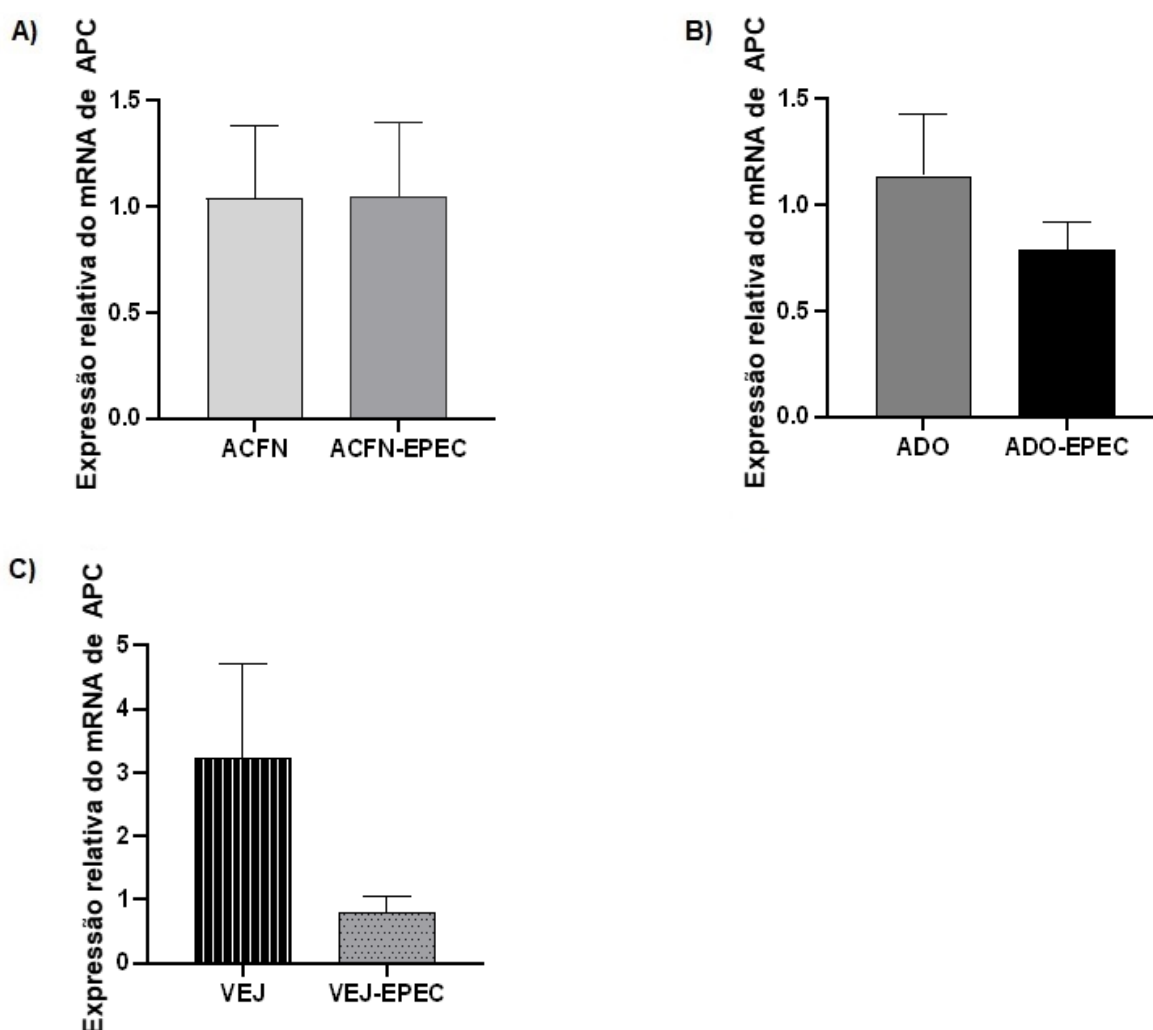
A associação da EPEC às cepas ACFN (ACFN-EPEC:  $0,93 \pm 0,06$ ) e ADO (ADO-EPEC:  $0,52 \pm 0,13$ ) produziu redução da expressão relativa do gene da CP2 quando comparado com os grupos sem associação (ACFN:  $1,624 \pm 0,23$ ;  $p=0,03$ . ADO:  $2,43 \pm 1,39$ ;  $p=0,04$ ) (Gráficos 3 A e 3 B). Por outro lado, não foi observada diferença significativa na expressão relativa de CP2 no grupo VEJ ( $0,53$ ) ( $0,18-1,67$ ) quando comparado ao grupo VEJ-EPEC ( $0,31$ ) ( $0,11-2,23$ ),  $p=0,69$  (Gráfico 3 C).



**Gráfico 3: Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência cisteína proteinase 2 (CP2) das cepas ACFN, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*. A) ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC, \* $p= 0,03$ . B) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC, \* $p= 0,04$ . C) VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à EPEC. VEJ-EPEC: Cultura da cepa VEJ associada à EPEC,  $p= 0,69$ . A e B) Teste T não pareado. Resultados expressos em média e SEM. C) Teste de Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana, máximo e mínimo.**

### 5.2.3 Expressão relativa *in vitro* dos fatores de virulência APA e APC das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* associadas à EPEC

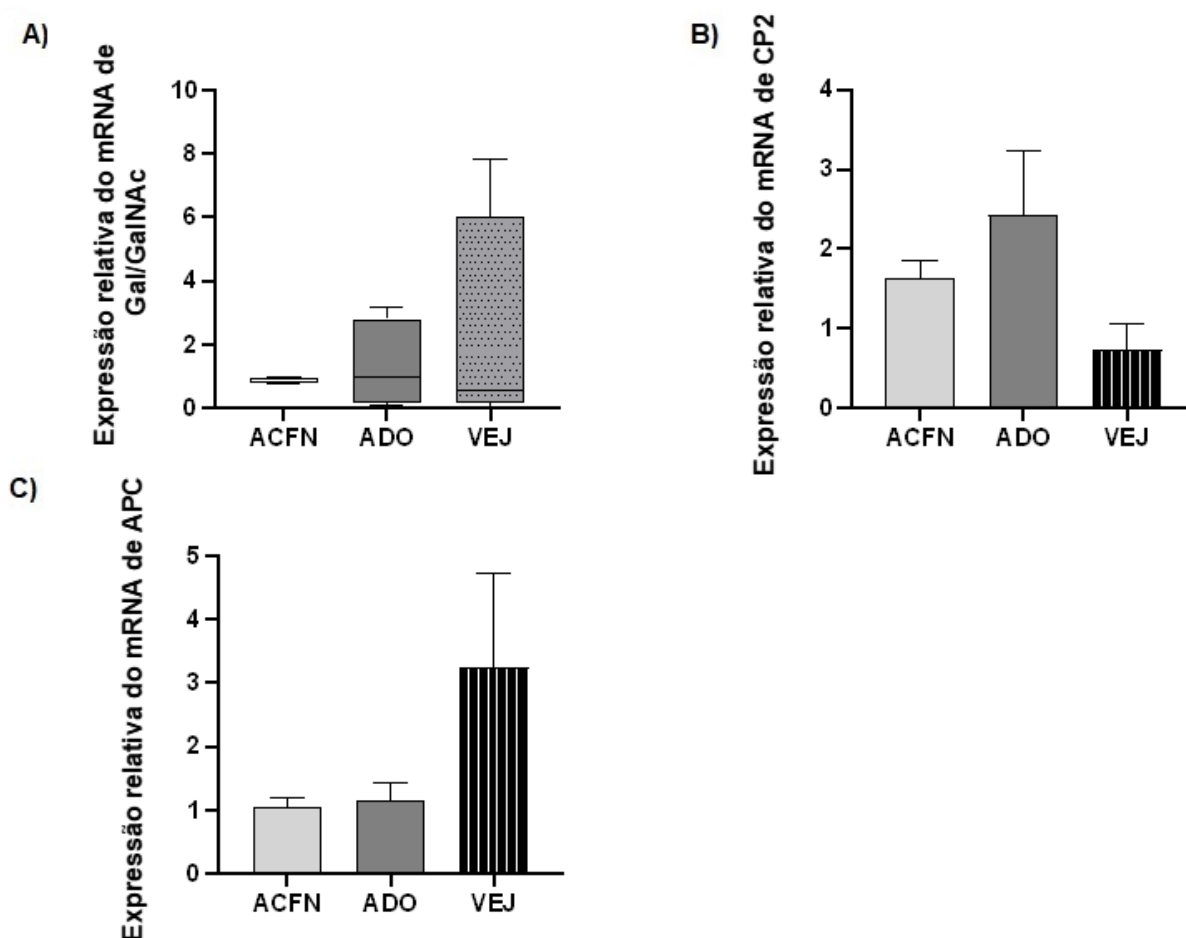
Após 18 horas de associação das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* não foi observada expressão gênica do fator de virulência APA e não foram observadas diferenças significativas na expressão relativa do gene da APC das cepas em associação com a EPEC quando comparadas ao grupos sem associação bacteriana: ACFN ( $1,04 \pm 0,15$ ), ACFN-EPEC ( $1,05 \pm 0,16$ ),  $p= 0,98$  (Gráfico 4 A); ADO ( $1,14 \pm 0,29$ ), ADO-EPEC ( $0,79 \pm 0,13$ ),  $p= 0,35$  (Gráfico 4 B); VEJ ( $3,24 \pm 1,48$ ), VEJ-EPEC ( $0,80 \pm 0,25$ ),  $p= 0,19$  (Gráfico 4 C).



**Gráfico 4:** Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência amebaporo C (APC) das cepas ACFN, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*. **A)** ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC,  $p= 0,98$ . **B)** ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $p= 0,35$ . **C)** VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à EPEC. VEJ-EPEC: Cultura da cepa VEJ associada à EPEC,  $p= 0,19$ . Teste T não pareado. Resultados expressos em média e SEM.

### 5.2.4 Comparação da expressão relativa *in vitro* dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2 e APC das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar*.

Não foram observadas diferenças na expressão relativa dos genes da lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2 e APC entre as cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar*): Gal/GalNAc ACFN (0,84)(0,77-0,95), Gal/GalNAc ADO (1,01)(0,09-3,17) e Gal/GalNAc VEJ (0,61)(0,54-7,82),  $p= 0,93$  (Gráfico 5A); CP2 ACFN ( $1,62 \pm 0,23$ ), CP2 ADO ( $2,43 \pm 0,80$ ) e CP2 VEJ ( $0,73 \pm 0,32$ ),  $p= 0,08$  (Gráfico 5B); APC ACFN ( $1,04 \pm 0,15$ ), APC ADO ( $1,14 \pm 0,29$ ) e APC VEJ ( $3,24 \pm 1,48$ ),  $p= 0,17$  (Gráfico 5C).



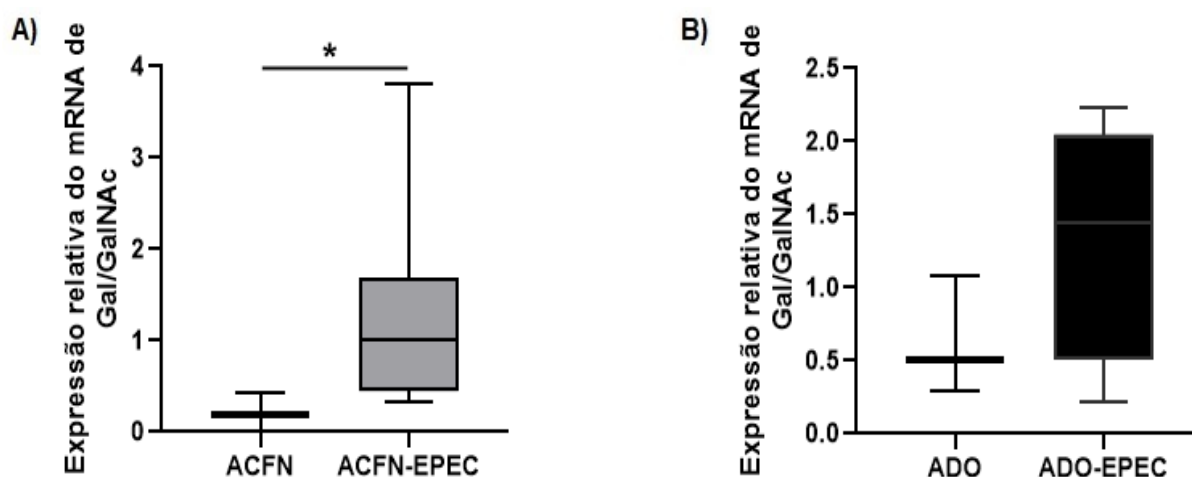
**Gráfico 5: Comparação da expressão relativa gênica dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, cisteína proteinase 2 (CP2) e amebaporo C (APC) entre as cepas ACFN, ADO e VEJ de *Entamoeba dispar*.** **A)** Expressão gênica relativa da lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN, ADO e VEJ,  $p= 0,93$ . **B)** Expressão gênica relativa da CP2 das cepas ACFN, ADO e VEJ,  $p=0,08$ . **C)** Expressão gênica relativa da APC das cepas ACFN, ADO e VEJ,  $p= 0,17$ . **A)** Teste de Kurskal-Wallis. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo. **B e C)** Teste One-way ANOVA. Resultados expressos em média e SEM.

### 5.3 Expressão relativa dos fatores de virulência amebianos lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2, APA e APC no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

Diante dos resultados obtidos na análise *in vitro* da expressão dos fatores de virulência amebianos, foram selecionadas as cepas ACFN e ADO para os estudos *in vivo*. O resultado da interação da EPEC com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* sobre a os fatores de virulência amebianos lectina ligante de Gal/GalNAc, CP-2, APA e APC em modelo experimental de abscesso hepático amebiano foram expressos como quantificação relativa de mRNA, conforme descrito anteriormente por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2021).

#### 5.3.1 Expressão relativa do fator de virulência amebiano lectina ligante de Gal/GalNAc no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

A EPEC foi capaz de aumentar a expressão relativa da lectina ligante de Gal/GalNAc da cepa ACFN de *E. dispar* no parênquima hepático analisado (ACFN: [0,20] [0,00-0,43], ACFN-EPEC: [1,02] [0,32-3,80],  $p=0,03$ ) (Gráfico 6 A), ao passo que não aumentou a expressão do mesmo fator de virulência para a cepa ADO de *E. dispar* (ADO: [0,50] [0,30-1,09], ADO-EPEC: [1,44] [0,22-2,23],  $p=0,40$ ) (Gráfico 6 B).

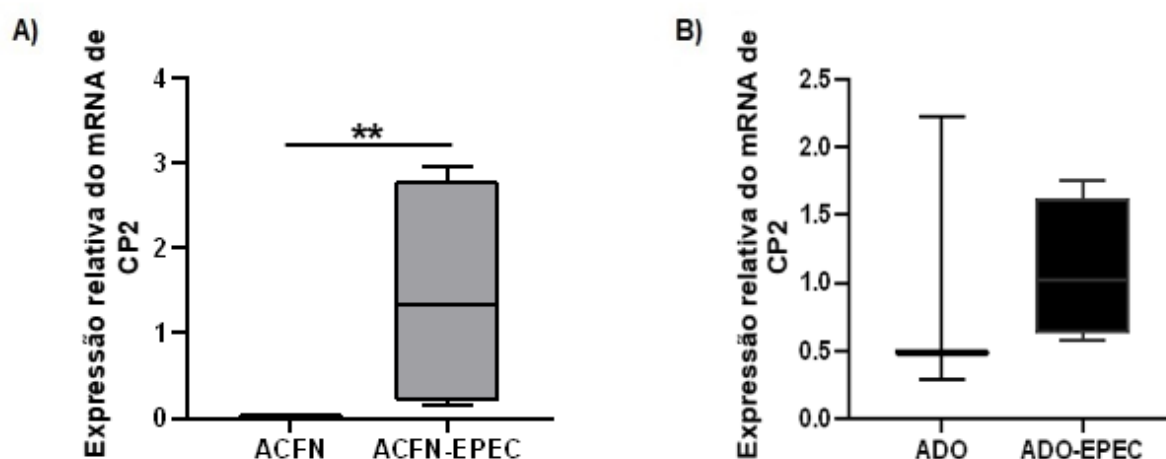


**Gráfico 6:** Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc das cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar* no fígado de hamster. **A)** ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC,  $p= 0,03$ . **B)** ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $p= 0,40$ .

associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $p= 0,40$ . Teste Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo.

### 5.3.2 Expressão relativa do fator de virulência amebiano de cisteína proteinase 2 (CP2) no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

A EPEC foi capaz de aumentar a expressão relativa da cisteína proteinase 2 (CP2) da cepa ACFN de *E. dispar* no parênquima hepático analisado (ACFN: [0,00] [0,00-0,00], ACFN-EPEC: [1,34] [0,15-2,96],  $p=0,008$ ) (Gráfico 7 A). Ao contrário não ocorreu aumento da expressão do mesmo fator de virulência para a cepa ADO de *E. dispar* (ADO: [0,49] [0,29-2,22], ADO-EPEC: [1,02] [0,57-1,78],  $p=0,63$ ) (Gráfico 7 B).

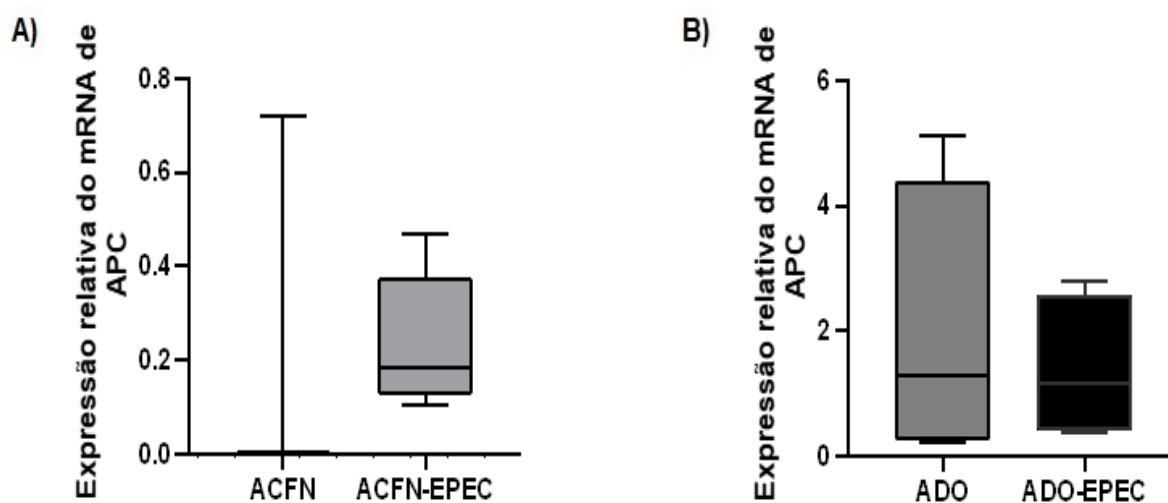


**Gráfico 7: Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência cisteína proteinase 2 (CP2) das cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar* no fígado de hamster. **A)** ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC,  $p= 0,008$ . **B)** ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $p= 0,63$ . Teste Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo.**

### 5.3.3 Expressão relativa dos fatores de virulência amebiano amebaporo A e C (APA e APC) no fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

Não foi verificada expressão de APA nos grupos ACFN, ACFN-EPEC, ADO e ADO-EPEC. A interação da EPEC com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* não foi capaz de alterar a expressão de APC (ACFN: [0,00] [0,00-0,72], ACFN-EPEC: [0,18]

[0,10-0,47],  $p=0,52$ ; ADO [1,28] [0,24–5,12], ADO-EPEC [1,17] [0,39-2,81],  $p= 0,89$ ) (Gráfico 8 A e B).

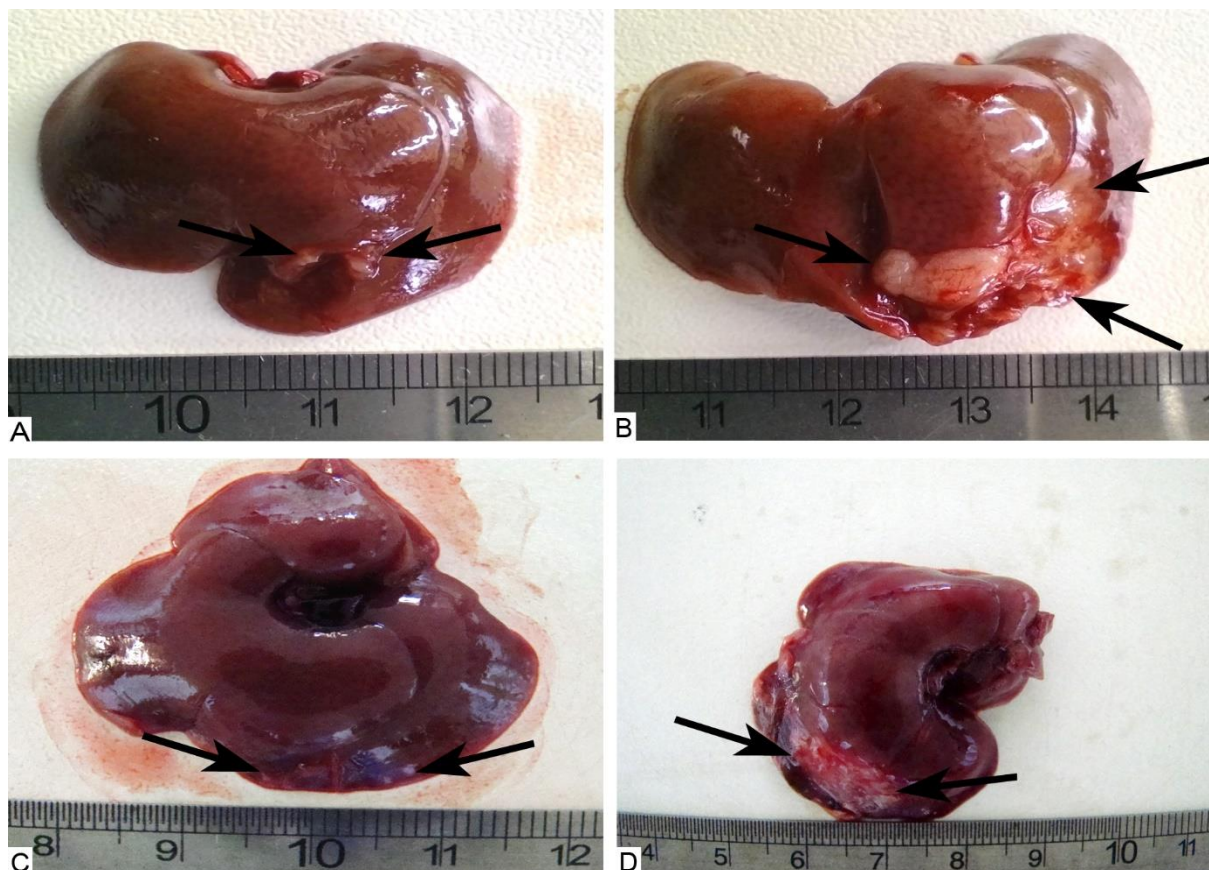


**Gráfico 8:** Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre a expressão gênica do fator de virulência amebaporo C (APC) das cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar* no fígado de hamster. **A)** ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC,  $p= 0,52$ . **B)** ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC,  $p= 0,89$ . Teste Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo.

#### 5.4 Análise macroscópica do fígado de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar*, associadas ou não à EPEC

A análise macroscópica do fígado coletado mostrou a presença de áreas branco-amareladas amolecidas e de baixa consistência. Os hamsters do grupo ACFN-EPEC apresentaram lesões visivelmente maiores do que os do grupo ACFN (Figura 4 A e B). Tal diferença não foi perceptível entre os grupos ADO-EPEC e ADO (Figura 4 C e D). Não foram observadas alterações macroscópicas no fígado dos hamsters inoculados com os grupos EPEC e Salina.





**Figura 4: Abscesso hepático amebiano (AHA) de hamster inoculado com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar*, associados ou não com a EPEC.** Macroscopia do fígado evidenciando áreas de necrose de coloração branco-amarelada, amolecidas e de baixa consistência (setas) nos grupos: **A)** Hamster inoculado com 100.000 trofozoítos da cepa ACFN. **B)** Hamster inoculado com 100.000 trofozoítos da cepa ACFN associada à *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), **C)** Hamster inoculado com 100.000 trofozoítos da cepa ADO e **D)** Hamster inoculado com 100.000 trofozoítos da cepa ADO associada à EPEC.

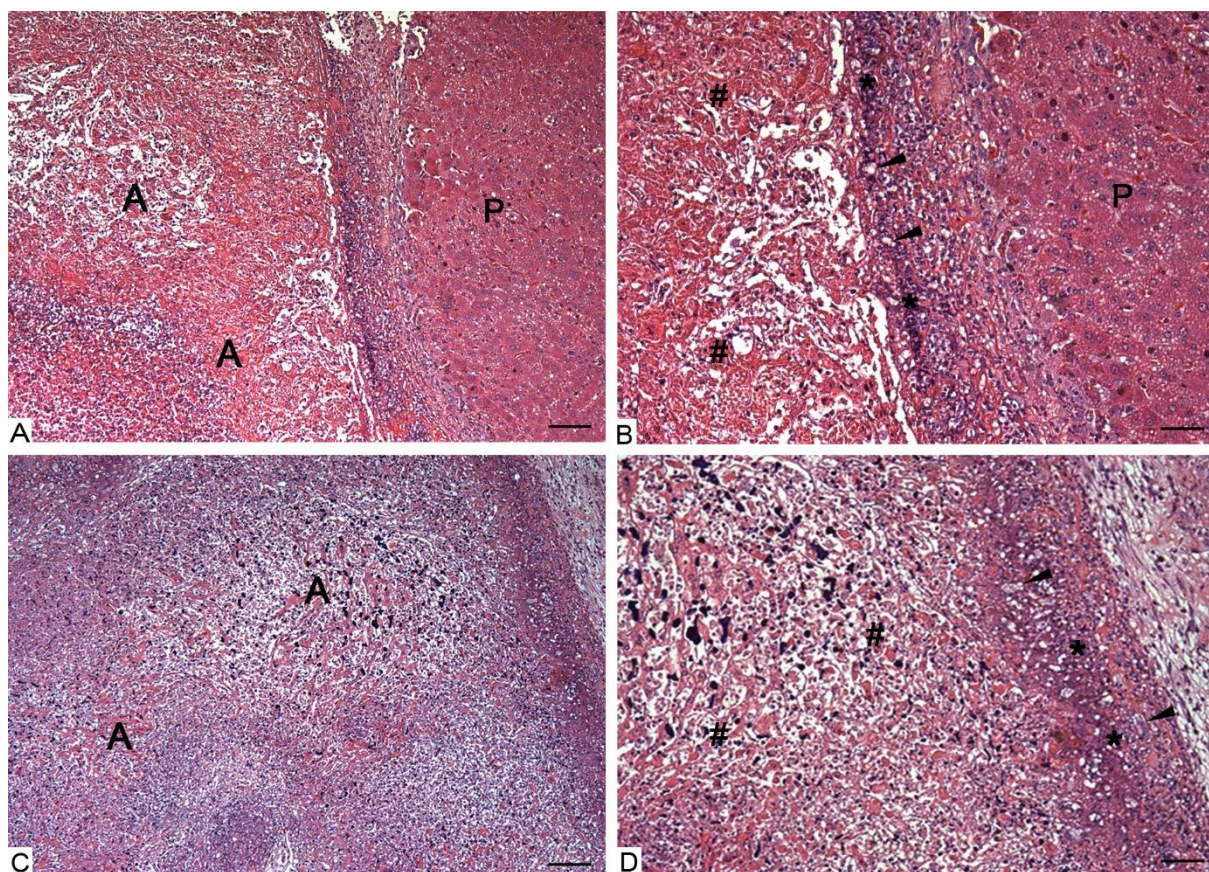
### 5.5 Análise histopatológica, semi-quantitativa e morfométrica do AHA induzido pelas cepas ACFN e ADO, associadas ou não à EPEC

Todas as cepas de *E. dispar* testadas foram capazes de produzir lesões amebianas e a análise microscópica revelou a presença de zonas de necrose liquefativa (Figura 5 A, B, C, D e 6 A, B, C, D). A necrose foi caracterizada pela presença de material acidófilo e granuloso, que por vezes se apresentava com pequenos depósitos basofílicos de calcificação (Figuras 5 B, D e 6 B, D). Também em toda a extensão da borda das zonas de necrose foram observados debris celulares com a presença de grande quantidade de núcleos em picnose, cariorrexe e cariólise (Figuras 5 B, D e 6 B, D). Além disto, nestas regiões notou-se a presença de discreto a moderado infiltrado inflamatório misto composto principalmente por neutrófilos e macrófagos e alguns eosinófilos. Frequentemente foram visualizados inúmeros



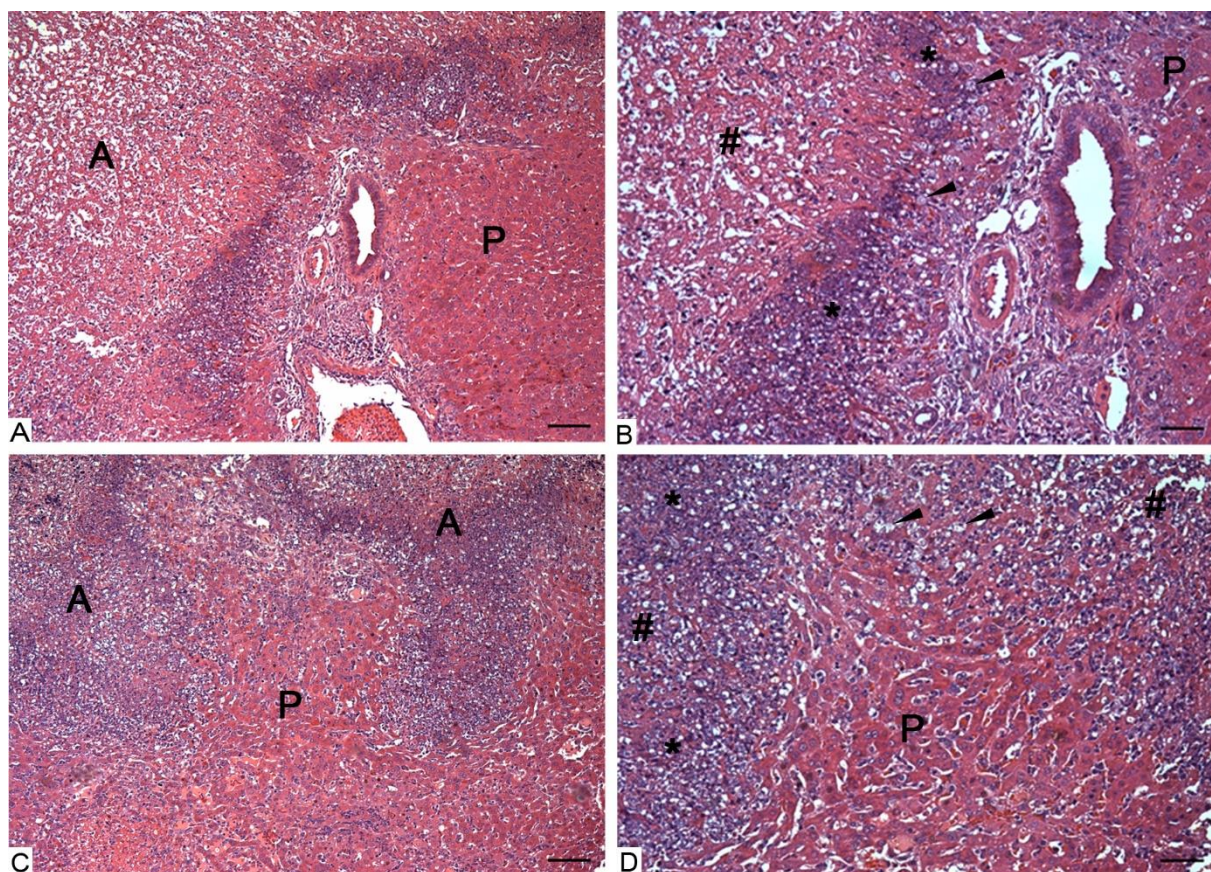
trofozoítos em meio à necrose (Figuras 5 B, D e 6 B, D). Diante da análise semi-quantitativa foi observado aumento da intensidade da inflamação do grupo ACFN-EPEC em comparação ao grupo EPEC ( $p= 0,0008$ ), e também aumento da presença de trofozoítos comparando os mesmos grupos ( $p= 0,0002$ ) (Tabela 2, Figura 7 A e B, e, Gráfico 9 A e B). Não houve diferença estatística na análise semi-quantitativa da intensidade da inflamação do grupo ADO em comparação ao ADO-EPEC ( $p= >0,9999$ ) e também da presença de trofozoítos ( $p= 0,81$ ) (Tabela 2, Figura 7 C e D, e, Gráfico 9 C e D). Não foram observadas alterações histopatológicas no fígado dos hamsters inoculados com o grupo EPEC e Salina.

A análise morfométrica das áreas de necrose demonstrou diferença significativa entre o grupo ACFN e ACFN-EPEC, com o aumento significativo do tecido necrosado produzido pela cepa ACFN quando associada à EPEC (Grupo ACFN-EPEC), corroborando com as observações macroscópicas e histopatológicas: ACFN ( $5,1 \times 10^6$ ) ( $3,0 \times 10^6$ - $9,3 \times 10^6$ ) e ACFN-EPEC ( $204,0 \times 10^6$ ) ( $19 \times 10^6$ - $252,0 \times 10^6$ ),  $p= 0,003$  (Gráfico 10 A). Não houve diferença significativa da análise morfométrica das áreas de necrose entre os grupos ADO e ADO-EPEC, também observado previamente nas análises macroscópica e microscópica: ADO ( $4,3 \times 10^6$ ) ( $0,1 \times 10^6$ - $37,4 \times 10^6$ ) e ADO-EPEC ( $3,0 \times 10^6$ ) ( $0,04 \times 10^6$ - $28,8 \times 10^6$ ) (Gráfico 10 B).



**Figura 5: Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com a cepa ACFN de *E. dispar*, associado ou não com a EPEC. (A)** Abscesso hepático amebiano (A) produzido pela cepa ACFN. Bar= 100µm. **(B)** Maior aumento da figura anterior demonstrando a necrose (#), circunscrita por áreas basofílicas representada por debris celulares (\*). Presença de trofozoítos de *E. dispar* (cabeças de seta). Bar= 50µm. **(C)** Abscesso hepático amebiano (A) produzido pela cepa ACFN em associação com a *Escherichia coli* enteropatogênica - EPEC (A). Bar= 200µm. **(D)** Maior aumento da figura anterior demonstrando a necrose (#), circunscrita por áreas basofílicas representada por debris celulares (\*). Presença de trofozoítos de *E. dispar* (cabeças de seta). Bar= 50µm. P=Parênquima não necrosado. Hematoxilina e Eosina.



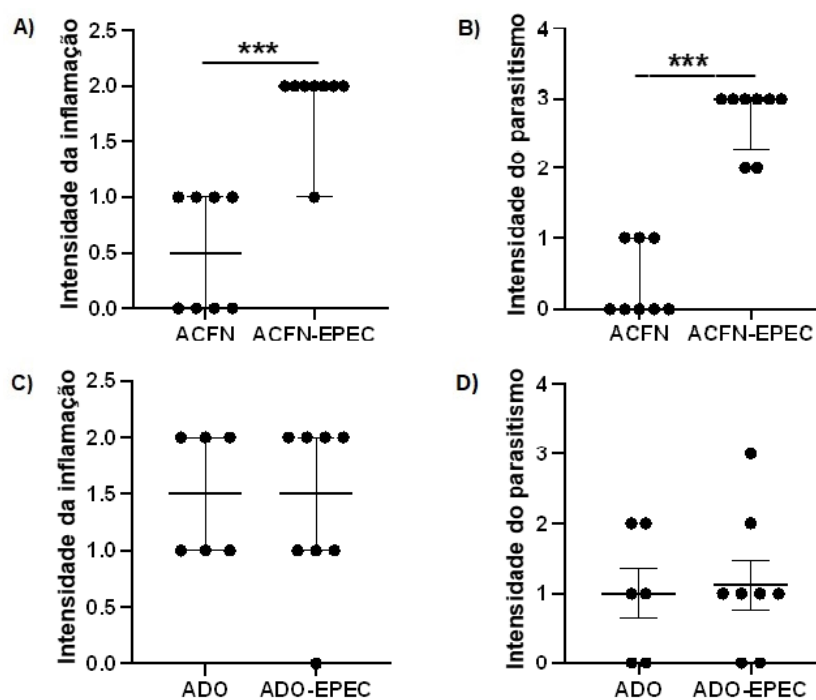


**Figura 6: Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com a cepa ADO de *E. dispar* associados ou não com a EPEC. (A)** Abscesso hepático amebiano (A) produzido pela cepa ADO. Bar= 100µm. **(B)** Maior aumento da figura anterior demonstrando a necrose (#), circunscrita por áreas basofílicas representada por debris celulares (\*). Presença de trofozoítos de *E. dispar* (cabeças de seta). Bar= 50µm. **(C)** Abscesso hepático amebiano (A) produzido pela cepa ADO em associação com a *Escherichia coli* enteropatogênica - EPEC (A). Bar= 200µm. **(D)** Maior aumento da figura anterior demonstrando a necrose (#), circunscrita por áreas basofílicas representada por debris celulares (\*). Presença de trofozoítos de *E. dispar* (cabeças de seta). Bar= 50µm. P=Parênquima não necrosado. Hematoxilina e Eosina.

Tabela 2: Análise semi-quantitativa da inflamação e do parasitismo.

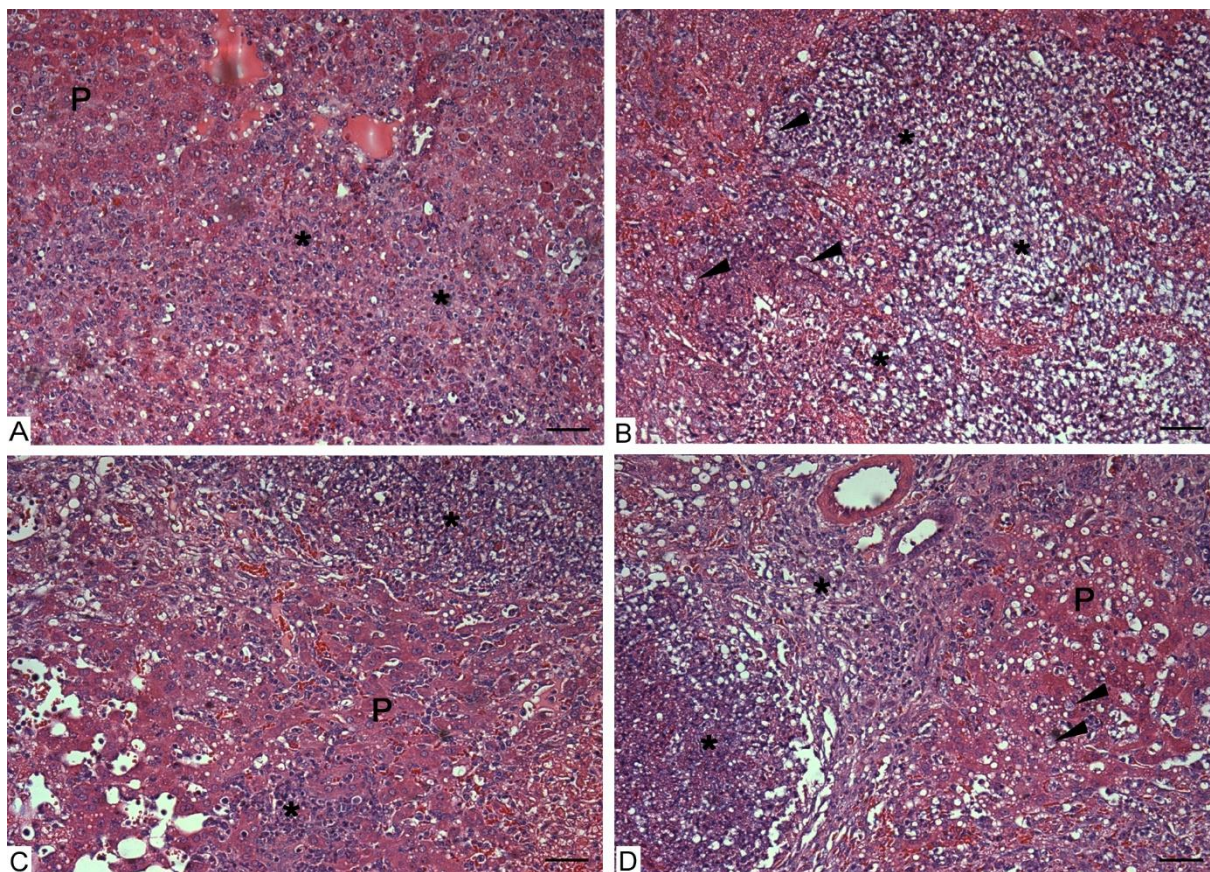
Grupo	Score da intensidade da inflamação					Score da intensidade do parasitismo				
	0 (%)	I (%)	II (%)	III (%)	p*	0 (%)	I (%)	II (%)	III (%)	p*
<b>ACFN</b>	50 %	50%	0%	0%	0,0008	63%	37 %	0%	0%	0,0002
<b>ACFN-EPEC</b>	0%	12%	88%	0%		0%	0%	25%	75%	
<b>ADO</b>	0%	50%	50%	0%	>0,9999	33%	33 %	34%	0%	0,81
<b>ADO-EPEC</b>	12 %	38%	50%	0%		24%	50 %	13%	13%	

0 = Ausência de inflamação ou parasitismo, I = Inflamação ou parasitismo discreto, II = Inflamação ou parasitismo moderado, III – Inflamação ou parasitismo intenso, (%) = percentual de animais categorizados no referido score. (p\*= 0,0008) Inflamação ACFN vs ACFN-EPEC, Teste Mann-Whitney; (p\*= 0,0002) Trofozoítos ACFN vs ACFN-EPEC, Teste Mann-Whitney; (p\*= > 0,9999) Inflamação ADO vs ADO-EPEC/ (p\*= 0,81), Teste Mann-Whitney; Trofozoítos ADO vs ADO-EPEC, Teste T não-pareado. vs= versus.

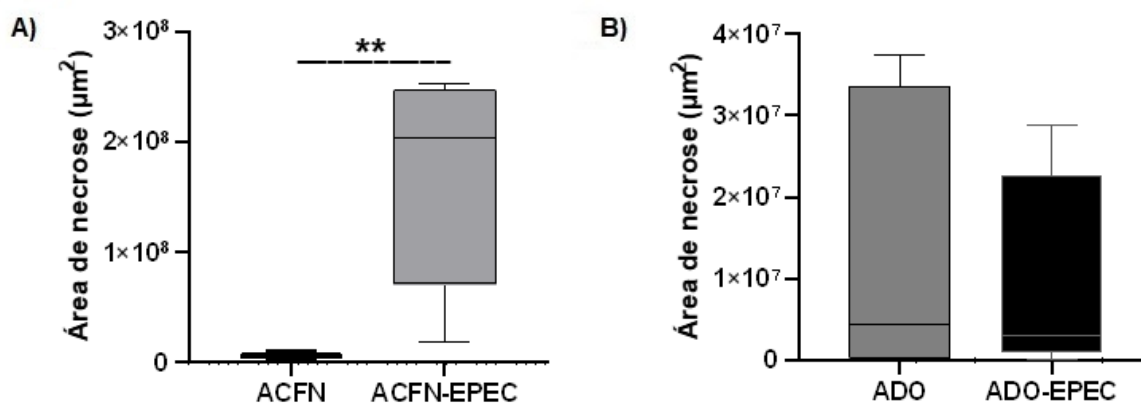


**Gráfico 9: Efeito da associação *in vitro* da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) com as cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar* sobre a inflamação e parasitismo hepáticos.** A) ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC, \*\*p= 0,0014. B) ACFN: Cultura da cepa ACFN não associada à EPEC. ACFN-EPEC: Cultura da cepa ACFN associada à EPEC, \*\*\*p= 0,0004 C) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC, p= >0,9999. D) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à EPEC. ADO-EPEC: Cultura da cepa ADO associada à EPEC, p=0,81. A, B e C) Teste de Mann-Whitney. Resultados expressos em mediana e interquartis. D) Teste T não-pareado. Resultados expressos em média e SEM.





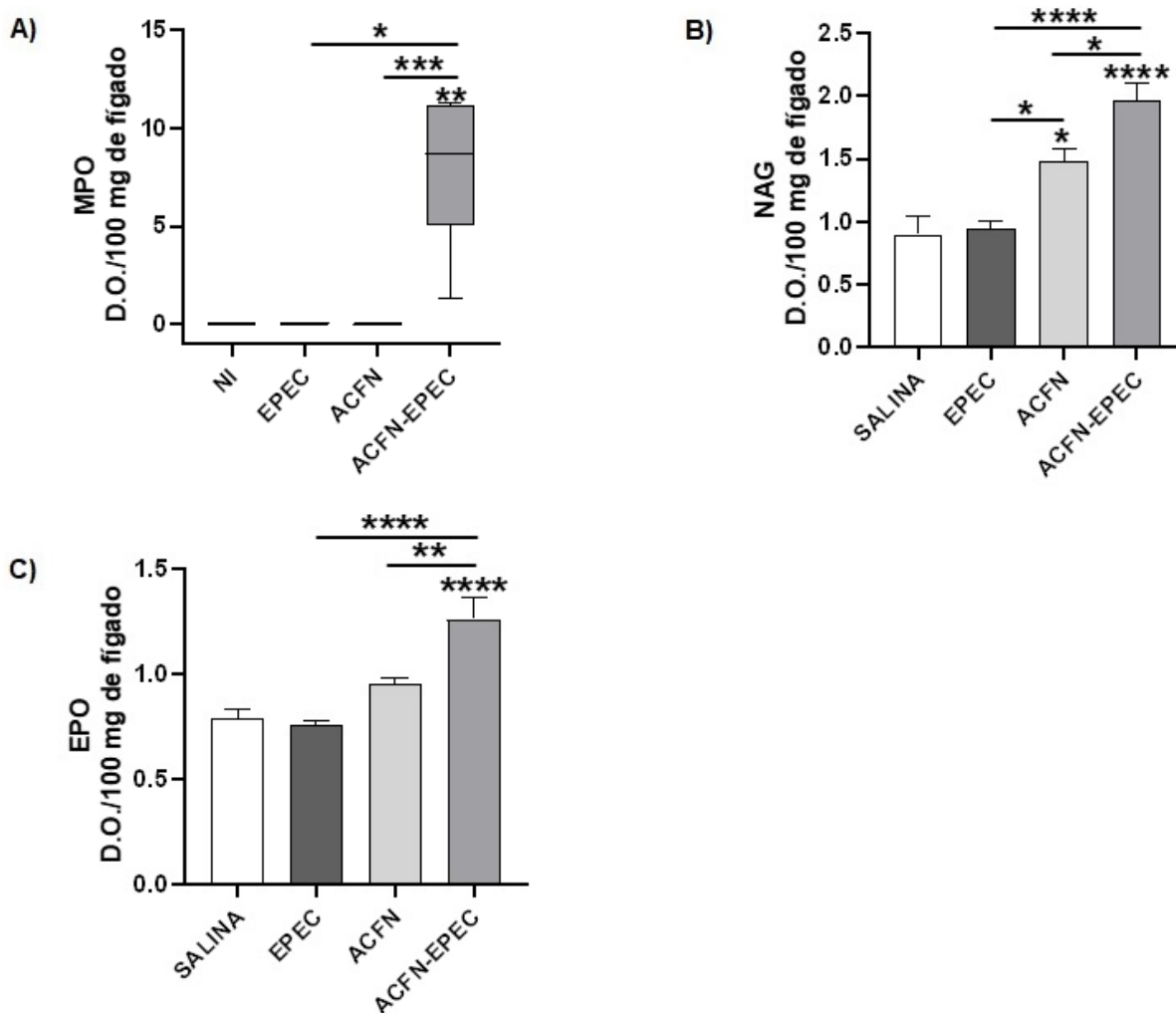
**Figura 7: Histopatologia do fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não com a EPEC. (A)** Área de inflamação (\*) produzida pela cepa ACFN. Bar= 50µm. **(B)** Área de inflamação (\*) produzida pela cepa ACFN associada à EPEC. Nota-se alguns trofozoítos em meio à inflamação (cabeças de seta). Bar= 50µm **(C)** Área de inflamação (\*) produzida pela cepa ADO. Bar= 50µm. **(D)** Área de inflamação (\*) produzida pela cepa ADO associada à EPEC. Nota-se alguns trofozoítos em meio à inflamação (cabeças de seta). Bar= 50µm. P=Parênquima não necrosado. Hematoxilina e Eosina.



**Gráfico 10: Área de necrose produzida pelas cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar* em associação ou não com a EPEC. A) ACFN: Cultura não associada. ACFN-EPEC: cultura associada à EPEC.  $p < 0,0003$ . B) ADO: Cultura não associada. ADO-EPEC: cultura associada à EPEC.  $p = 0,84$ . Foi utilizado o teste de Mann-Whitney e os resultados expressos em mediana, e intervalo interquartil.**

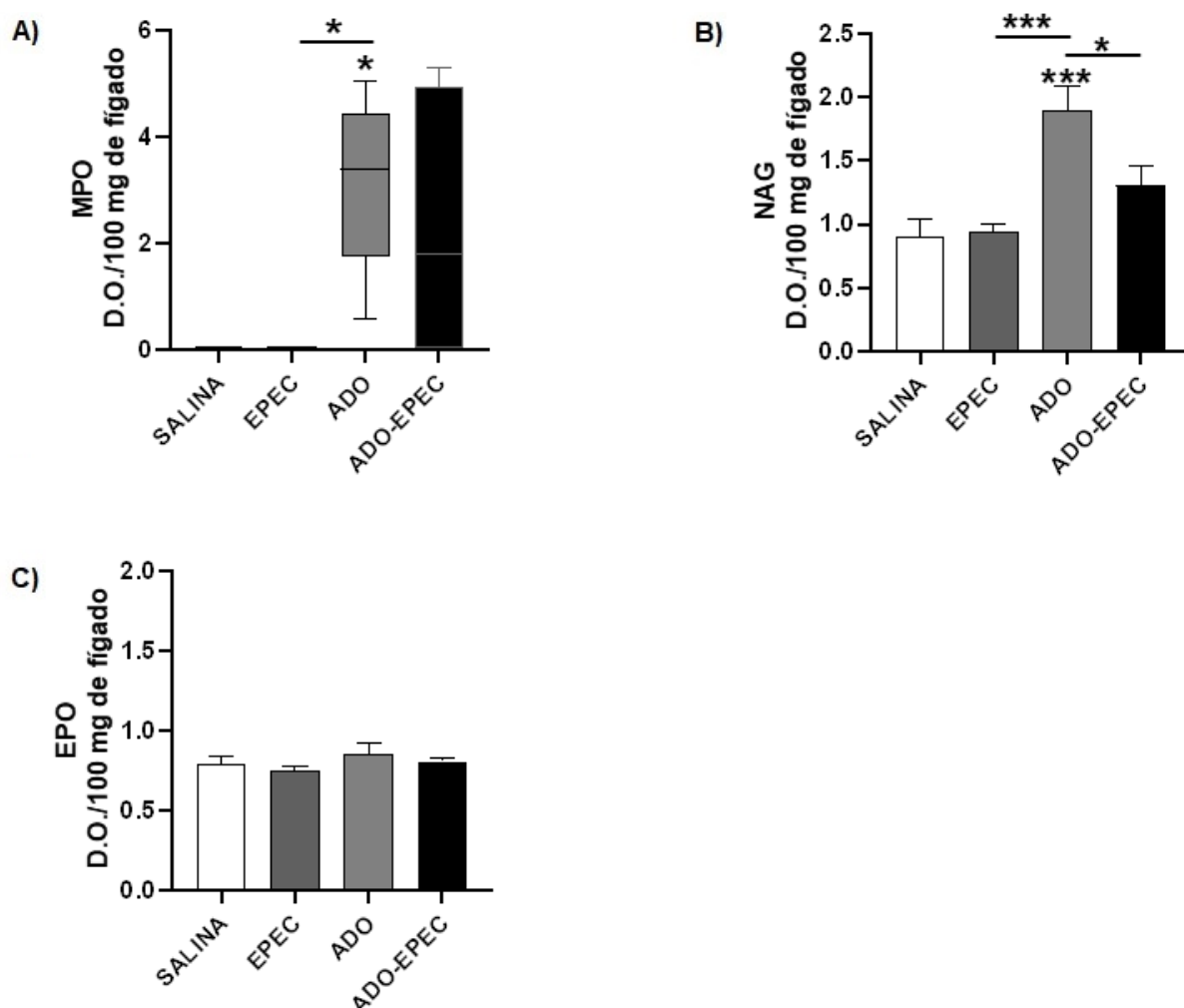
### 5.6 Atividade de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC

Após 18 horas de associação da cepa ACFN de *E. dispar* com a EPEC foi observado aumento significativo da atividade das enzimas MPO, NAG e EPO: MPO ACFN (0,03) (0,02 - 0,05) e MPO ACFN-EPEC (8,72) (1,31-11,32),  $p=0,0007$ ; NAG ACFN (1,48  $\pm$  0,10) e NAG ACFN-EPEC (1,96  $\pm$  0,15),  $p= 0,04$ ; EPO ACFN (0,95  $\pm$  0,03) e EPO ACFN-EPEC (1,26  $\pm$  0,10),  $p=0,008$  (Gráfico 11 A, B e C). Além disso, foi observado aumento significativo da atividade de MPO do grupo ACFN-EPEC em comparação aos grupos Salina (0,03) (0,02–0,06),  $p= 0,004$ , e, EPEC (0,04) (0,01–0,06),  $p= 0,02$  (Gráfico 11 A). A associação da EPEC à cepa ADO não foi capaz de alterar a atividade das enzimas MPO e EPO, mas foi capaz de diminuir a atividade de NAG: MPO ADO (3,39) (0,58–5,06) e MPO ADO-EPEC (1,82) (0,04–5,32),  $p= > 0,99$ ; NAG ADO (1,90  $\pm$  0,19) e NAG ADO-EPEC (1,31  $\pm$  0,15),  $p= 0,03$ ; EPO ADO (0,86  $\pm$  0,06) e EPO ADO-EPEC (0,81  $\pm$  0,02),  $p= 0,82$  (Gráfico 12 A, B e C). Também foi observado aumento significativo da atividade de: MPO do grupo ADO em comparação aos grupos Salina (0,03) (0,02–0,06),  $p= 0,02$ ; e, EPEC (0,04) (0,01–0,06),  $p= 0,04$ ; e; NAG do grupo ADO aos grupos Salina (0,90  $\pm$  0,14),  $p= 0,0003$ , e, EPEC (0,95  $\pm$  0,05),  $p= 0,0005$  (Gráfico 12 A e B).



**Gráfico 11: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetyl-β-glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) da cepa ACFN de *Entamoeba dispar* em associação ou não à *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). **A)** MPO grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ACFN: cultura não associada; ACFN-EPEC: Cultura associada à EPEC. **B)** NAG grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ACFN: cultura não associada; ACFN-EPEC: Cultura associada à EPEC. **C)** EPO grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ACFN: cultura não associada; ACFN-EPEC: Cultura associada à EPEC. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . **A)** Teste Kurskal-Wallis. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo. **B e C)** Teste One-way ANOVA. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM.**



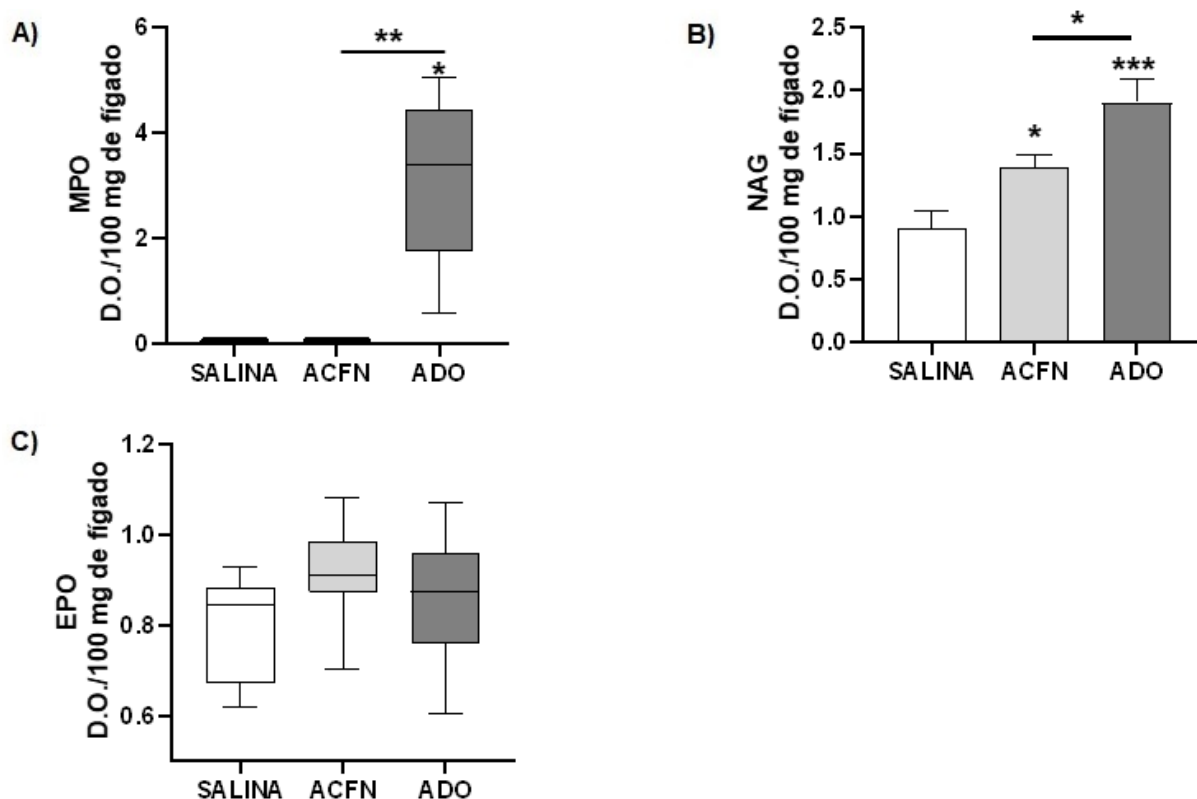


**Gráfico 12: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) da cepa ADO de *Entamoeba dispar* em associação ou não à *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). **A)** MPO grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ADO: cultura não associada; ADO-EPEC: Cultura associada à EPEC. **B)** NAG grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ADO: cultura não associada; ADO-EPEC: Cultura associada à EPEC. **C)** EPO grupos: Salina = NaCl 0,9%; EPEC: Somente bactéria; ADO: cultura não associada; ADO-EPEC: Cultura associada à EPEC. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$ . **A)** Teste Kurskal-Wallis. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo. **B e C)** Teste One-way ANOVA. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM.**

### 5.7 Comparação da atividade de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar*

Na análise da atividade das enzimas MPO, NAG e EPO entre as cepas de *E. dispar* foi observado um aumento significativo das enzimas MPO e NAG da cepa ADO em comparação à cepa ACFN: MPO ACFN (0,03) (0,02-0,05) e MPO ADO (3,39) (0,58-5,06),  $p = 0,006$ ; e; NAG ACFN ( $1,39 \pm 0,10$ ) e NAG ADO ( $1,90 \pm 0,19$ ),  $p = 0,04$  (Gráfico 13 A e B). Não foi observada diferença significativa da atividade de EPO entre

as cepas ACFN e ADO: ACFN (0,91) (0,70-1,08) e ADO (0,87) (0,61) (1,07),  $p = >0,99$  (Gráfico 13 C). Foi observado também aumento da atividade de: MPO entre a cepa ADO e o grupo Salina (0,03) (0,02-0,06),  $p = 0,02$ ; NAG entre o grupo ACFN e Salina (0,82) (0,52-1,61),  $p = 0,04$ ; e; ADO e Salina,  $p = 0,0003$  (Gráfico 13 A e B).

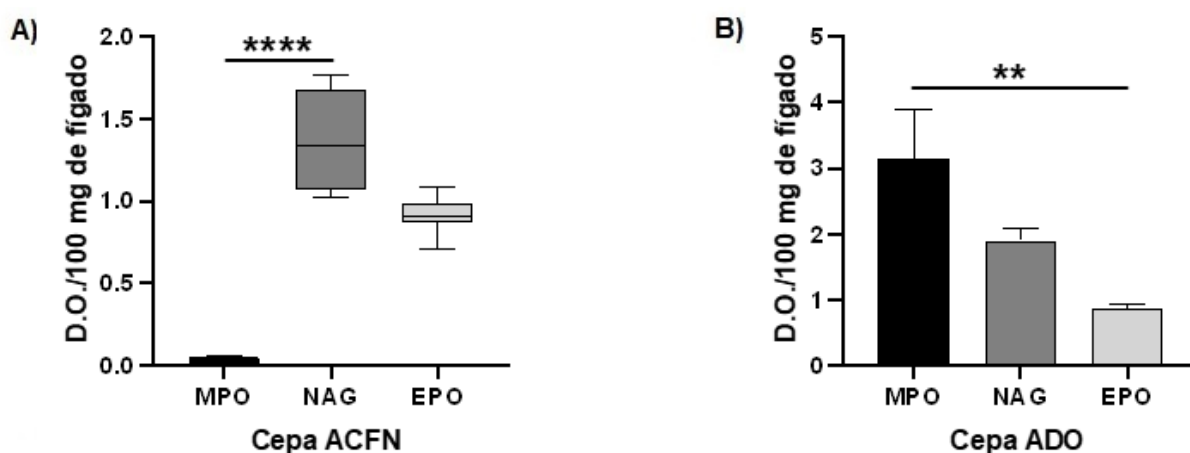


**Gráfico 13: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) entre as cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar*. A) MPO grupos: Salina = NaCL 0,9%; ACFN: inóculo com a cepa ACFN; ADO: inóculo com a cepa ADO. B) NAG grupos: Salina = NaCL 0,9%; ACFN: inóculo com a cepa ACFN; ADO: inóculo com a cepa ADO. C) EPO grupos: Salina = NaCL 0,9%; ACFN: inóculo com a cepa ACFN; ADO: inóculo com a cepa ADO. Cultura associada à EPEC. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ . A e C) Teste Kurskal-Wallis. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo. B) Teste One-way ANOVA. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM.**

### 5.8 Comparação entre as atividades de MPO, NAG e EPO no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar*

Na análise da atividade entre as enzimas MPO, NAG e EPO para cada cepa de *E. dispar* estudada nos experimentos *in vivo* (ACFN e ADO), foi observado uma diferença no padrão de atividade delas. Em relação à atividade de MPO, NAG e EPO da cepa ACFN, foi observado um aumento significativo da atividade de NAG em relação à MPO, não havendo nenhuma diferença para a atividade de EPO: MPO

ACFN 0,03 (0,02-0,05) e NAG ACFN (1,34) (1,02-1,76),  $p < 0,0001$ ; MPO ACFN e EPO ACFN (0,91) (0,70-1,08),  $p = 0,052$ ; NAG ACFN e EPO ACFN,  $p = 0,06$  (Gráfico 14 A). Em relação à atividade de MPO, NAG e EPO da cepa ADO, foi observado um aumento significativo da atividade de MPO em relação à EPO, não havendo nenhuma diferença para a atividade de NAG: MPO ADO ( $3,16 \pm 0,73$ ) e EPO ADO ( $0,86 \pm 0,06$ ),  $p = 0,003$ ; MPO ADO e NAG ADO ( $1,90 \pm 0,19$ ),  $p = 0,10$ ; NAG ADO e EPO ADO,  $p = 0,16$  (Gráfico 14 B).



**Gráfico 14: Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NAG) e peroxidase de eosinófilos (EPO) para as cepas ACFN e ADO de *Entamoeba dispar*. A) MPO, NAG e EPO do grupo ACFN. B) MPO, NAG e EPO do grupo ADO. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ . A) Teste Kurskal-Wallis. Resultados expressos em mediana, mínimo e máximo. B) Teste One-way ANOVA. Resultados expressos em média  $\pm$  SEM.**

### 5.9 Análise de correlação entre a atividade de MPO e a área de necrose no grupo ACFN

Foi encontrada correlação positiva entre a atividade da enzima MPO e a área de necrose da cepa ACFN ( $p=0,01$ ;  $r=0,60$ ).

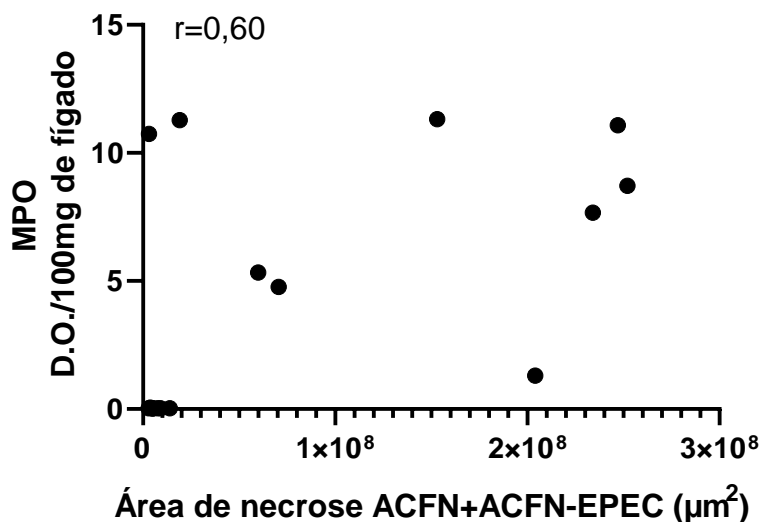


Gráfico 15: Análise de correlação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) com a área de necrose dos grupos ACFN e ACFN-EPEC.  $p=0,01$ ;  $r=0,60$ . Correlação de Spearman.

### 5.10 Expressão relativa das citocinas IL-5, IL-10, IL-12, IFN $\gamma$ e TGF- $\beta$ do fígado de hamsters inoculados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* associadas ou não à EPEC.

Diante da ocorrência de problemas para determinar a expressão relativa das citocinas, tal análise será repetida posteriormente.

## 6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da EPEC sobre as cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar*, comparando os grupos associados aos não-associados à bactéria. Paralelamente, as cepas também foram comparadas entre si, visto que possuem graus de patogenicidade diferentes, conforme estudos prévios do nosso grupo (DA SILVA et al., 2021). Foram avaliadas a capacidade de eritrofagocitose dos trofozoítos amebianos da cepa ACFN frente à associação, a expressão *in vitro* dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2, APA e APC das culturas das cepas ACFN, ADO e VEJ associadas ou não à EPEC, no parênquima hepático de hamsters experimentalmente infectados com as cepas ACFN e ADO associadas ou não à EPEC, a expressão dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2, APA e APC, a área de necrose hepática, a histopatologia e atividade das enzimas MPO, NAG e EPO. Vale ressaltar que até o momento, não foram realizados estudos avaliando a influência da EPEC em cepas de *E. dispar*. Os achados mais relevantes deste estudo foram que as cepas de *E. dispar* são influenciadas de maneiras diferentes pela EPEC. A cepa ACFN quando associada à EPEC demonstrou aumentar os fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc e CP2, a área de necrose e inflamação hepática, e, de induzir o aumento da atividade enzimática de MPO, NAG e EPO. Em contrapartida, a influência da EPEC à cepa ADO não levou ao aumento dos mesmos fatores de virulência, nem diferenças da área de necrose, inflamação e para as atividades das enzimas MPO e EPO.

Os trofozoítos utilizam a lectina ligante de Gal/GalNAc para se ligarem aos eritrócitos, fazendo com que eles se tornem arredondados e crenados, levando à externalização da molécula de fosfatidilserina destas células, para assim, fagocitá-las (BOETTNER et al., 2005). O ensaio de eritrofagocitose é utilizado para estimar, de forma qualitativa, a virulência dos trofozoítos, sendo útil na diferenciação das espécies *E. dispar* e *E. histolytica* (TALAMÁS-LARA et al., 2014). A *E. dispar* possui menor capacidade de eritrofagocitose do que a *E. histolytica*, devido a menor capacidade de adesão de eritrócitos e fagocitose (BOETTNER et al., 2005; DA SILVA et al., 2021). Estudo de nosso grupo evidenciou que as cepas de *E. dispar* apresentam patogenicidades distintas, entretanto, ao comparar a capacidade de eritrofagocitose entre elas, não há diferenças significativas (DA SILVA et al., 2021). Logo, o método não demonstrou ser tão eficaz na avaliação da virulência entre as cepas de *E. dispar*,

visto que ela se correlaciona com a patogenicidade experimental. Nosso estudo avaliou a capacidade de eritrofagocitose da cepa ACFN associada à EPEC e não foram observadas diferenças significativas entre o grupo ACFN e ACFN-EPEC, demonstrando que o método também parece não ser o mais adequado para avaliar a virulência das cepas de *E. dispar* em simbiose com bactérias enteropatogênicas.

Os trofozoítos da *E. dispar* e *E. histolytica*, durante a colonização intestinal, fagocitam bactérias, células do hospedeiro e outros conteúdos do lúmen intestinal, podendo ou não levar o desenvolvimento de lesões (CHRISTY; PETRI, 2011). A simbiose entre amebas e outros organismos vivos vêm sendo estudada ao longo dos anos, e as bactérias parecem contribuir para o desenvolvimento de lesões pela *E. dispar* (COSTA et al., 2006). Estudos já identificaram que na presença de bactérias entéricas e enteropatogênicas, as amebas são capazes de aumentar a expressão de fatores de virulência, tais como a lectina ligante de Gal/GalNAc e as cisteína proteinases, importantes fatores de virulência amebianos que contribuem para a patogênese dos trofozoítos (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2021; SINGH; NAIK; NAIK, 2004).

A axenização e monoxenização são técnicas que possibilitam a avaliação da relação entre os trofozoítos e bactérias, sendo a primeira a eliminação completa da microbiota indígena do paciente com uso de antibióticos, e a segunda, a eliminação das bactérias (ao uso de antibióticos) e adição do protozoário *Crithidia fasciculata* um tripanossomatídeo não patogênico (COSTA et al., 2006). Estudos realizados com cultivos axênicos e monoxênicos de *E. dispar* revelaram que, na presença de bactérias entéricas no cultivo, os trofozoítos são capazes de provocar lesões hepáticas experimentais, e, em contrapartida, na ausência delas não há o desenvolvimento de lesões (COSTA et al., 2006; ESPINOSA CANTELLANO; CASTAÑÓN GUTIÉRREZ; MARTÍNEZ-PALOMO, 1997). Além disso, o inóculo isolado de bactérias da microbiota indígena não levou ao desenvolvimento experimental de lesões hepáticas em hamsters (COSTA et al., 2006; DA SILVA et al., 2021). A interação da EPEC aumentou a virulência de trofozoítos da cepa HM1:MSS de *E. histolytica* com a EPEC, levando ao aumento de destruição das monocamadas de células CaCO<sub>2</sub> (Células de adenocarcinoma colorretal humano, utilizada como modelo de barreira epitelial intestinal) (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019). No presente estudo utilizamos cepas polixênicas de *E. dispar*, sendo estas associadas à

microbiota indígena do paciente ao qual foram isoladas e à EPEC, e, as cepas ACFN e ADO foram capazes de desenvolver lesões amebianas no fígado de hamsters infectados, assim como outros estudos já realizados (DA SILVA et al., 2021; SHIBAYAMA; et al., 2007). Além disso, o fígado de hamsters inoculados somente com a bactéria EPEC não apresentaram lesões, reforçando que a patogenicidade das lesões obtidas na associação se deu pelos trofozoítos de *E. dispar*.

A lectina ligante de Gal/GalNAc é um importante fator de virulência utilizado pelos trofozoítos da *E. dispar* e *E. histolytica* para se ligarem à camada de mucina do intestino grosso e colonizarem o hospedeiro, além de possuir homologia com a molécula CD19, sendo capaz de impedir a formação do complexo de ataque à membrana C5b-C9, contribuindo para a evasão amebiana do sistema imune (HAQUE et al., 2003). O gene Gal/GalNAc está relacionado com o desenvolvimento da amebíase invasiva, e sintetiza um heterodímero composto por subunidades leve, intermediária e pesada, de 35kDa, 150kDa e 170kDa (WILSON et al., 2019). Leroy e colaboradores (1995) evidenciaram que a *E. histolytica* é capaz de transferir parte ou molécula inteira da lectina ligante de Gal/GalNAc para a superfície dos enterócitos, o que precede a morte celular da célula do hospedeiro (LEROY et al., 1995). A transferência também ocorre para hepatócitos, células sinusoidais e inflamatórias. Todas as células do hospedeiro que apresentaram a lectina ligante de Gal/GalNAc em sua superfície ou citoplasma apresentavam sinais de dano celular, reforçando a importância desta como fator de virulência, não somente na amebíase intestinal, mas também na invasiva (PACHECO, 2004). Além disso, a lectina foi encontrada em hepatócitos localizados em regiões mais distantes da presença de trofozoítos, inferindo que a molécula se difunde no parênquima hepático (PACHECO, 2004).

Diante da análise *in vitro* da expressão relativa da lectina ligante de Gal/GalNAc em culturas de *E. dispar* associadas ou não à EPEC, o grupo ACFN-EPEC apresentou maior expressão do que o ACFN, o grupo ADO-EPEC apresentou uma diminuição em relação ao ADO, e, o grupo VEJ-EPEC e VEJ não foram observadas diferenças significativas. A cepa ADO de *E. dispar* já foi associada à bactéria *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium (*S. typhimurium*) e a expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc foi avaliada, demonstrando aumento para a cultura associada à enterobactéria (OLIVEIRA et al., 2021), o que nos permite observar que a associação da cepa com diferentes espécies de bactérias pode levar respostas diferentes pelos

trofozoítos, no que tange os fatores de virulência. Além disso, foi observado que a cepa ADO associada à *S. typhimurium* aumentou a área de lesão intestinal em ratos infectados (OLIVEIRA et al., 2021). A análise *in vivo* da expressão da lectina Gal/GalNAc demonstrou padrão diferente da *in vitro*, pois a cepa ADO associada à EPEC não alterou sua expressão da molécula. Costa e colaboradores (2006), em estudo avaliando a patogenicidade de cepas polixênicas de *E. dispar* através da inoculação hepática em hamsters e avaliação do efeito citopático em células da linhagem VERO (células epiteliais), não observaram correlação entre os experimentos *in vitro* e *in vivo*, foram capazes de desenvolver lesões experimentais, indicando a possibilidade de mecanismos diferentes de patogenicidade e/ou interação com as células do hospedeiro (COSTA et al., 2006). Possivelmente a lectina ligante de Gal/GalNAc é um dos principais fatores envolvidos na expansão da necrose hepática por trofozoítos de *E. dispar* associados à EPEC, visto que no experimento *in vivo* foi observado aumento da área de necrose do grupo ACFN-EPEC quando comparado ao ACFN, mas não houve diferenças entre os grupos ADO e ADO-EPEC, o que paralelamente parece influenciar o padrão da expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc de cada grupo. Trofozoítos com a função interrompida da lectina Gal/GalNAc levam à formação de menores focos inflamatórios ao redor dos vasos sanguíneos hepáticos, o que se associa também ao baixo influxo de neutrófilos e macrófagos, e, ausência de fator de necrose tumoral, demonstrando o papel imunogênico da lectina (BLAZQUEZ et al., 2007).

As cisteína proteinases são enzimas importantes na patogênese da amebíase, e desempenham diversos processos essenciais à invasão amebiana: degradam a camada de mucina, importante barreira inata epitelial, permitindo assim o contato de trofozoítos com a mucosa; degradam as moléculas colágeno, laminina e outros componentes da matriz extracelular, contribuindo para a motilidade amebiana no parênquima; e; degradam as proteínas séricas do complemento, C3a e C5a, reduzindo de certa forma a atividade inflamatória (HAQUE et al., 2003; QUE; REED, 1997, 2000; REED et al., 1995). Os isotipos CP1, CP2 e CP5 são responsáveis por cerca de 90% da atividade de todas as CPs das amebas (BRUCHHAUS et al., 1996). Curiosamente observados diferenças na expressão relativa da CP2 no cultivo das cepas ACFN, ADO e VEJ de *E. dispar* associadas à EPEC. Houve diminuição da expressão da CP2 dos grupos ACFN e ADO quando comparados aos grupos ACFN-



EPEC e ADO-EPEC, respectivamente, enquanto não foram observadas diferenças significativas entre os grupos VEJ e VEJ-EPEC, demonstrando que a EPEC influenciou de maneiras diferentes, assim como na lectina ligante de Gal/GalNAc, a expressão da CP2. Ainda mais interessante foi a observação da expressão da CP2 no parênquima hepático de hamsters infectados com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar*, associados ou não à EPEC: o grupo ACFN-EPEC expressou mais CP2 quando comparado ao grupo ACFN, e, o grupo ADO e ADO-EPEC não apresentaram nenhuma diferença significativa.

Corroborando com os resultados já encontrados por Costa e colaboradores (2006), a virulência das cepas de *E. dispar* são diferentes quando se comparam os perfis *in vivo* e *in vitro*. Paralelamente, foi observado aumento da área de necrose do grupo ACFN-EPEC quando comparado ao EPEC e nenhuma diferença entre os grupos ADO e ADO-EPEC, o que se assemelha ao padrão da expressão da CP2 das mesmas cepas no experimento *in vivo*. A superexpressão de CP2 em trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica* foi capaz de aumentar a destruição de monocamadas de células CHO, mas não aumentou a capacidade eritrofagocitose e nem a área de abscesso hepático experimental (HELLBERG et al., 2001). Apesar de estudo prévio não demonstrar que a CP2 possa estar envolvida na patogênese do AHA, nossos achados demonstram que a CP2 pode ter relação com o processo, visto que a comparação do grupo ACFN-EPEC ao ACFN no experimento *in vivo* evidenciamos aumento da expressão relativa de CP2 e de necrose do parênquima hepático. Corroborando com os nossos achados, um estudo avaliando amostras de AHA humanos evidenciou que, nestas amostras, ocorreu uma superexpressão das CPs 2 e 5, demonstrando importância destas CP2 na patogênese da doença, visto que contribuem para a mobilidade dos trofozoítos e depressão do sistema imune. Estudo evidenciou que a cepa ADO de *E. dispar* associada à *S. typhimurium* aumentou *in vitro* a expressão de CP5 (OLIVEIRA et al., 2021), demonstrando mais uma vez que diferentes bactérias influenciam de maneiras diferentes os trofozoítos de *E. dispar*.

As amebaporos são proteínas semelhantes à NK-lisina, capazes de formar poros na membrana de células do hospedeiro, correspondendo a um importante fator de virulência. Possuem três isoformas, A, B e C, sendo a APA a fração com maior atividade (LEIPPE, 1995). A *E. dispar* é capaz de produzir as mesmas isoformas de amebaporos, que também podem ser denominados de disparporos. Entretanto, as

amebaporos A e B da *E. dispar* possuem atividade 56% e 57% menor do que os amebaporos A e B da *E. histolytica*, respectivamente. Além disso, as isoformas possuem A, B e C possuem 95%, 91% e 88% de semelhança entre as espécies, respectivamente (NICKEL et al., 2001).

Um estudo de virulência e patogenicidade utilizando a cepa mutante HM-1:IMSS de *E. histolytica*, deficiente de APA, verificou que na ausência deste fator de virulência não havia o desenvolvimento de AHAs em hamsters, nem com inóculos contendo altas concentrações de trofozoítos (1 milhão de trofozoítos por fígado de hamster) (BUJANOVER et al., 2003). Nossos resultados verificaram uma ausência de expressão de amebaporo A das cepas ACFN e ADO, em todos os grupos, com ou sem a associação à EPEC, nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Apesar disto, todos os grupos experimentais desenvolveram lesões amebianas típicas, o que nos leva a pensar que este fator de virulência não é um dos principais envolvidos na patogênese hepática pela *E. dispar*. Recentemente foi observado que a cepa HM1:MSS de *E. histolytica* em interação com a EPEC aumentou a expressão de APA (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019). As isoformas A das *E. dispar* e *E. histolytica* possuem 81% de semelhança na composição de aminoácidos (NICKEL et al., 2001), o que também pode explicar a diferença de comportamento biológico entre as espécies.

DAS e colaboradores (1999) avaliaram a expressão das amebaporos entre a *E. dispar* e *E. histolytica* e não observaram a expressão da APC (DAS; DEBNATH; MUÑOZ, 1999). Em contrapartida, estudos identificaram a presença desta isoforma em culturas de trofozoítos de *E. dispar* (OLIVEIRA et al., 2021), assim como o nosso presente trabalho. Apesar disto, não houve diferença na expressão relativa da APC entre os grupos ACFN e ACFN-EPEC, e, ADO e ADO-EPEC. Logo, a EPEC não influenciou nem positivamente, nem negativamente a expressão deste fator de virulência. Estudo já realizado com diversas espécies de bactérias evidenciou que o APC é a isoforma menos eficaz na lise de bactérias *E. coli* (LEIPPE et al., 1994), o que corrobora com os achados de nosso trabalho. Além disso, a APC provoca despolarização de lipossomas mais rapidamente que as outras isoformas, e os canais inseridos da membrana bacteriana são menores, contribuindo para um menor efeito bactericida (LEIPPE et al., 1994).

Os trofozoítos são capazes de fagocitar células, tais como bactérias e células do hospedeiro. Após a fagocitose de bactérias, elas são encontradas no citoplasma

de trofozoítos, cobertas de amebaporos e desintegradas (ANDRÄ; HERBST; LEIPPE, 2003). As amebaporos são capazes de lisar bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo a membrana plasmática o primeiro alvo. A lise é mais eficiente para as bactérias gram-positivas do que nas gram-negativas, provavelmente por estas últimas apresentarem composição química diferente, como o lipopolissacarídeo, ou baixo potencial de membrana (LEIPPE, 1999). Estudo realizado com cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* K12 e *E. coli* K12 D31 evidenciou que as cepas de *E. coli* necessitavam de maior concentração de amebaporos para sofrerem lise, corroborando com os resultados já encontrados (ANDRÄ; HERBST; LEIPPE, 2003). Apesar disto, estudos já observaram que a *E. coli* é importante para o crescimento amebiano, pois fornece suporte nutricional para os trofozoítos (MENDOZA-MACÍAS et al., 2009).

A comparação da expressão da lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2 e da APC entre as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* não nos mostrou diferenças significativas para nenhum dos fatores de virulência descritos anteriormente. Estudo realizado pelo nosso grupo já evidenciou claramente diferença na patogenicidade das cepas MCR, ACFN, ICS, ADO, e VEJ de *E. dispar* (DA SILVA et al., 2021). Certamente os fatores de virulência estão envolvidos na diferente capacidade de provocar lesões de cada uma destas cepas. Entretanto, fizemos a determinação da expressão relativa dos genes dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc, CP2, APA e APC em parênquima hepático de hamsters eutanasiados 3 dias após a infecção. Previamente, nosso grupo já havia identificado que ao terceiro dia de infecção hepática experimental em hamster, as cepas ACFN e ADO não apresentaram diferença significativa para área de necrose hepática desenvolvida (DA SILVA et al., 2021). Entretanto, a área de tecido de granulação da cepa ADO foi maior quando comparado à cepa ACFN, ao terceiro dia de infecção. Isto nos mostra que a cepa ADO já apresentava ao terceiro dia sinais de reparo tecidual. No oitavo dia após a infecção a área de necrose da cepa ACFN já era significativamente maior do que a cepa ADO (DA SILVA et al., 2021), o que nos leva a associar que, provavelmente, os fatores de virulência da cepa ACFN seriam mais expressos com maior tempo de infecção, e que esta diferença não foi observada no nosso estudo devido entre a infecção e a eutanásia especificados (3 dias).

As cepas ACFN e ADO de *E. dispar* foram isoladas de indivíduos assintomático e portador de colite não disentérica, respectivamente. Previamente, a cinética realizada por nosso grupo evidenciou que a cepa isolada do indivíduo assintomático (ACFN) é substancialmente mais patogênica do que da isolada do indivíduo sintomático (ADO) (DA SILVA et al., 2021). Nosso estudo demonstrou que a cepa ACFN parece aumentar o seu potencial patogênico na presença da EPEC, o que foi observado durante a macroscopia, na observação de maiores áreas de AHA no grupo ACFN-EPEC, quando comparado ao ACFN. Para os hamsters inoculados com os grupos ADO e ADO-EPEC, não foram observadas diferenças macroscópicas no tamanho das lesões hepáticas, o que nos permite inferir que a EPEC não teria a mesma influência sobre esta cepa. Tal observação foi confirmada através da análise morfométrica da necrose hepática, onde observamos aumento da necrose hepática do grupo ACFN-EPEC em relação ao EPEC, e, nenhuma diferença da área de necrose do grupo ADO e ADO-EPEC. Vale ressaltar que não foram observadas alterações macroscópicas no fígado dos hamsters inoculados com os grupos Salina e EPEC, demonstrando que as lesões encontradas nos grupos ACFN, ACFN-EPEC, ADO e ADO-EPEC foram decorrentes da ação de trofozoítos.

Diante da análise histopatológica, observamos a presença de zonas de necrose de liquefação, representada por material amorfo e acidofílico granuloso, e que às vezes apresentava pequenos depósitos basofílicos de calcificação. Tais zonas se apresentavam circunscritas por zona de debris celulares, com a presença de grande quantidade de núcleos em picnose, cariorrexe e cariólise. Foram encontrados inúmeros trofozoítos localizados em meio à zona de necrose. Nossos resultados estão de acordo com a literatura científica (COSTA et al., 2000; DA SILVA et al., 2021; FURST et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2021). Adicionalmente observamos que, além da diferença da área de necrose das cepas ACFN e ADO de *E. dispar* quando comparadas à EPEC, houve diferença entre o padrão inflamatório das cepas associadas. Os grupos ACFN, ACFN-EPEC, ADO e ADO-EPEC apresentaram de discreto à moderado infiltrado inflamatório misto composto principalmente por neutrófilos e macrófagos. O grupo ACFN-EPEC apresentou maior infiltrado inflamatório em relação ao grupo ACFN, e uma intensidade de parasitismo maior. Para grupo ADO e ADO-EPEC não foram observadas diferenças semi-quantitativas, nem no infiltrado inflamatório, nem na intensidade do parasitismo. Estudos evidenciaram

que após a inoculação intraportal de trofozoítos em fígado de hamsters, eles são vistos rapidamente nos sinusóides hepáticos e cercados por neutrófilos. Os trofozoítos são capazes de lisar as células inflamatórias, levando à liberação de mediadores inflamatórios, causando a morte de hepatócitos ao redor deles e dos mais distantes. (STANLEY; REED, 2001).

Resultados controversos têm sido publicados à cerca do papel da imunidade na patogênese da amebíase. No AHA, o infiltrado inflamatório é discreto quando se compara à extensa zona de necrose (TSUTSUMI; MARTINEZ-PALOMO, 1988). Apesar disto, na depleção de neutrófilos, camundongos experimentalmente infectados apresentam AHAs maiores em relação aos não depletados (STANLEY; REED, 2001). Estudo avaliando a infecção hepática experimental de *E. dispar* e *E. histolytica* em camundongos tratados com dexametasona observou que os grupos imunossuprimidos de ambas as espécies apresentavam significativamente menor área de necrose e menor número de trofozoítos, o que sugere que a inflamação contribui para a multiplicação de trofozoítos (COSTA et al., 2011). Possivelmente, a inflamação parece estimular a transcrição dos fatores de virulência amebianos, levando à amplificação da lesão. Corroborando com os dados acima descritos, a EPEC aumentou a expressão da lectina ligante de Gal/GaINAc da cepa ACFN, importante fator de virulência que é capaz de lisar células alvo. Como consequência aumentou o recrutamento de células imunes, evidenciada pela análise histopatológica semi-quantitativa, e as zonas de debris celulares, o que nos permite inferir que houve um aumento da morte de células inflamatórias. A associação da EPEC à cepa ACFN pareceu contribuir com a multiplicação de trofozoítos no parênquima hepático. Além do efeito citolítico dos trofozoítos, a liberação dos mediadores inflamatórios parece contribuir também para a expansão do AHA.

A infiltração e atividade de leucócitos em tecidos pode ser avaliada através da atividade das enzimas: mieloperoxidase (MPO), presentes nos grânulos dos neutrófilos; N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), presente no citoplasma de macrófagos; e; eosinófilo peroxidase (EPO), presente nos grânulos dos eosinófilos (BAILEY, 1988; LANNA et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2016). Além da associação da EPEC às cepas ACFN e ADO de *E. dispar* levar à diferentes níveis de infiltrado inflamatório, também foi observada diferença no perfil de ativação de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos. O grupo ACFN-EPEC aumentou as atividades de MPO,

NAG e EPO quando comparado ao grupo ACFN, enquanto o grupo ADO-EPEC diminuiu a atividade de NAG quando comparado ao grupo ADO. Os neutrófilos são o tipo celular mais importante durante os estágios iniciais de infecção amebiana e, quando devidamente ativados, eliminam alguns trofozoítos através da ativação de mecanismos oxidativos e não oxidativos, tais como a formação de NETs (Neutrophil extracellular traps), degranulação celular, geração de radicais livres ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , HOCl) e ativação de enzimas como a MPO e a NADPH-oxidase (CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2016). A enzima MPO se liga à superfície dos trofozoítos e é capaz de realizar atividade amebicida utilizando do peróxido de hidrogênio produzido pelas próprias amebas. Além disso, leva a alterações da forma do trofozoíto, bem como alterações como intensa vacuolização citoplasmática, alterações nucleares e lise dos trofozoítos por ruptura da membrana plasmática (PACHECO-YÉPEZ et al., 2011). Durante o período inicial de 3-6 horas de infecção hepática pela *E. histolytica*, a quantidade de neutrófilos aumenta significativamente, mas, com a evolução do AHA, a expressão gênica e a atividade de MPO diminuem (CRUZ-BAQUERO et al., 2017). Outro fato importante é que, anticorpos anti-MPO são capazes de inibir a lise de trofozoítos, demonstrando que tal enzima tem um papel importante no combate da infecção (PACHECO-YÉPEZ et al., 2011).

Nos estágios finais da amebíase invasiva, a MPO é ineficaz, pois os hepatócitos consomem grande quantidade de oxigênio e criam um ambiente anaeróbio, com consequente ausência de peróxido de hidrogênio (CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2009). Acreditamos que o aumento da MPO do grupo ACFN-EPEC quando comparado ao grupo ACFN se deu por uma reação do hospedeiro frente ao aumento dos fatores de virulência lectina ligante de Gal/GalNAc e CP2, e, da intensidade do parasitismo. A correlação positiva entre a área de necrose e a atividade de MPO nos leva à hipótese de que a relação EPEC/ACFN parece contribuir para a resistência dos trofozoítos, mesmo com o aumento da resposta imune do hospedeiro.

Outro fato importante é que, a MPO, ao terceiro dia de infecção, foi pouco expressa nos grupos Salina e EPEC, o que evidencia que a alta atividade de MPO no grupo ACFN-EPEC está relacionado com a simbiose entre as espécies, e não o efeito bactericida da enzima.

A enzima NAG é expressa principalmente por macrófagos e, apesar da diferença da atividade das cepas ADO e ACFN associadas à EPEC, não mostrou

contribuir para o aumento do AHA. A enzima EPO é capaz de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio e favorecer ações citotóxicas contra parasitos (ACHARYA; ACKERMAN, 2014). A atividade da EPO pareceu não contribuir para o aumento da lesão hepática diante da associação da EPEC com as cepas de *E. dispar* estudadas. De fato, os neutrófilos são a primeira linha de defesa frente a infecção amebiana e bacteriana (CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2009, 2016; CRUZ-BAQUERO et al., 2017; PACHECO-YÉPEZ et al., 2011).

Ainda assim, quando comparamos a atividade das enzimas entre os grupos ACFN e ADO, verificamos que o grupo ADO ao terceiro dia de infecção apresenta maior atividade de MPO e NAG do que o grupo ACFN, o que demonstra que a infecção pela cepa ACFN de *E. dispar* parece não ativar as células imunes, possibilitando a evasão do sistema imune pelos trofozoítos, de alguma maneira. Paralelamente podemos comparar com os resultados da cinética do AHA induzido experimentalmente por estas cepas, evidenciando maior mortalidade de hamsters infectados pelo grupo ACFN, demonstrando o seu maior poder de patogenicidade (DA SILVA et al., 2021).

Coletivamente, nossos resultados reiteram a importância do sinergismo entre as diferentes espécies de patógenos. Os trofozoítos são capazes de fagocitar bactérias de várias famílias, tais como as da *Lactobacillaceae*, *Clostridiaceae*, *Bifidobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, dentre outras (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; GALVÁN-MOROYOQUI et al., 2008; IYER et al., 2019). Ainda não sabemos como ocorrem tais interações, e nem sobre a especificidade delas. Ao parece, as interações se mostram mais complexas do se imagina. IYER e colaboradores (2019) observaram que as bactérias vivas da família *Enterobacteriaceae* contribuem para a *E. histolytica* sobreviver ao estresse oxidativo e colonizar o intestino humano (IYER et al., 2019). Provavelmente, a EPEC contribuiu para a cepa ACFN resistir ao estresse oxidativo no fígado dos hamsters infectados, mas não contribuiu da mesma forma para a cepa ADO.

Foi sugerido que a infecção intestinal pelos protistas *E. histolytica*, *Giardia duodenalis* e *Blastocystis hominis* podem levar a mudanças no microbioma intestinal, com a presença de comunidades de bactérias diferentes. Análises do microbioma intestinal de pacientes infectados com a *E. histolytica* demonstraram aumento de bactérias do gênero *Bifidobacterium* e depleção de bactérias prevalentes, como

*Bacterioides*, *Lactobacillus*, entre outros. A diminuição das bactérias benéficas leva o indivíduo à um quadro de disbiose, o que pode favorecer a invasão do epitélio pelos trofozoítos (BURGESS et al., 2017; IYER et al., 2019; VERMA et al., 2012). Provavelmente, o microbioma intestinal dos pacientes das cepas ACFN e ADO de *E. dispar* são diferentes, o que pode explicar o comportamento biológico diferente de cada uma delas, conforme já elucidado em trabalhos do nosso grupo (DA SILVA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SHIBAYAMA; et al., 2007).

Estudos prévios demonstraram aumento da expressão de fatores de virulência, como a lectina ligante de Gal/GalNAc, as amebaporos e as cisteínas proteinases em cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* quando associadas a enterobactérias, como a *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* e *Escherichia coli* enteropatogênica (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; GALVÁN-MOROYOQUI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2021). A maioria dos estudos envolvem apenas uma cepa de *E. histolytica* ou *E. dispar*, o que é um fator limitante para o estudo do comportamento biológico. Diante dos nossos resultados, reforçamos que a interação entre microrganismos não ocorre somente a nível espécie-espécie, mas também cepa-espécie. Diferentes cepas de uma mesma espécie podem se comportar de maneiras diferentes em associação à diversos microrganismos.



## 7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que a interação da EPEC com as cepas ACFN e ADO de *E. dispar* influenciou a expressão gênica da lectina ligante de Gal/GalNAc e da cisteína proteinase 2, a atividade enzimática de MPO, NAG e EPO e, na capacidade de influenciar a intensidade das lesões hepáticas. O fígado dos hamsters inoculados somente com a EPEC não desenvolveu o abscesso hepático amebiano, evidenciando que o mesmo foi produzido somente pela ação de *E. dispar*. Além disso, nossos modelos de associação *in vitro* e *in vivo* demonstraram diferenças na expressão dos fatores de virulência, sugerindo que os mesmos poderiam estar envolvidos na patogênese das lesões hepáticas.

Acreditamos que estas importantes descobertas ajudarão a elucidar os mecanismos de simbiose entre microrganismos, não somente a nível espécie-espécie, mas em níveis mais complexos, como cepa-espécie. Além disso, poderão contribuir para elucidar os mecanismos de virulência e patogenicidade utilizados por *E. dispar* no provável desenvolvimento de doença no intestino e fígado de seres humanos e no desenvolvimento de lesões experimentais em associação a enterobactérias patogênicas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406–17415, jun. 2014.
- AGUIRRE-GARCÍA, M. M.; ANAYA-RUIZ, M.; TALAMÁS-ROHANA, P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. **Parasitology**, v. 126, n. 3, p. 195–202, 10 mar. 2003.
- ALAM, F. et al. Amebic liver abscess in northern region of Bangladesh: sociodemographic determinants and clinical outcomes. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 625, 10 dez. 2014.
- ANDERSSON, M. et al. Coinfection with Enteric Pathogens in East African Children with Acute Gastroenteritis—Associations and Interpretations. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 6, p. 1566–1570, 6 jun. 2018.
- ANDRÄ, J.; HERBST, R.; LEIPPE, M. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 4, p. 291–304, abr. 2003.
- ATKINS, C. et al. Natural History and Pathogenesis of Wild-Type Marburg Virus Infection in STAT2 Knockout Hamsters. **The Journal of Infectious Diseases**, 6 set. 2018.
- BAILEY, P. J. [29] Sponge implants as models. Em: [s.l: s.n.]. p. 327–334.
- BERG, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, 30 dez. 2020.
- BHATTACHARYA, A. et al. Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p. 1711–1713, abr. 1992.
- BLAZQUEZ, S. et al. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 3–4, p. 425–433, mar. 2007.

- BOETTNER, D. R. et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* Utilize Externalized Phosphatidylserine for Recognition and Phagocytosis of Erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 6, p. 3422–3430, jun. 2005.
- BRUCHHAUS, I. et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes . **Molecular Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 255–263, out. 1996.
- BRUHN, H. et al. Amoebapores and NK-lysin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. **Biochemical Journal**, v. 375, n. 3, p. 737–744, 1 nov. 2003.
- BRUMPT, É. Étudie sommaire de l' *Entamoeba dispar* n. sp., amibe a Kyates quadrinuclées, parasite de l' Homme. **Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine**, 1925.
- BUJANOVER, S. et al. A virulence attenuated amoebapore-less mutant of *Entamoeba histolytica* and its interaction with host cells. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 14, p. 1655–1663, dez. 2003.
- BURGESS, S. L. et al. Parasitic Protozoa and Interactions with the Host Intestinal Microbiota. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 8, ago. 2017.
- CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. et al. Invasive amebiasis: A microcirculatory disorder? **Medical Hypotheses**, v. 73, n. 5, p. 687–697, nov. 2009.
- CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. et al. A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. **Parasite**, v. 23, p. 6, 15 fev. 2016.
- CARRERO, J. C. et al. The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 7, p. 331–338, jul. 2007.
- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Amebiasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/amebiasis/index.html>>. Acesso em: 24 maio. 2022.
- CEPEDA-MOLERO, M. et al. Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 10, p. e1006706, 30 out. 2017.
- CERVANTES-REBOLLEDO, C. et al. Gonadectomy inhibits development of experimental amoebic liver abscess in hamsters through downregulation of the inflammatory immune response. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 447–456, ago. 2009.

- CHRISTY, N. C.; PETRI, W. A. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. **Future Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1501–1519, dez. 2011.
- CLARK, C. G. Entamoeba dispar, an organism reborn. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 4, p. 361–364, jul. 1998.
- CLARKE, S. C. et al. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 365–378, jul. 2003.
- CORNICK, S.; CHADEE, K. *Entamoeba histolytica*: Host parasite interactions at the colonic epithelium. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 1, p. e1283386, 2 jan. 2017.
- COSTA, A. O. et al. Comparison of Xenic and Monoxenic Entamoeba dispar Cultures Using Hepatic Inoculation in Hamster. **Archives of Medical Research**, v. 31, n. 4, p. S247–S248, jul. 2000.
- COSTA, A. O. et al. Pathogenicity of Entamoeba dispar under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent E. histolytica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 245–250, out. 2006.
- COSTA, C. A. et al. Entamoeba histolytica and E. dispar trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p. 23, 26 dez. 2010a.
- COSTA, C. A. X. et al. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. **Parasite**, v. 14, n. 4, p. 329–334, 15 dez. 2007.
- COSTA, C. A. X. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by Entamoeba dispar. **European Journal of Histochemistry**, v. 54, n. 3, p. 39, 26 ago. 2010b.
- COSTA, C. A. X. et al. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: an immunohistochemical and morphometric study. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 27, 28 dez. 2011.
- COSTA, J. DE O. et al. Prevalence of Entamoeba histolytica and other enteral parasitic diseases in the metropolitan region of Belo Horizonte, Brazil. A cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 136, n. 4, p. 319–323, 13 ago. 2018.
- CRUZ-BAQUERO, A. et al. Different behavior of myeloperoxidase in two rodent amoebic liver abscess models. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182480, 10 ago. 2017.

- CUI, Z. et al. Molecular epidemiology, evolution, and phylogeny of *Entamoeba* spp. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 75, p. 104018, nov. 2019.
- DA SILVA, C. A. V. et al. South American *Entamoeba dispar* strains produce amoebic liver abscesses with different pathogenicities and evolutionary kinetics. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106114, dez. 2021.
- DA SILVA, J. C. et al. LEISHMANICIDAL ACTIVITY in vivo OF A MILTEFOSINE DERIVATIVE IN *Mesocricetus auratus*. **Acta Tropica**, v. 209, p. 105539, set. 2020.
- DAS, P.; DEBNATH, A.; MUÑOZ, M. L. Molecular mechanisms of pathogenesis in amebiasis. **Indian journal of gastroenterology : official journal of the Indian Society of Gastroenterology**, v. 18, n. 4, p. 161–6, 1999.
- DE OLIVEIRA SOUZA, C. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarrreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 2, n. 7, p. 1–2, jul. 2016.
- DE SÁ PINHEIRO, A. A. et al. *Entamoeba histolytica*: An ecto-phosphatase activity regulated by oxidation–reduction reactions. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 352–358, abr. 2007.
- DEBORAH CHEN, H.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, jan. 2005a.
- DEBORAH CHEN, H.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98, jan. 2005b.
- DELOER, S. et al. IL-17A contributes to reducing IFN- $\gamma$ /IL-4 ratio and persistence of *Entamoeba histolytica* during intestinal amebiasis. **Parasitology International**, v. 66, n. 6, p. 817–823, dez. 2017.
- DHEILLY, N. M. et al. Parasite microbiome project: Grand challenges. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 10, p. e1008028, 10 out. 2019.
- DIAMOND, L. S.; CLARK, C. G. A Redescription of *Entamoeba Histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) Separating It From *Entamoeba Dispar* Brumpt, 1925. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 340–344, maio 1993.
- DOS SANTOS ZANETTI, A. et al. Diversity, geographical distribution, and prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Parasite**, v. 28, p. 17, 30 mar. 2021.

- DUGGAL, P. et al. Influence of Human Leukocyte Antigen Class II Alleles on Susceptibility to *Entamoeba histolytica* Infection in Bangladeshi Children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 3, p. 520–526, fev. 2004.
- ESPINOSA CANTELLANO, M.; CASTAÑÓN GUTIÉRREZ, G.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. **Archives of medical research**, v. 28 Spec No, p. 204–6, 1997.
- FARFÁN-GARCÍA, A. E. et al. Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. **Revista chilena de infectología**, v. 33, n. 4, p. 438–450, ago. 2016.
- FERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. A. et al. *Entamoeba histolytica* Interaction with Enteropathogenic *Escherichia coli* Increases Parasite Virulence and Inflammation in Amebiasis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 12, dez. 2019.
- FONTOURA, V. M. et al. Socio-environmental factors and diarrheal diseases in under five-year old children in the state of Tocantins, Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 5, p. e0196702, 16 maio 2018.
- FURST, C. et al. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. **Pathologica**, v. 94, n. 1, p. 22–7, fev. 2002.
- GALVÁN-MOROYOQUI, J. M. et al. The Interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e266, 23 jul. 2008.
- GOMES, M. A. et al. Characterization for virulence of an axenic strain of *Entamoeba histolytica*: evidence for overexpression of two proteins. **Archives of medical research**, v. 28, n. 4, p. 489–92, 1997.
- GOMES, M. T.; LOPES, A. H.; MEYER-FERNANDES, J. R. Possible Roles of Ectophosphatases in Host-Parasite Interactions. **Journal of Parasitology Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011.
- GRAFFEO, R. et al. *Entamoeba dispar*: A Rare Case of Enteritis in a Patient Living in a Nonendemic Area. **Case Reports in Gastrointestinal Medicine**, v. 2014, p. 1–3, 2014.
- GUO, X.; STROUP, S. E.; HOUP, E. R. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- $\gamma$ . **Mucosal Immunology**, v. 1, n. 2, p. 139–146, 9 mar. 2008.

- HAQUE, R. et al. Amebiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1565–1573, 17 abr. 2003.
- HELLBERG, A. et al. Overexpression of cysteine proteinase 2 in *Entamoeba histolytica* or *Entamoeba dispar* increases amoeba-induced monolayer destruction in vitro but does not augment amoebic liver abscess formation in gerbils. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 13–20, jan. 2001.
- HUSTON, C. D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 23–26, jan. 2004.
- IVORY, C. P. A.; CHADEE, K. Activation of dendritic cells by the Gal-lectin of *Entamoeba histolytica* drives Th1 responses in vitro and in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 2, p. 385–394, fev. 2007.
- IYER, L. R. et al. Phagocytosis of Gut Bacteria by *Entamoeba histolytica*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 26 fev. 2019.
- JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 181–186, jan. 1998.
- LANNA, M. F. et al. Kinetics of Phenotypic and Functional Changes in Mouse Models of Sponge Implants: Rational Selection to Optimize Protocols for Specific Biomolecules Screening Purposes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 2 dez. 2020.
- LAUWAET, T. et al. *Entamoeba histolytica* trophozoites transfer lipophosphopeptidoglycans to enteric cell layers. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 5, p. 549–556, abr. 2004.
- LEIPPE, M. et al. Amoebapores, a family of membranolytic peptides from cytoplasmic granules of *Entamoeba histolytica*: isolation, primary structure, and pore bacterial cytoplasmic membranes. **Molecular Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 895–904, dez. 1994.
- LEIPPE, M. Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-forming peptides of a protozoan parasite. **Cell**, v. 83, n. 1, p. 17–18, out. 1995.
- LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa - effector molecules of primitive phagocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 267–279, jun. 1999.

- LEIPPE, M.; ANDRÄ, J.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2602–2606, 29 mar. 1994.
- LEIPPE, M.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. The pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis. **Toxicology**, v. 87, n. 1–3, p. 5–18, fev. 1994.
- LEON-CORIA, A.; KUMAR, M.; CHADEE, K. The delicate balance between *Entamoeba histolytica*, mucus and microbiota. **Gut Microbes**, v. 11, n. 1, p. 118–125, 2 jan. 2020.
- LEROY, A. et al. Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4253–4260, nov. 1995.
- LI, J. et al. Review of zoonotic amebiasis: Epidemiology, clinical signs, diagnosis, treatment, prevention and control. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 174–181, maio 2021.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- MANN, B. J. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 59–80.
- MENDOZA-MACÍAS, C. L. et al. *Entamoeba histolytica*: Effect on virulence, growth and gene expression in response to monoxenic culture with *Escherichia coli* 055. **Experimental Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 167–174, fev. 2009.
- MOODY, S. et al. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. **Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 95–104, 1 fev. 1997a.
- MOODY, S. et al. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. **Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 95–104, 1 fev. 1997b.
- NAKADA-TSUKUI, K.; NOZAKI, T. Immune Response of Amebiasis and Immune Evasion by *Entamoeba histolytica*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, 12 maio 2016.



- NICKEL, R. et al. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, n. 3, p. 1002–1007, 25 dez. 2001.
- NOGUEIRA, D. S. et al. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004382, 27 jan. 2016.
- OLIVEIRA, F. M. S. et al. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. **Tropical Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 9, 2015.
- OLIVEIRA, F. M. S. et al. Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis and the expression of amoebic virulence factors. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105010, set. 2021.
- OTHMAN, N. et al. Amebiasis. Em: **Molecular Advancements in Tropical Diseases Drug Discovery**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 1–19.
- PACHECO, J. In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. **Parasitology International**, v. 53, n. 1, p. 35–47, mar. 2004.
- PACHECO-YÉPEZ, J. et al. Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 5, p. 255–264, maio 2011.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Implementation of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision. **Epidemiological Bulletin**, v. 18, n. 1, mar. 1997.
- PETRI, W. A.; HAQUE, R.; MANN, B. J. The Bittersweet Interface of Parasite and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions During Human Invasion by the Parasite *Entamoeba histolytica*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 39–64, out. 2002.
- PIRES, S. M. et al. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through Food. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0142927, 3 dez. 2015.
- PRASAD, R. et al. Recognition of *Entamoeba histolytica* lipophosphoglycan by a strain-specific monoclonal antibody and human immune sera. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 279–287, dez. 1992.

- QUE, X.; REED, S. L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. **Parasitology Today**, v. 13, n. 5, p. 190–194, maio 1997.
- QUE, X.; REED, S. L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 196–206, 1 abr. 2000.
- RAWAL, S. et al. *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin depletes antioxidant defences of target epithelial cells. **Parasitology**, v. 128, n. 6, p. 617–624, 13 jun. 2004.
- REED, S. L. et al. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 1, p. 266–74, 1 jul. 1995.
- RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 361, 27 dez. 2016.
- SALLES, J. M.; MORAES, L. A.; SALLES, M. C. Hepatic amebiasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, abr. 2003.
- SANTI-ROCCA, J.; RIGOTHIER, M.-C.; GUILLÉN, N. Host-Microbe Interactions and Defense Mechanisms in the Development of Amoebic Liver Abscesses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 65–75, jan. 2009.
- SARGEAUNT, P. G.; WILLIAMS, J. E.; GRENE, J. D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 5, p. 519–521, jan. 1978.
- SHIBAYAMA, M. et al. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amoebic liver abscess in hamsters. **Annals of Hepatology**, v. 6, n. 2, p. 117–118, abr. 2007.
- SILVA, E. F.; MAYRINK, W. Estudos sobre a *Entamoeba moshkovskii*. II - Novos focos em diversos tipos de coleções hídricas no Brasil e no Uruguai. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 16, n. 4, p. 203–221, ago. 1974.
- SILVA OLIVEIRA, F. M. et al. Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis and

the expression of amoebic virulence factors. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105010, set. 2021.

SINGH, D.; NAIK, S. R.; NAIK, S. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. **Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 127–135, ago. 2004.

STANLEY, S. L. Amoebiasis. **The Lancet**, v. 361, n. 9362, p. 1025–1034, mar. 2003.

STANLEY, S. L.; REED, S. L. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 6, p. G1049–G1054, 1 jun. 2001.

TALAMÁS-LARA, D. et al. Erythrophagocytosis in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: A Comparative Study. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

TALAMÁS-ROHANA, P. et al. T-cell suppression and selective in vivo activation of TH2 subpopulation by the *Entamoeba histolytica* 220-kilodalton lectin. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 10, p. 3953–3958, out. 1995.

TRISSEL, D. et al. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 5, p. 1137–1143, 1 nov. 1978.

TSUTSUMI, V.; MARTINEZ-PALOMO, A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. An ultrastructural study. **The American journal of pathology**, v. 130, n. 1, p. 112–9, jan. 1988.

VERMA, A. K. et al. Real-time analysis of gut flora in *Entamoeba histolytica* infected patients of Northern India. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 183, 22 dez. 2012.

WILSON, I. W. et al. Genetic Diversity and Gene Family Expansions in Members of the Genus *Entamoeba*. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 688–705, 1 mar. 2019.

WONG-BAEZA, I. et al. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–12, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease**.

XIMÉNEZ, C. et al. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 1105–1120, 16 mar. 2010.

YANG, S.-J. et al. Characterization of Virus Replication, Pathogenesis, and Cytokine Responses in Syrian Hamsters Inoculated with SARS-CoV-2. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 14, p. 3781–3795, ago. 2021.

YUE, B. et al. Characteristics of endoscopic and pathological findings of amebic colitis. **BMC Gastroenterology**, v. 21, n. 1, p. 367, 9 dez. 2021.

YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Parasites and their (endo)symbiotic microbes. **Parasitology**, v. 145, n. 10, p. 1261–1264, 8 set. 2018.

## **9 APÊNDICE**

### **9.1 Artigo**

1 **Enteropathogenic *Escherichia coli* modulates the virulence and**  
2 **pathogenicity of *Entamoeba dispar***

3  
4 Short title: EPEC modulates the virulence of *E. dispar*

5 Cezar Augusto Vilela da Silva<sup>a,b</sup>, Carlos Eduardo Costa dos Santos<sup>b</sup>, Mariana  
6 Fernandes de Paula Cortezzi<sup>b</sup>, César Silva Santana Moura<sup>c</sup>, Ruth Elizabeth  
7 Cruz<sup>d</sup>, Camila de Almeida Lopes<sup>d</sup>, Karen Costa<sup>e</sup>, Lucas Teixeira de Souza<sup>e</sup>,  
8 Patrícia Costa Lima da Silva<sup>c</sup>, Elisabeth Neumann<sup>e</sup>, Álvaro Cantini Nunes<sup>c</sup>, Maria  
9 Aparecida Gomes<sup>d</sup>, Fabrício Marcus Silva Oliveira<sup>\*.f</sup>, Marcelo Vidigal Caliani<sup>b</sup>

10 **Author details**

11 <sup>a</sup> Postgraduate Program in Pathology, Institute of Biological Sciences of the  
12 Federal University of Minas Gerais, Brazil

13 <sup>b</sup> Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Federal  
14 University of Minas Gerais, Brazil

15 <sup>c</sup> Department of Genetics, Ecology, and Evolution, Institute of Biological  
16 Sciences, Federal University of Minas Gerais, Brazil

17 <sup>d</sup> Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University  
18 of Minas Gerais, Brazil.

19 <sup>e</sup> Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University  
20 of Minas Gerais, Brazil

21 <sup>f</sup>Cellular and Molecular Immunology Group, Rene Rachou Institute, Oswaldo  
22 Cruz Foundation, Minas Gerias, Brazil

23  
24  
25

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

26

27 <sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.28 \* **Autor correspondente:**

29 Fabrício Marcus Silva Oliveira

30 Cellular and Molecular Immunology Group, Rene Rachou Institute, Oswaldo Cruz

31 Foundation, Minas Geras, Brazil,, Av. Augusto de Lima, 1715 - Barro Preto -

32 Belo Horizonte/Minas Gerais - CEP: 30.190-002, Brazil.

33 Email: oliveirafms13@gmail.com

34

35 **Abstract**

36 Amoebiasis is a disease caused by *Entamoeba histolytica* that affects the  
37 large intestine of humans, and can sometimes cause extra-intestinal lesions.  
38 *Entamoeba dispar* is another amoeba species considered commensal, although  
39 it has been identified in patients presenting with dysenteric and nondysenteric  
40 colitis, and amoebic liver abscess. Amoebic virulence factors are essential for the  
41 invasion and development of lesions. There is evidence showing that association  
42 of enterobacteria with amoebic trophozoites contributes to increased expression  
43 of amoebic virulence factors. Enteropathogenic *Escherichia coli* is an important  
44 diarrhea-causing bacterium with high incidence rates in the world population,  
45 enabling it to interact with *Entamoeba* sp. in the same host.  
46 In this context, this study aims to evaluate the influence of enteropathogenic  
47 *Escherichia coli* on ACFN e ADO *Entamoeba dispar* strains by quantifying the  
48 expression of virulence factors galactose/N-acetyl-D-galactosamine-binding  
49 lectin, cysteine proteinase 2 and amoebapores A and C, evaluating the  
50 progression and morphological aspect of amoebic liver abscess, and the profile  
51 of inflammatory cells. Our results demonstrated that the interaction between  
52 EPEC and ACFN *Entamoeba dispar* strains was able to increase the expression  
53 of virulence factors, as well as the lesion area and the activity of the inflammatory  
54 infiltrate. However, the association with the ADO strain did not influence the  
55 expression of virulence factors. Together, our results demonstrate that the  
56 interaction between EPEC, ACFN and ADO *Entamoeba dispar* strains resulted  
57 in differences in *in vitro* and *in vivo* gene expression of Gal/GalNAc-binding lectin  
58 and CP2, in enzymatic activities of MPO, NAG and EPO, and consequently in the  
59 ability to cause lesions.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

60

61 **Keywords:** *Entamoeba dispar*; Amoebic liver abscess; enteropathogenic  
62 *Escherichia coli*; galactose/N-acetyl-D-galactosamine-binding lectin; cysteine  
63 proteinase 2; Amoebapores.

64

## 65 Introduction

66 Amoebiasis is a disease caused by the non-flagellated protozoan  
67 *Entamoeba histolytica* (SHIRLEY; WATANABE; MOONAH, 2019; STANLEY, 2003;  
68 WHO/PAHO/UNESCO, 1997) which is among the 15 leading causes of diarrhea  
69 affecting children up to two years of age. In some regions of the world, the  
70 prevalence of this disease can reach 40%, but since it is a neglected disease,  
71 there are no accurate estimates that help define the real epidemiological  
72 parameter (SHIRLEY; WATANABE; MOONAH, 2019).

73 *Entamoeba dispar* was recognized as a species in 1997  
74 ("WHO/PAHO/UNESCO, 1997). Among the species of the genus *Entamoeba*, *E.*  
75 *dispar* is the most prevalent (49.4%), followed by *E. histolytica* (32.3%) (DOS  
76 SANTOS ZANETTI et al., 2021). Despite being considered a non-invasive  
77 species, *E. dispar* has been detected in samples from patients with amoebic liver  
78 abscess (XIMÉNEZ et al., 2010), dysenteric colitis (GRAFFEO et al., 2014), non-  
79 dysenteric colitis (COSTA et al., 2000) and polyxenic cultures were able to cause  
80 colitis and amoebic liver abscess (ALA) in experimental animals.

81 Proteins present on the surface of trophozoites are related to lesion  
82 development in the host (BLAZQUEZ et al., 2007; ESPINOSA-CANTELLANO;  
83 MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; XIMÉNEZ et al., 2017). Although *E. histolytica* and  
84 *E. dispar* share 6,134 genes, surface protein expression is different in the  
85 species, with the former species expressing a higher number of proteins  
86 (WILSON et al., 2019). One of these proteins is the galactose and N-acetyl-D-  
87 galactosamine-binding lectin (Gal/GalNAc), which has fewer heavy subunit  
88 sequences in *E. dispar* compared to *E. histolytica*. It is used for adhesion of  
89 trophozoites to the mucin layer and to the epithelial cells of the large intestine,  
90 inactivates complement proteins, and possesses lytic capacity, leading to host  
91 cell death (HAQUE et al., 2003; PETRI; HAQUE; MANN, 2002; WILSON et al.,  
92 2019). The Gal/GalNAc gene synthesizes a heterodimer composed of a light

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

93 35kDa, an intermediate 150kDa and a heavy 170kDa subunit, and it is related to  
94 the production of invasive amoebiasis, as is the cysteine proteinases gene  
95 (WILSON et al., 2019).

96 Cysteine proteinases (CPs) assist trophozoites in their penetration of the  
97 intestinal mucosa by degrading mucoprotein 2 (MUC-2), a glycoprotein secreted  
98 by goblet cells that functions as a mechanical barrier of the villi. In addition, CPs  
99 degrade elastin, fibrinogen, laminin, and collagen, aiding the parasite's motility in  
100 the extracellular matrix, and degrade proteins such as the anaphylotoxins C3a  
101 and C5a, leading to a reduction in the inflammatory response (QUE; REED, 1997;  
102 REED et al., 1995; SEYDEL\* et al., 1998).

103 Amoebapores are pore forming proteins of 4-5 kDa and have three  
104 isoforms, A (APA), B (APB) and C (APC) (LEIPPE; MÜLLER-EBERHARD, 1994).  
105 They are structurally and functionally similar to NK-lysin, a polypeptide produced  
106 by natural killer cells and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, capable of performing cytolytic  
107 activity (BRUHN et al., 2003). Compared to NK-lysin, amoebapores have five  
108 times higher pore-forming capacity, due to their more hydrophobic structure  
109 (BRUHN et al., 2003). In addition, they can cause lysis in various host cells, such  
110 as enterocytes and hepatocytes (LEIPPE; ANDRÄ; MÜLLER-EBERHARD,  
111 1994).

112 Studies have shown that bacteria from the host microbiota are able to  
113 interact with parasites, and this action could influence the parasite-host  
114 relationship (YURCHENKO; LUKEŠ, 2018). In fact, an experimental study  
115 involving monoxenic and polyxenic *E. dispar* strains found that the polyxenic  
116 culture, in which bacteria from the indigenous microbiota of the patient from which  
117 it was isolated are also present, was able to perform cytopathic effect and  
118 produce experimental lesions in hamsters, as was *E. histolytica* (COSTA et al.,  
119 2006). These observations reinforce the idea that bacteria from the gut microbiota  
120 and even exogenous bacteria could influence *E. dispar* trophozoites. The  
121 association between microorganisms can be observed as a community of  
122 species that undergo different selection pressures. An organism within a host can  
123 be mutualistic (both benefit from the relationship), parasitic (one-sidedness of  
124 benefits, where the parasite spoliates the host), or commensal (one-sidedness of  
125 benefits, but without spoliation of the host) (DHEILLY et al., 2019).

126 Experimental intestinal and hepatic lesions using *E. dispar* strains are  
127 obtained only when the culture is associated with the intestinal microbiota of the  
128 individual from which it was isolated (polyxenic culture) (COSTA et al., 2006,  
129 2010a, 2007, 2010b, 2011; DA SILVA et al., 2021; FURST et al., 2002; OLIVEIRA  
130 et al., 2015, 2021). This strengthens the idea that bacteria modulate amoebic  
131 trophozoites activity and favor the development of these experimental lesions  
132 (COSTA et al., 2006).

133 Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a Gram-negative bacterium  
134 that causes diarrhea (CLARKE et al., 2003; DEBORAH CHEN; FRANKEL, 2005;  
135 PIRES et al., 2015). Since EPEC can be isolated from different sources, such as  
136 processed and raw foods, domestic and wild animals, and natural environments  
137 such as water and soil, the host can be easily infected (DE OLIVEIRA SOUZA et  
138 al., 2016). Experimental models of co-infection of EPEC with other pathogens,  
139 aimed at understanding the consequences of this association, have aroused the  
140 interest of researchers (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; GALVÁN-  
141 MOROYOQUI et al., 2008; GORELIK et al., 2019; PAKPINYO et al., 2003).  
142 Studies have shown that symbiosis between bacteria and amoebas can modulate  
143 phenotypes, virulence properties and the pathogenicity of amoebas  
144 (BHATTACHARYA et al., 1992; COSTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2021;  
145 SHIBAYAMA; et al., 2007). However, the interaction process of *Entamoeba* sp.  
146 with other microorganisms is still not understood, as well as its consequences.  
147 Our research group recently found that the interaction between *E. dispar* and the  
148 enterobacterium *Salmonella typhimurium* was able to increase the gene  
149 expression of the amoebic virulence factors amoebapore A, cysteine proteinase-  
150 5 and Gal/GalNAc-binding lectin. In addition, increased intensity of ulcerative  
151 amoebic colitis was observed, with production of larger zones of erosion and  
152 ulceration of the intestinal wall, increased intensity of the inflammatory infiltrate,  
153 accompanied by increased expression of the pro-inflammatory mediators  
154 cyclooxygenase 2, IL-1, and TNF- $\alpha$  (OLIVEIRA et al., 2021).

155 There are still many questions about the symbiosis between bacteria and  
156 amoebae, and its probable influence on virulence and pathogenicity of  
157 trophozoites in amoebiasis, especially on the experimental lesions produced by  
158 *E. dispar*. In our study, we evaluated the influence of EPEC on ACFN and ADO  
159 *E. dispar* strains by evaluating gene expression of amoebic virulence factors *in*

160 *vitro* and in an experimental model of amoebic liver abscess. Our results  
161 demonstrate that *E. dispar* strains respond differently to interaction with  
162 enteropathogenic *Escherichia coli*. We found that the interaction of EPEC with  
163 ACFN and ADO *E. dispar* strains showed different behavior regarding the gene  
164 expression of virulence factors and consequently in the ability to cause lesions.

165

## 166 **Materials and methods**

### 167 **Xenic strains of *Entamoeba dispar***

168 ACFN and ADO *E. dispar* strains were isolated by the Laboratory of  
169 Amoebiasis of ICB/UFMG, and the confirmation of the species was performed  
170 through zymodema, PCR and erythrophagocytosis capacity (DA SILVA et al.,  
171 2021; GOMES et al., 2000). ACFN strain was isolated from an asymptomatic  
172 patient in Belo Horizonte, Minas Gerais, and the ADO strain from a patient with  
173 non-dysenteric colitis in Itacarambi (Xacriabá indigenous community), Minas  
174 Gerais. The strains were stabilized under xenic conditions in Pavlova medium  
175 modified by Silva & Mayrink (FÉLIX-SILVA; MAYRINK, 1974). In addition, the  
176 choice of strains was based on their ability to reproduce in experimental models  
177 tissue lesions characteristic of amoebiasis (COSTA et al., 2000, 2010a, 2007; DA  
178 SILVA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SHIBAYAMA; et al., 2007).

179

### 180 **Enteropathogenic *Escherichia coli* strain**

181 Enteropathogenic *Escherichia coli* strain (INCQS 00184) was kindly  
182 provided by Professor Elisabeth Neumann and kept in the Laboratory of Ecology  
183 and Physiology of Microorganisms, ICB/UFMG. The strain was resuspended in  
184 BHI (Brain Heart Infusion) medium and maintained under aerobic conditions  
185 without agitation for 18 hours at 37°C. The growth of the strain was evaluated,  
186 and the concentration adjusted to  $1 \times 10^7$  by serial dilution of the strain in sterile  
187 0.89% saline solution.

188

### 189 ***In vitro* association of *E. dispar* trophozoites with EPEC**

190 ACFN and ADO *E. dispar* strains were transferred from conical tubes into  
191 culture bottles in modified Pavlova medium (FÉLIX-SILVA; MAYRINK, 1974), and  
192 kept in an incubator at 37°C for 32 hours. EPEC was associated at a  
193 concentration of  $1 \times 10^6$  colony forming units (CFU) in 10  $\mu$ L, with the aid of a

62  
63  
64  
65

194 sterile pipette, in a laminar flow hood. The association was maintained for a  
195 period of 18 hours at 37° (Figure 1A). After the interaction period, the supernatant  
196 was discarded, and 3 mL of sterile phosphate-buffered saline (PBS) added. The  
197 bottles were maintained on ice for 10 minutes, in order to detach the amoebic  
198 trophozoites adhered to the bottle surface. Subsequently, the content was  
199 transferred to 15 mL conical tubes, centrifuged at 1500 RPM for 5 minutes, the  
200 supernatant discarded, and the same volume of PBS added.

201

## 202 **Animals**

203 Thirty-two male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), aged 45 days,  
204 were obtained from the Animal Facility of Parasitology Department from the  
205 Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (ICB/UFMG).  
206 Thirty-two hamsters per strain (ACFN and ADO) were used, sixteen of each  
207 group were infected with trophozoites and sixteen with trophozoites culture  
208 associated with EPEC bacteria (Figure 1B). Animal experimentation was  
209 conducted according to Brazilian guidelines regarding the use of animals in  
210 research work and approved by the local Ethics Committee in Animal  
211 Experimentation (CEUA/UFMG), protocol number 252/2018. Hamsters were  
212 maintained in collective cages at the Experimental Animal Facility of the  
213 ICB/UFMG with free access to water and food at a temperature of 23°C with a  
214 light/dark cycle of 12 h/12 h.

215

## 216 **Anesthesia and inoculum**

217 Hamsters were intraperitoneally anesthetized using a combination of  
218 xylazine 2% (10mg/Kg) and ketamine 5% (150mg/Kg). An abdominal incision of  
219 approximately 1 cm was made for visualization of the liver. Eight hamsters from  
220 each group were inoculated directly into the left lobe of the organ with  $1 \times 10^5$   
221 trophozoites of the ACFN and ADO *E. dispar* strains, and eight with the same  
222 number of trophozoites associated with a concentration of  $1 \times 10^6$  EPEC bacteria.  
223 The same number of animals were inoculated with a concentration of  $1 \times 10^6$   
224 EPEC bacteria, contained in 0.1mL of BHI medium, and 0.1 mL of saline (0.9%  
225 sodium chloride solution).

226

227

228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265

## 228 **Necropsy, macroscopic analysis and collection of material**

1  
2 229 All hamsters were euthanized on the fourth day post-infection, by bleeding  
3  
4 230 under general anesthesia (combination of xylazine 2%–10 mg/kg and ketamine  
5  
6 231 5%–150 mg/kg), to remove the inoculated lobe (Figure 1B). During the liver  
7  
8 232 removal, a macroscopic analysis was performed, with description of the lesions  
9  
10 233 and digitalization of the images. Subsequently, five slices of the left lobe were  
11  
12 234 sectioned: a) one soaked in RNAlater solution (Sigma-Aldrich, USA), for gene  
13  
14 235 expression analysis; b) three fixed in buffered formaldehyde (10%; pH 7.2), for  
15  
16 236 histopathology and morphometry; and; c) fresh for the determination of enzyme  
17  
18 237 activities.

19 238

## 20 239 **Isolation of RNA and synthesis of complementary DNA (cDNA)**

21  
22 240 Trophozoites were collected from cultures associated or not with EPEC  
23  
24 241 and transferred to 2mL microtubes containing 1mL of TRIzol reagent (Invitrogen,  
25  
26 242 USA) for isolation of total RNA, according to the manufacturer's specifications.  
27  
28 243 The RNAlater solution was removed from the liver fragments, the tissue was  
29  
30 244 macerated, and the RNA extracted as well as that of the associated cultures. The  
31  
32 245 purity of the RNA was evaluated in Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo  
33  
34 246 Cientific Inc., Bremen, Germany), using the wavelengths of 280-260 and 260-230  
35  
36 247 nm. The assay for each group (strain associated or not with EPEC) was  
37  
38 248 performed in triplicate. The production of cDNA was performed by the High-  
39  
40 249 Capacity kit (Applied Biosystems), using 1ug of RNA per sample, according to  
41  
42 250 the manufacturer's specifications. In addition, 1% agarose gel electrophoresis  
43  
44 251 was performed to evaluate the integrity of the RNA in the samples.

45 252

## 46 253 **RT-qPCR assay for CP2 virulence factors and Gal/GalNAc lectin.**

47  
48 254 For the Polymerase Chain Reaction (PCR), the iTaq Universal SYBR  
49  
50 255 Green Supermix 2x kit (Biorad Laboratories, Inc.) was used. For total reaction  
51  
52 256 mix volume of 10µl, 5µl of SYBR Green Supermix, 2 µl of sample containing 100  
53  
54 257 ng of cDNA, 1.8 µl of nuclease-free water and 0.6 µl of the direct and reverse  
55  
56 258 primers of the virulence factors Gal/GalNAc-binding lectin, CP2, APA and APC  
57  
58 259 were used, as fully described in Table 1. Normalization of the results was based  
59  
60 260 on the expression levels of the constitutive genes beta-actin and GAPDH. The

61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

261 data were presented via relative expression level, using the method derived from  
262 RQ (relative quantification) =  $E^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

263

#### 264 **Histopathological analysis and morphometric analysis**

265 After the fixation period, three liver slices were dehydrated, diaphanized,  
266 infiltrated and embedded in paraffin, obtaining 4  $\mu\text{m}$ -thick sections for staining  
267 with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological and digital morphometric  
268 analysis. Lesions were described according to their intensity, topography, and the  
269 presence of parasites. To evaluate the inflammation, a semi-quantitative analysis  
270 was performed, where score 0 represented absence of inflammation and score  
271 3, presence of intense inflammation. Similarly, parasitism was evaluated  
272 considering score 0 as absence of trophozoites and score 3 as intense presence  
273 of trophozoites. For morphometric analysis, all histological sections were  
274 visualized using a 10x microscope objective from Axiolab Carl Zeiss  
275 (Oberkochen, Germany), and all liver parenchyma present in the slides digitized  
276 through the QColor3 microcamera–Olympus (Tokyo, Japan). Using the KS300  
277 software (Carl Zeiss image analyzer), all areas of liver necrosis were interactively  
278 delimited with the help of a cursor to calculate the area in  $\mu\text{m}^2$ , using algorithms  
279 built in the same image analyzer (DA SILVA et al., 2021).

280

#### 281 **Biochemical evaluation of neutrophil, macrophage and eosinophil activity** 282 **in liver parenchyma**

283 The evaluation of neutrophil activity in liver parenchyma was quantified by  
284 myeloperoxidase (MPO) activity assay, eosinophil activity by eosinophil-  
285 peroxidase (EPO) activity and macrophage activity by lysosomal enzyme N-  
286 acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) activity, all performed according to previously  
287 described method (OLIVEIRA et al., 2019). After homogenization of the liver  
288 parenchyma (TissueLyser LT–Qiagen, Hilden, Germany), the homogenate was  
289 centrifuged at 1500 $\times$ g for 10min at 4°C, and the resulting sediment was examined  
290 for MPO, EPO, and NAG. The results were expressed as optical densities (OD).

291

#### 292 **Statistical Analysis**

293 Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® 8.0 software  
294 (GraphPad Software Inc.). The Shapiro-Wilk test was first used to check the

1 295 distribution of the data. For the two-group analyses the paired t-test was used for  
2 296 data categorized as parametric, and the Mann-Whitney test for non-parametric  
3 297 data. For analyses of three or more groups, ANOVA tests were performed for  
4 298 data categorized as parametric, and the Kruskal-Wallis test for non-parametric  
5 299 data. The results are expressed as the mean  $\pm$  SEM when parametric and as the  
6 300 median and interquartile range (25–75%) when nonparametric. Statistical  
7 301 significance was established at  $p \leq 0.05$ .

8 302

### 9 303 **Results**

#### 10 304 ***In vitro* and *in vivo* association of EPEC with ACFN and ADO *E. dispar*** 11 305 **strains altered the gene expression of Gal/GalNAc-binding lectin and CP2**

12 306 In order to verify the influence of EPEC on ACFN and ADO *E. dispar*  
13 307 strains, we evaluated the expression of Gal/GalNAc, CP2, APA and APC in  
14 308 cultures associated with the bacteria (*in vitro*) and liver fragments from hamsters  
15 309 experimentally infected with the co-cultures (*in vivo*). The *in vitro* association of  
16 310 EPEC with ACFN strain was able to increase Gal/GalNAc expression, while  
17 311 causing reduction in ADO strain (Figure 1C and 1D), and on the other hand,  
18 312 caused reduction of CP2 expression, for both strains (Figure 1E and 1F). *In vivo*  
19 313 association of EPEC with the ACFN strain led to increased expression of  
20 314 Gal/GalNAc and CP2 (Figure 1G and 1H), and for the ADO strain, no differences  
21 315 in the expression of both virulence factors were observed. There was no  
22 316 significant difference in the expression of APC of ACFN and ADO strains  
23 317 associated with EPEC, either *in vitro* or *in vivo*. APA was not expressed in any of  
24 318 samples analyzed. Collectively, these results suggest that *E. dispar* strains  
25 319 respond differently to association with EPEC, as evidenced by differences in the  
26 320 expression of virulence factors.

27 321

#### 28 322 **The ACFN and ADO *E. dispar* strains when associated with EPEC produce** 29 323 **lesions of different intensities**

30 324 Macroscopic analysis of the liver lobe showed the presence of firm  
31 325 yellowish-white areas or areas of low consistency. Hamsters infected with the  
32 326 EPEC-associated ACFN strain showed visibly larger lesions compared to those  
33 327 infected with the strain alone (Figure 2A and 2D). In the macroscopic  
34 328 histopathological evaluation, there were no differences between the lesions

35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

329 observed in the liver of hamsters infected with the ADO strain associated or not  
330 with EPEC (Figure 2G and 2J). In addition, there was a difference in ALA size  
331 between ACFN and ADO strains when associated with EPEC, with larger areas  
332 of lesions observed in hamsters infected with the associated ACFN strain (Figure  
333 2D and 2J). All *E. dispar* strains evaluated were capable of producing amoebic  
334 lesions, and microscopic histopathological analysis revealed zones of liquefactive  
335 necrosis. The necrosis was characterized by the presence of acidophilic and  
336 granular material, which sometimes presented with small basophilic calcification  
337 deposits (Figure 2B, E, H and K). Cell debris with the presence of large numbers  
338 of pyknotic nuclei, karyorrhexis and cells showing karyolysis were observed along  
339 the entire length of the border of the necrosis zones (Figure 2 C, F, I and L). In  
340 addition, in these regions we noted the presence of slight to moderate mixed  
341 inflammatory infiltrate composed mainly of neutrophils and macrophages.  
342 Numerous trophozoites were frequently visualized, located in the middle of the  
343 necrosis (Figure 2 C, F, I and L). The qualitative analysis showed that the  
344 necrosis observed in hamsters infected with ACFN strain associated or not with  
345 EPEC occupied a greater extension of the liver parenchyma compared to the  
346 ADO strain, associated or not with the bacteria. Semi-quantitative  
347 histopathological analysis revealed that EPEC increased the inflammatory  
348 infiltrate in the liver parenchyma and parasitism by the ACFN strain (Table 2).  
349 However, the same was not observed for the ADO strain, with no differences in  
350 inflammation or parasitism in the liver parenchyma of hamsters inoculated with  
351 the strain associated or not with the bacteria (Table 2). Morphometric analysis of  
352 the liver lesion showed a significant increase in the necrosis area of EPEC-  
353 associated ACFN strain (Figure 3A), but no difference was observed when the  
354 bacterium was associated with the ADO strain, corroborating the macroscopic  
355 and histopathological observations already described. Together, these results  
356 allow us to infer that *E. dispar* strains are capable of causing liver damage.  
357 Moreover, the ACFN strain when associated with EPEC increases its  
358 pathogenicity, causing greater ALA in all infected hamsters.

359

360 **The leukocyte activation profile showed differences between infections**  
361 **with ACFN and ADO strains associated or not with EPEC**



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

362 The association of EPEC with ACFN strain increased MPO, NAG and EPO  
363 activity (Figure 3B, D and F), whereas the bacteria associated with ADO strain  
364 decreased NAG activity (Figure 3E), suggesting that the two strains induce  
365 inflammatory response with different cellular profiles when associated with  
366 EPEC. The results show higher activity of neutrophils, macrophages and  
367 eosinophils for the EPEC-associated ACFN strain, and decreased activity of  
368 macrophages for the ADO strain when associated. A significant increase in MPO  
369 activity was also observed in EPEC-associated ACFN strain, and in the ADO  
370 strain, both compared to controls NI and EPEC (Figure 3B and C). In addition,  
371 the levels of MPO showed a strong correlation with the ALA area found in  
372 hamsters infected with the ACFN strain, suggesting the participation of neutrophil  
373 activity in the pathogenesis of the amoebic lesion caused by this strain (Figure  
374 3G). An increase in NAG activity was observed in the ACFN strain compared with  
375 the control groups NI and EPEC (Figure 3D). A similar result was observed in  
376 ACFN and ADO strains when associated with EPEC compared with NI and EPEC  
377 groups (Figure 3D and E). Furthermore, EPO activity showed a significant  
378 increase in the ACFN strain when compared with NI and EPEC groups (Figure  
379 3F). These results were consistent with what was observed in the histological  
380 analyses, which identified a more exuberant inflammatory infiltrate in the ACFN  
381 strain when associated with EPEC.

382

### 383 Discussion

384 Amoebiasis is a parasitic disease that presents intestinal clinical  
385 manifestations, and sometimes presenting extra-intestinal clinical manifestations,  
386 such as ALA (ABASSZADE et al., 2021; GUPTA et al., 2009; HAQUE et al., 2003;  
387 SHENOY et al., 2010; STANLEY, 2003). Although *E. dispar* is considered a  
388 commensal species, some studies have shown that certain strains could be  
389 capable of causing disease in experimental models and humans (COSTA et al.,  
390 2006, 2007; DA SILVA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SHIBAYAMA; et al.,  
391 2007; XIMÉNEZ et al., 2010). Studies involving bacteria and *E. dispar* strains  
392 have shown that the interaction between these microorganisms can be a  
393 determining factor in the lesions development and pathogenicity of amoebic  
394 trophozoites in a host (COSTA et al., 2006; DA SILVA et al., 2021; GALVÁN-  
395 MOROYOQUI et al., 2008). In this study, we investigated whether the interaction

1 396 between strains of *E. dispar* and enteropathogenic *Escherichia coli*, a diarrhea-  
2 397 causing bacterium, could alter the expression of amoebic virulence factors, the  
3 398 inflammatory profile, as well as alter the development of experimentally induced  
4 399 ALA. We observed that the association of EPEC with ACFN and ADO *E. dispar*  
5 400 strains was able to increase the *in vitro* gene expression of Gal/GalNAc-binding  
6 401 lectin in the ACFN strain, and decrease it in the ADO strain. The analysis of *in*  
7 402 *vivo* gene expression of the same virulence factor of associated strains showed  
8 403 increased lectin expression in the ACFN strain, corroborating the *in vitro* results.  
9 404 However, no difference was observed in *in vivo* gene expression of Gal/GalNAc-  
10 405 binding lectin in the EPEC-associated ADO strain. These results demonstrate  
11 406 that the behavior of the strains *in vitro*, in relation to virulence factors may differ  
12 407 from the behavior evaluated *in vivo*. Indeed, a study that evaluated the  
13 408 pathogenicity of polyxenic strains of *E. dispar* by cytopathic effect *in vitro* and  
14 409 intrahepatic inoculation in hamsters, did not show a relationship between the  
15 410 results of *in vitro* and *in vivo* experiments. This is because the trophozoites  
16 411 showed moderate cytolytic capacity *in vitro* but were able to develop abscesses  
17 412 as intense as those caused by *E. histolytica* (COSTA et al., 2006). Our study  
18 413 corroborates the previous findings of Costa et al. (2006), suggesting the  
19 414 possibility of differences in the mechanisms involved in pathogenicity when  
20 415 evaluated *in vitro* and *in vivo*. Probably one of the important elements would be  
21 416 the parasite-host interaction, allowing different results for each *E. dispar* strain.  
22 417  
23 418 The Gal/GalNAc-binding lectin is used by trophozoites to adhere to the  
24 419 mucus layer and colonize the large intestine (HAQUE et al., 2003). Studies show  
25 420 that trophozoites transfer the intact lectin or part of it to the surface of epithelial  
26 421 cells, preceding the death of the target cells (LEROY et al., 1995). This transfer  
27 422 is also observed in *in vivo* and *in vitro* models in hepatocytes. Pacheco (2004)  
28 423 demonstrated through immunohistochemical analysis for Gal/GalNAc-binding  
29 424 lectin, that it was present in trophozoites, as well as in hepatocytes, in sinusoidal  
30 425 and inflammatory cells. Moreover, the authors verified that the cells  
31 426 immunolabeled with the lectin showed signs of cellular damage. Another study  
32 427 demonstrated that blocking the Gal/GalNAc-binding lectin with monoclonal  
33 428 antibody was not able to prevent trophozoite adhesion, but blocked its cytotoxic  
34 429 effect, contributing to the demonstration that this molecule is strongly linked to  
35 430 the cytolytic effect (SAFFER; PETRI, 1991). In our study, the association with  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 430 EPEC contributed to a significant increase in the area of ALA caused by the  
2 431 ACFN strain. However, the same result was not observed when the association  
3 432 of EPEC with the ADO strain was evaluated. We suggest that the Gal/GalNAc-  
4 433 binding lectin of the ACFN strain, associated or not with EPEC, was one of the  
5 434 main virulence factors that led to the formation of larger necrotic areas in  
6 435 hamsters infected with this strain. Indeed, in the present study and in others from  
7 436 our research group (DA SILVA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021), it is reported  
8 437 that different strains of *E. dispar* show different pathogenicity and virulence.

9 438 Cysteine proteinases are enzymes capable of digesting proteins from the  
10 439 extracellular matrix, which contributes to the invasion of the intestinal epithelium  
11 440 and dispersion of trophozoites in the parenchyma (QUE; REED, 2000). In our  
12 441 study, as observed in relation to lectin, the relative gene expression of CP2 in the  
13 442 *in vitro* and *in vivo* association models also showed differences when considering  
14 443 the same strain. The association of EPEC with ACFN and ADO strains *in vitro*  
15 444 decreased the expression of CP2, while *in vivo* we observed increased  
16 445 expression only in the ACFN strain. These results corroborate previous results  
17 446 regarding Gal/GalNAc-binding lectin, reinforcing the hypothesis of the difference  
18 447 in parasite-host interaction when different strains are evaluated. Furthermore, we  
19 448 suggest that the properties of CP2 also contributed to the increased ALA area  
20 449 caused by the EPEC-associated ACFN strain. Indeed, studies by other  
21 450 researchers support the hypothesis that EPEC bacteria induce virulence in  
22 451 amebic trophozoites. The authors found that the interaction of EPEC with the  
23 452 HM1:IMSS *E. histolytica* strain, contributed to the increased virulence of the  
24 453 trophozoites. Co-infection between the species led to increase *in vitro* destruction  
25 454 of CaCO<sub>2</sub> cells and increased expression of the virulence factor genes  
26 455 Gal/GalNAc-binding lectin, APA and cysteine proteinases 1 to 5 (FERNÁNDEZ-  
27 456 LÓPEZ et al., 2019).

28 457 Amoebapores are described as proteins present in *Entamoeba* sp. similar  
29 458 to the NK-lysine of NK cells, and they have three isoforms (A: APA, B: APB; and;  
30 459 C: APC). They act on the host cells by forming pores in the cell membrane and  
31 460 are an important factor in the virulence (BRACHA; NUCHAMOWITZ;  
32 461 MIRELMAN, 2003; LEIPPE, 1995; LEIPPE et al., 2005; ZHANG et al., 2004). *E.*  
33 462 *dispar* also produces the same isoforms with lower activity, being APA and APB  
34 463 corresponding to 56% and 57% lower activity than the same isoforms from *E.*

35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

464 *histolytica*, respectively. Furthermore, the A, B and C isoforms have 95%, 91%  
465 and 88% structural homology, respectively, between these two species (NICKEL  
466 et al., 2001). Bujanover et al. (2003) evaluated the virulence and pathogenicity of  
467 the APA-deficient mutant HM1:IMSS *E. histolytica* strain and found that in the  
468 absence of APA, there is no development of ALA in hamsters, nor with inocula  
469 containing high concentrations of trophozoites. In our study, we did not observe  
470 significant differences in the *in vitro* and *in vivo* expression of APA or APC in both  
471 *E. dispar* strains evaluated when associated or not with EPEC. We suggest that  
472 APA or APC in our experimental model of ALA did not play an important role in  
473 the pathogenesis of liver parenchymal lesions caused by *E. dispar* strains.

474         Recently our research group reported that the association of MCR, ADO  
475 and VEJ *E. dispar* strains with the enterobacterium *Salmonella typhimurium*  
476 increased gene expression of amoebic virulence factors APA, CP5 and  
477 Gal/GalNAc-binding lectin. Furthermore, the increased expression of these  
478 virulence factors correlated with increased intensity of ulcerative amoebic colitis  
479 and inflammatory infiltrate, produced larger zones of erosion and ulceration,  
480 accompanied by increased expression of pro-inflammatory mediators  
481 cyclooxygenase 2, IL-1 and TNF $\alpha$  (OLIVEIRA et al., 2021). In our study, the  
482 association of EPEC with *E. dispar* strains also contributed to the hypothesis that  
483 the interaction of pathogenic bacteria can increase the intensity of amoebic liver  
484 necrosis. We observed that the association of EPEC with *E. dispar* strains was  
485 able to increase the ALA area only in the ACFN strain. No significant increase in  
486 ALA size was observed when the association with ADO was evaluated. In  
487 relation to inflammatory infiltrate, we found that it had a higher proportion in the  
488 liver parenchyma of hamsters infected with the ADO strain, associated or not with  
489 EPEC. When the lesions caused by the ACFN strain associated or not with EPEC  
490 were evaluated, no significant differences were observed in the inflammatory  
491 infiltrate. We suggest that probably the scarcity of inflammatory infiltrate in lesions  
492 caused by the ACFN strain is due in part to the death of inflammatory cells caused  
493 by trophozoites, evidenced by the presence of larger areas occupied with cell  
494 debris (BRUHN et al., 2003; BUJANOVER et al., 2003; LEIPPE; ANDRÄ;  
495 MÜLLER-EBERHARD, 1994; LEROY et al., 1995; PACHECO, 2004).

496         Regarding the cell activation profile in amoebic lesion, we observed  
497 differences between infections associated with EPEC. The association of EPEC

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

498 with ACFN strain was able to increase the levels of MPO, NAG and EPO, while  
499 the association with ADO strain only contributed to a reduction in NAG activity.  
500 The MPO enzyme, when in contact with the surface of trophozoites, is capable  
501 of amebicidal activity using the hydrogen peroxide produced by the amoebas  
502 themselves (PACHECO-YÉPEZ et al., 2011). A previous study evaluating ALA  
503 reported that in the first 3 hours after intrahepatic inoculation with *E. histolytica*,  
504 neutrophil numbers increased significantly, but after this period ALA evolution  
505 and MPO activity decreased (CRUZ-BAQUERO et al., 2017). Recently, it was  
506 found that infection with EPEC alone is also able to increase the neutrophilic  
507 inflammatory infiltrate and MPO enzyme activity (LEDWABA et al., 2020).  
508 However, at the time of infection evaluated in our study, the increase in MPO  
509 activity is related to the amoebic infection, since the evaluation of hamsters only  
510 infected with EPEC showed low activity of this enzyme. Furthermore, we found  
511 that the interaction between EPEC and ACFN *E. dispar* strains significantly  
512 increased the level of MPO activity, demonstrating greater action of neutrophils.  
513 Neutrophils are the most important cell type during the early stages of amoebic  
514 infection. If properly activated, they can eliminate some trophozoites by activating  
515 oxidative and non-oxidative mechanisms, such as the formation of NETs  
516 (neutrophil extracellular traps), cell degranulation, free radical generation ( $O_2^-$ ,  
517  $H_2O_2$ , HOCl), and activation of enzymes such as MPO and NADPH oxidase  
518 (CAMPOS-RODRÍGUEZ et al., 2016). We suggest that the increase in  
519 neutrophilic activity in liver damage in two hamsters that were submitted to  
520 infection with two EPEC-associated ACFN strain trophozoites is due to the host  
521 response to trophozoites that show increased virulence by association.

522 Eosinophil peroxidase is the most abundant cationic protein in the specific  
523 granules of eosinophils, and it is known to induce the generation of reactive  
524 oxygen species, performing cytotoxic actions against parasites (ACHARYA;  
525 ACKERMAN, 2014). In our study, we found that EPO activity increased only in  
526 the liver lesion of hamsters infected with EPEC-associated ACFN strain  
527 trophozoites, probably because of the increased virulence of ACFN trophozoites  
528 after interaction with EPEC. The lysosomal enzyme NAG is found in  
529 macrophages and used as a marker to evaluate the activity of this cell (BAILEY,  
530 1988). In NAG quantification, a similar result to that observed with MPO and EPO  
531 was demonstrated. In our study, we recorded increased NAG activity in the liver

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

532 parenchyma of hamsters that were subjected to infection with trophozoites of the  
533 EPEC-associated ACFN strain. This result reinforces the hypothesis that relates  
534 the increased cellular activity as a result of the increased virulence of trophozoites  
535 of this strain after interaction with EPEC. In addition, we observed a positive  
536 correlation between the area of necrosis and the activity of the MPO enzyme  
537 related to the ACFN strain (associated and not to EPEC), showing that the higher  
538 the enzyme activity, the larger the zone of liver necrosis. Collectively these  
539 results, together with other results recorded in our study, demonstrate that ALA  
540 development is related to the distinct biological behavior of *E. dispar* strains  
541 studied here, and in their ability to interact with EPEC. In addition, the host  
542 immune response to trophozoites is also responsible for contributing to ALA  
543 development. Finally, our results reiterate the importance of synergism between  
544 different species of pathogens. Trophozoites are able to phagocytize bacteria  
545 from several families, such as Lactobacilaceae, Clostridiaceae,  
546 Bifidobacteriaceae, Enterobacteriaceae, and others. We still have no knowledge  
547 about the possible mechanisms involving these interactions, nor about their  
548 specificity. Previous studies have demonstrated increased expression of  
549 virulence factors, such as Gal/GalNAc-binding lectin, amoebapores and cysteine  
550 proteinases in *E. histolytica* and *E. dispar* strains when associated with  
551 enterobacteria, such as *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* and  
552 enteropathogenic *Escherichia coli* (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; GALVÁN-  
553 MOROYOQUI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2021). Most studies involve only one  
554 strain of *E. histolytica* or *E. dispar*, which is a limiting factor for the study of  
555 biological behavior. Given our results, we reinforce that the interaction between  
556 microorganisms occurs not only at the species-species level, but also at the  
557 strain-species level, enhancing the theory that there is a heterogeneity in the  
558 biological behavior of different *E. dispar* strains (DA SILVA et al., 2021). Different  
559 strains of the same species can behave in different ways in association with  
560 different microorganisms.

561 Thus, our study evidenced that the interaction of EPEC with ACFN and  
562 ADO *E. dispar* strains resulted in differences in *in vitro* and *in vivo* gene  
563 expression of Gal/GalNAc-binding lectin and CP2, differences in the enzymatic  
564 activities of MPO, NAG and EPO, and consequently in the ability to cause lesions.  
565 We believe that these important findings will help elucidate the mechanisms of

1 566 symbiosis between microorganisms, at the species-to-species as well as strain-  
2 567 to-species level. In addition, they will help clarify the virulence and pathogenicity  
3 568 mechanisms used by *E. dispar* trophozoites in the development of diseases in  
4 569 the intestine (GRAFFEO et al., 2014) and liver (XIMÉNEZ et al., 2010) of humans,  
5 570 as well as in the development of experimental lesions in association with  
6 571 pathogenic enterobacteria (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2019; GALVÁN-  
7 572 MOROYOQUI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2021).

8 573

#### 9 574 **Author contributions**

10 575 C.A.V.S., F.M.S.O., and M.V.C., designed research, analyzed data, and wrote  
11 576 the paper. C.A.V.S., C.E.C.S., M.F.P.C., C.S.S.M., R.E.C., C.A.L., K.C., L.T.S.,  
12 577 P.C.L.S., A.C.N and E.N., performed experiments, F.M.S.O., M.A.G., and M.V.C.  
13 578 analyzed data and organized figures. F.M.S.O., M.V.C., M.A.G., A.C.N., and  
14 579 E.N., contributed to manuscript revision.

15 580

#### 16 581 **Acknowledgments**

17 582 This work was financially supported by the Dean of Research of the Federal  
18 583 University of Minas Gerais (*Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal*  
19 584 *de Minas Gerais- PRPq/UFMG*), and the National Council for Research and  
20 585 Development (*Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq*),  
21 586 MVC is Research Fellows from CNPq (308900/2017-0).

22 587

#### 23 588 **Competing interests**

24 589 The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in study  
25 590 design, data collection, and analysis, decision to publish or preparation of the  
26 591 manuscript.

27 592

28 593

29 594

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

595 **Legends**

596

597 **Figure 1 - Effect of *in vitro* and *in vivo* association of enteropathogenic**  
 598 ***Escherichia coli* (EPEC) on gene expression of the virulence factors**  
 599 **Gal/GalNAc-binding lectin (Gal/GalNAc), cysteine proteinase 2 (CP2) and**  
 600 **amoebapore C (APC) of *E. dispar*:**

601 The relative expression of Gal/GalNAc, CP2 and APA genes of *E. dispar* were  
 602 performed in associated cultures or not (*in vitro*), and in liver parenchyma  
 603 samples from hamsters experimentally infected with pure and associated *E.*  
 604 *dispar* cultures (*in vivo*).The association time of *E. dispar* cultures to EPEC was  
 605 18 hours. A) Experimental design of co-infection *in vitro*. B) Experimental design  
 606 of *E. dispar* strains infection, with or without EPEC association and subsequent  
 607 euthanasia. C) to F): Unpaired Student's t test. Results represented by mean  $\pm$   
 608 S.E.M. G) and H): Mann-Whitney test. Results represented by median, minimum  
 609 and maximum. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , n=5.

610

611 **Figure 2 – Macroscopy and histopathology of Amoebic liver abscess (ALA)**  
 612 **from hamster liver inoculated with ADO and ACFN strains of *E. dispar*,**  
 613 **associated or not with EPEC:**

614 Macroscopy of the liver showing areas of firm or low consistency (arrows)  
 615 yellowish-white necrosis in the groups: A) Hamster inoculated with 100,000  
 616 trophozoites of ACFN strain. B) Amoebic liver abscess (A) produced by ACFN  
 617 strain. Bar= 100 $\mu$ m. C) Higher magnification of the previous figure demonstrating  
 618 necrosis (#), circumscribed by basophilic areas represented by cell debris (\*).  
 619 Presence of *E. dispar* trophozoites (arrowheads). Bar= 50 $\mu$ m. D) Hamster  
 620 inoculated with 100,000 trophozoites of ACFN strain associated with  
 621 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). E) Amoebic liver abscess (A)  
 622 produced by ACFN strain in association with enteropathogenic *Escherichia coli* -  
 623 EPEC. F) Higher magnification of the previous figure demonstrating necrosis (#),  
 624 circumscribed by basophilic areas represented by cell debris (\*). Presence of *E.*  
 625 *dispar* trophozoites (arrowheads). Bar= 50 $\mu$ m. G) Hamster inoculated with  
 626 100,000 trophozoites of ADO strain. H) Amoebic liver abscess (A) produced by  
 627 ADO strain. Bar= 100 $\mu$ m. I) Higher magnification of the previous figure  
 628 demonstrating necrosis (#), circumscribed by basophilic areas represented by



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

629 cell debris (\*). Presence of *E. dispar* trophozoites (arrowheads). Bar= 50µm. J)  
630 Hamster inoculated with 100,000 trophozoites of ADO strain associated with  
631 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). K) Amoebic liver abscess (A)  
632 produced by ADO strain in association with enteropathogenic *Escherichia coli* -  
633 EPEC. L) Higher magnification of the previous figure demonstrating necrosis (#),  
634 circumscribed by basophilic areas represented by cell debris (\*). Presence of *E.*  
635 *dispar* trophozoites (arrowheads). Bar= 50µm. P= Non-necrotic Parenchyma. All  
636 histological sections were stained with Hematoxylin and Eosin.

637  
638 **Figure 3 - Effect of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) on amoebic**  
639 **liver abscess and the enzymatic activity of neutrophils, macrophages and**  
640 **eosinophils from hamsters inoculated with ADO and ACFN strains of *E.***  
641 ***dispar*, associated or not with EPEC.** Digital morphometry of the necrosis area  
642 and the activity of MPO, NAG and EPO enzymes were performed in the liver  
643 parenchyma samples of hamsters experimentally infected with *E. dispar*,  
644 associated or not with EPEC, after four days of infection. The association time of  
645 *E. dispar* cultures with EPEC was 18 hours. A): Mann-Whitney test. Results  
646 represented as median, minimum and maximum. B and C): Kruskal-Wallis test.  
647 Results represented by median, minimum and maximum. D, E and F): One-way  
648 ANOVA test. Results expressed as mean and S.E.M. G): Spearman's  
649 Correlation. Results expressed as r (p=0.01). \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 and  
650 \*\*\*\*p<0.0001.

651

## 652 References

- 653 ABASSZADE, J. H. et al. Amoebic colitis: A case series of a recurring missed  
654 diagnosis. **JGH Open**, v. 5, n. 3, p. 404–407, 22 mar. 2021.
- 655 ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and  
656 Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17406–17415,  
657 jun. 2014.
- 658 BAILEY, P. J. [29] Sponge implants as models. Em: [s.l: s.n.]. p. 327–334.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 659 BHATTACHARYA, A. et al. Modulation of a surface antigen of *Entamoeba*  
660 *histolytica* in response to bacteria. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 4, p.  
661 1711–1713, abr. 1992.
- 662 BLAZQUEZ, S. et al. Initiation of inflammation and cell death during liver  
663 abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the  
664 galactose/N-acetyl-d-galactosamine lectin. **International Journal for**  
665 **Parasitology**, v. 37, n. 3–4, p. 425–433, mar. 2007.
- 666 BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; MIRELMAN, D. Transcriptional Silencing of  
667 an Amoebapore Gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular Analysis and Effect  
668 on Pathogenicity. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 295–305, abr. 2003.
- 669 BRUHN, H. et al. Amoebapores and NK-lysin, members of a class of  
670 structurally distinct antimicrobial and cytolytic peptides from protozoa and  
671 mammals: a comparative functional analysis. **Biochemical Journal**, v. 375, n.  
672 3, p. 737–744, 1 nov. 2003.
- 673 BUJANOVER, S. et al. A virulence attenuated amoebapore-less mutant of  
674 *Entamoeba histolytica* and its interaction with host cells. **International Journal**  
675 **for Parasitology**, v. 33, n. 14, p. 1655–1663, dez. 2003.
- 676 CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. et al. A review of the proposed role of neutrophils in  
677 rodent amebic liver abscess models. **Parasite**, v. 23, p. 6, 15 fev. 2016.
- 678 CLARKE, S. C. et al. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global  
679 Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 365–378, jul. 2003.
- 680 COSTA, A. O. et al. Comparison of Xenic and Monoxenic *Entamoeba dispar*  
681 Cultures Using Hepatic Inoculation in Hamster. **Archives of Medical**  
682 **Research**, v. 31, n. 4, p. S247–S248, jul. 2000.
- 683 COSTA, A. O. et al. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and  
684 monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. **Revista do**  
685 **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 5, p. 245–250, out.  
686 2006.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 687 COSTA, C. A. et al. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the  
688 liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. **Parasites &**  
689 **Vectors**, v. 3, n. 1, p. 23, 26 dez. 2010a.
- 690 COSTA, C. A. X. et al. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally  
691 induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. **Parasite**, v. 14, n.  
692 4, p. 329–334, 15 dez. 2007.
- 693 COSTA, C. A. X. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the  
694 hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. **European**  
695 **Journal of Histochemistry**, v. 54, n. 3, p. 39, 26 ago. 2010b.
- 696 COSTA, C. A. X. et al. Influence of inflammation on parasitism and area of  
697 experimental amoebic liver abscess: an immunohistochemical and  
698 morphometric study. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 27, 28 dez. 2011.
- 699 CRUZ-BAQUERO, A. et al. Different behavior of myeloperoxidase in two rodent  
700 amoebic liver abscess models. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0182480, 10 ago.  
701 2017.
- 702 DA SILVA, C. A. V. et al. South American *Entamoeba dispar* strains produce  
703 amoebic liver abscesses with different pathogenicities and evolutionary kinetics.  
704 **Acta Tropica**, v. 224, p. 106114, dez. 2021.
- 705 DEBORAH CHEN, H.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*:  
706 unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83–98,  
707 jan. 2005.
- 708 DHEILLY, N. M. et al. Parasite microbiome project: Grand challenges. **PLOS**  
709 **Pathogens**, v. 15, n. 10, p. e1008028, 10 out. 2019.
- 710 DOS SANTOS ZANETTI, A. et al. Diversity, geographical distribution, and  
711 prevalence of *Entamoeba* spp. in Brazil: a systematic review and meta-analysis.  
712 **Parasite**, v. 28, p. 17, 30 mar. 2021.
- 713 ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of  
714 Intestinal Amebiasis: From Molecules to Disease. **Clinical Microbiology**  
715 **Reviews**, v. 13, n. 2, p. 318–331, abr. 2000.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 716 FÉLIX-SILVA, E.; MAYRINK, W. Estudos sobre a *Entamoeba moshkovskii*. II -  
717 Novos focos em diversos tipos de coleções hídricas no Brasil e no Uruguai.  
718 **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, p. 203–221, jul. 1974.
- 719 FERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. A. et al. Entamoeba histolytica Interaction with  
720 Enteropathogenic Escherichia coli Increases Parasite Virulence and  
721 Inflammation in Amebiasis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 12, dez. 2019.
- 722 FURST, C. et al. Biological aspects of a Brazilian strain of Entamoeba dispar.  
723 **Pathologica**, v. 94, n. 1, p. 22–7, fev. 2002.
- 724 GALVÁN-MOROYOQUI, J. M. et al. The Interplay between Entamoeba and  
725 Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. **PLoS Neglected**  
726 **Tropical Diseases**, v. 2, n. 7, p. e266, 23 jul. 2008.
- 727 GOMES, M. A. et al. Characterization of Entamoeba histolytica and Entamoeba  
728 dispar by Biological, Biochemical, and Molecular Parameters. **Archives of**  
729 **Medical Research**, v. 31, n. 4, p. S249–S250, jul. 2000.
- 730 GORELIK, O. et al. Vibrio cholerae autoinducer-1 enhances the virulence of  
731 enteropathogenic Escherichia coli. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 4122, 11  
732 dez. 2019.
- 733 GRAFFEO, R. et al. *Entamoeba dispar*: A Rare Case of Enteritis in a Patient  
734 Living in a Nonendemic Area. **Case Reports in Gastrointestinal Medicine**, v.  
735 2014, p. 1–3, 2014.
- 736 GUPTA, S. S. et al. Acute fulminant necrotizing amoebic colitis: a rare and fatal  
737 complication of amoebiasis: a case report. **Cases Journal**, v. 2, n. 0, 1 set.  
738 2009.
- 739 HAQUE, R. et al. Amebiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16,  
740 p. 1565–1573, 17 abr. 2003.
- 741 LEDWABA, S. E. et al. Enteropathogenic Escherichia coli Infection Induces  
742 Diarrhea, Intestinal Damage, Metabolic Alterations, and Increased Intestinal  
743 Permeability in a Murine Model. **Frontiers in Cellular and Infection**  
744 **Microbiology**, v. 10, 17 dez. 2020.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 745 LEIPPE, M. Ancient weapons: NK-lysin, is a mammalian homolog to pore-  
746 forming peptides of a protozoan parasite. **Cell**, v. 83, n. 1, p. 17–18, out. 1995.
- 747 LEIPPE, M. et al. Ancient weapons: the three-dimensional structure of  
748 amoebapore A. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 1, p. 5–7, jan. 2005.
- 749 LEIPPE, M.; ANDRÄ, J.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. Cytolytic and antibacterial  
750 activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming  
751 peptide of *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy of**  
752 **Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2602–2606, 29 mar. 1994.
- 753 LEIPPE, M.; MÜLLER-EBERHARD, H. J. The pore-forming peptide of  
754 *Entamoeba histolytica*, the protozoan parasite causing human amoebiasis.  
755 **Toxicology**, v. 87, n. 1–3, p. 5–18, fev. 1994.
- 756 LEROY, A. et al. Contact-dependent transfer of the galactose-specific lectin of  
757 *Entamoeba histolytica* to the lateral surface of enterocytes in culture. **Infection**  
758 **and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4253–4260, nov. 1995.
- 759 LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data  
760 Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, v. 25,  
761 n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- 762 NICKEL, R. et al. Pore-forming peptides of *Entamoeba dispar*. **European**  
763 **Journal of Biochemistry**, v. 265, n. 3, p. 1002–1007, 25 dez. 2001.
- 764 OLIVEIRA, F. M. S. et al. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. **Tropical**  
765 **Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 9, 2015.
- 766 OLIVEIRA, F. M. S. et al. Comorbidity associated to *Ascaris suum* infection  
767 during pulmonary fibrosis exacerbates chronic lung and liver inflammation and  
768 dysfunction but not affect the parasite cycle in mice. **PLOS Neglected Tropical**  
769 **Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007896, 25 nov. 2019.
- 770 OLIVEIRA, F. M. S. et al. Co-infection by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*  
771 serovar typhimurium and *Entamoeba dispar* pathogenic strains enhances colitis  
772 and the expression of amoebic virulence factors. **Microbial Pathogenesis**, v.  
773 158, p. 105010, set. 2021.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 774 PACHECO, J. In vitro and in vivo interaction of *Entamoeba histolytica*  
775 Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis.  
776 **Parasitology International**, v. 53, n. 1, p. 35–47, mar. 2004.
- 777 PACHECO-YÉPEZ, J. et al. Myeloperoxidase binds to and kills *Entamoeba*  
778 *histolytica* trophozoites. **Parasite Immunology**, v. 33, n. 5, p. 255–264, maio  
779 2011.
- 780 PAKPINYO, S. et al. Enhancement of enteropathogenic *Escherichia coli*  
781 pathogenicity in young turkeys by concurrent turkey coronavirus infection.  
782 **Avian diseases**, v. 47, n. 2, p. 396–405, 2003.
- 783 PETRI, W. A.; HAQUE, R.; MANN, B. J. The Bittersweet Interface of Parasite  
784 and Host: Lectin-Carbohydrate Interactions During Human Invasion by the  
785 Parasite *Entamoeba histolytica*. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1,  
786 p. 39–64, out. 2002.
- 787 PIRES, S. M. et al. Aetiology-Specific Estimates of the Global and Regional  
788 Incidence and Mortality of Diarrhoeal Diseases Commonly Transmitted through  
789 Food. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0142927, 3 dez. 2015.
- 790 QUE, X.; REED, S. L. The role of extracellular cysteine proteinases in  
791 pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. **Parasitology Today**, v. 13, n.  
792 5, p. 190–194, maio 1997.
- 793 QUE, X.; REED, S. L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of  
794 Amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 2, p. 196–206, 1 abr.  
795 2000.
- 796 REED, S. L. et al. The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba*  
797 *histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. **Journal of immunology**  
798 **(Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 1, p. 266–74, 1 jul. 1995.
- 799 SAFFER, L. D.; PETRI, W. A. Role of the galactose lectin of *Entamoeba*  
800 *histolytica* in adherence-dependent killing of mammalian cells. **Infection and**  
801 **Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4681–4683, dez. 1991.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- 802 SEYDEL\*, ‡, KARL B. et al. Epithelial cell–initiated inflammation plays a crucial  
803 role in early tissue damage in amebic infection of human intestine.  
804 **Gastroenterology**, v. 115, n. 6, p. 1446–1453, dez. 1998.
- 805 SHENOY, V. P. et al. Hepato-pulmonary amebiasis: a case report. **Brazilian**  
806 **Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 372–373, ago. 2010.
- 807 SHIBAYAMA, M. et al. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO)  
808 produces amoebic liver abscess in hamsters. **Annals of Hepatology**, v. 6, n. 2,  
809 p. 117–118, abr. 2007.
- 810 SHIRLEY, D.-A. T.; WATANABE, K.; MOONAH, S. Significance of amebiasis:  
811 10 reasons why neglecting amebiasis might come back to bite us in the gut.  
812 **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007744, 14 nov. 2019.
- 813 STANLEY, S. L. Amoebiasis. **The Lancet**, v. 361, n. 9362, p. 1025–1034, mar.  
814 2003.
- 815 WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis.  
816 Mexico City, Mexico 28–29 January, 1997. **Epidemiological bulletin**, v. 18, n.  
817 1, p. 13–4, mar. 1997.
- 818 WILSON, I. W. et al. Genetic Diversity and Gene Family Expansions in  
819 Members of the Genus *Entamoeba*. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n.  
820 3, p. 688–705, 1 mar. 2019.
- 821 XIMÉNEZ, C. et al. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm? **International**  
822 **Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 1105–  
823 1120, 16 mar. 2010.
- 824 XIMÉNEZ, C. et al. Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba*  
825 *histolytica* vs *E. dispar* in a model of infection using human liver tissue explants.  
826 **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. e0181962, 3 ago. 2017.
- 827 YURCHENKO, V.; LUKEŠ, J. Parasites and their (endo)symbiotic microbes.  
828 **Parasitology**, v. 145, n. 10, p. 1261–1264, 8 set. 2018.
- 829 ZHANG, X. et al. Expression of Amoebapores Is Required for Full Expression of  
830 *Entamoeba histolytica* Virulence in Amebic Liver Abscess but Is Not Necessary

1 831 for the Induction of Inflammation or Tissue Damage in Amebic Colitis. **Infection**  
2 832 **and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 678–683, fev. 2004.  
3  
4 833  
5  
6 834  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



Figure 1

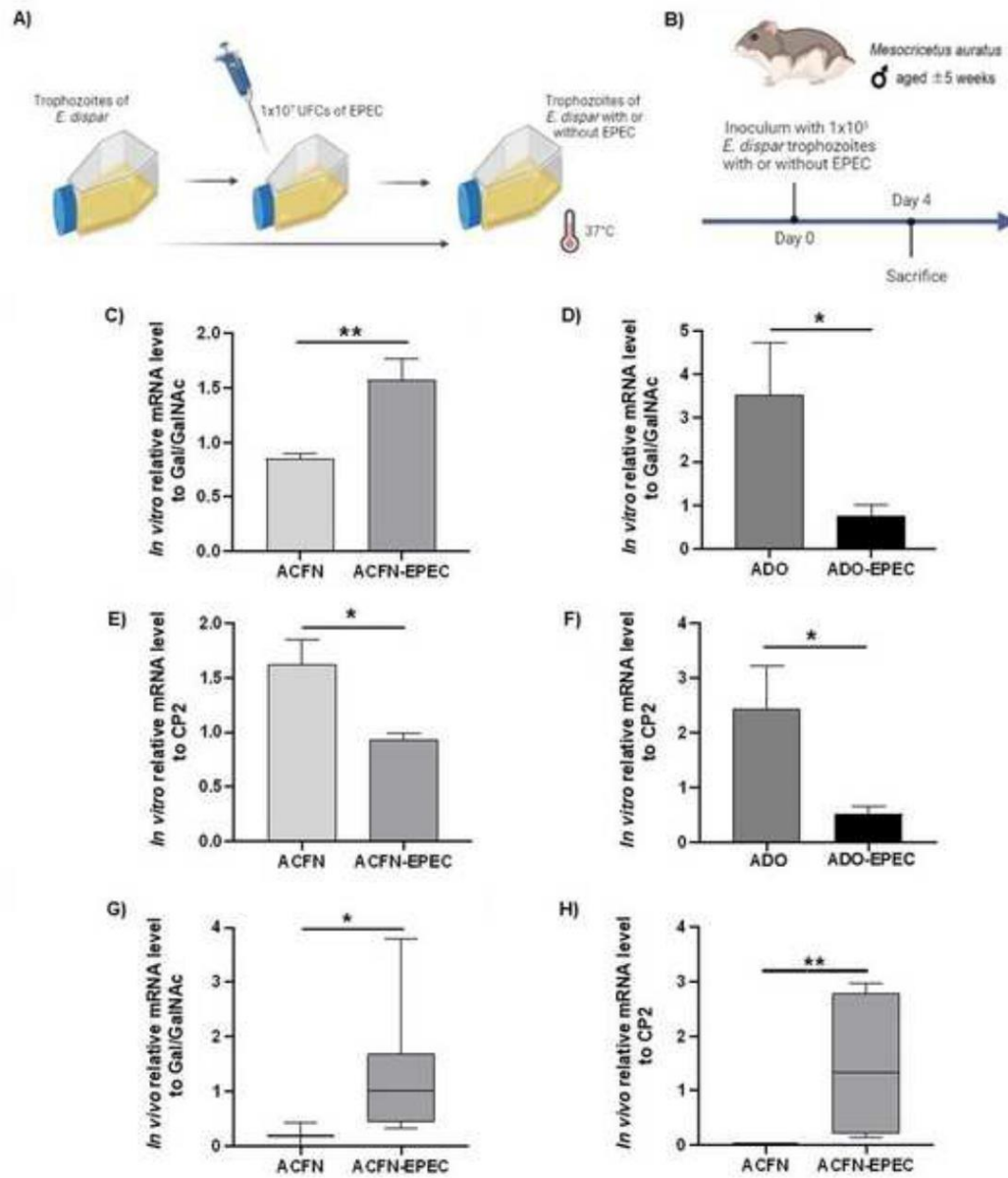
[Click here to access/download;Figure;Figure1.tif](#)


Figure 2

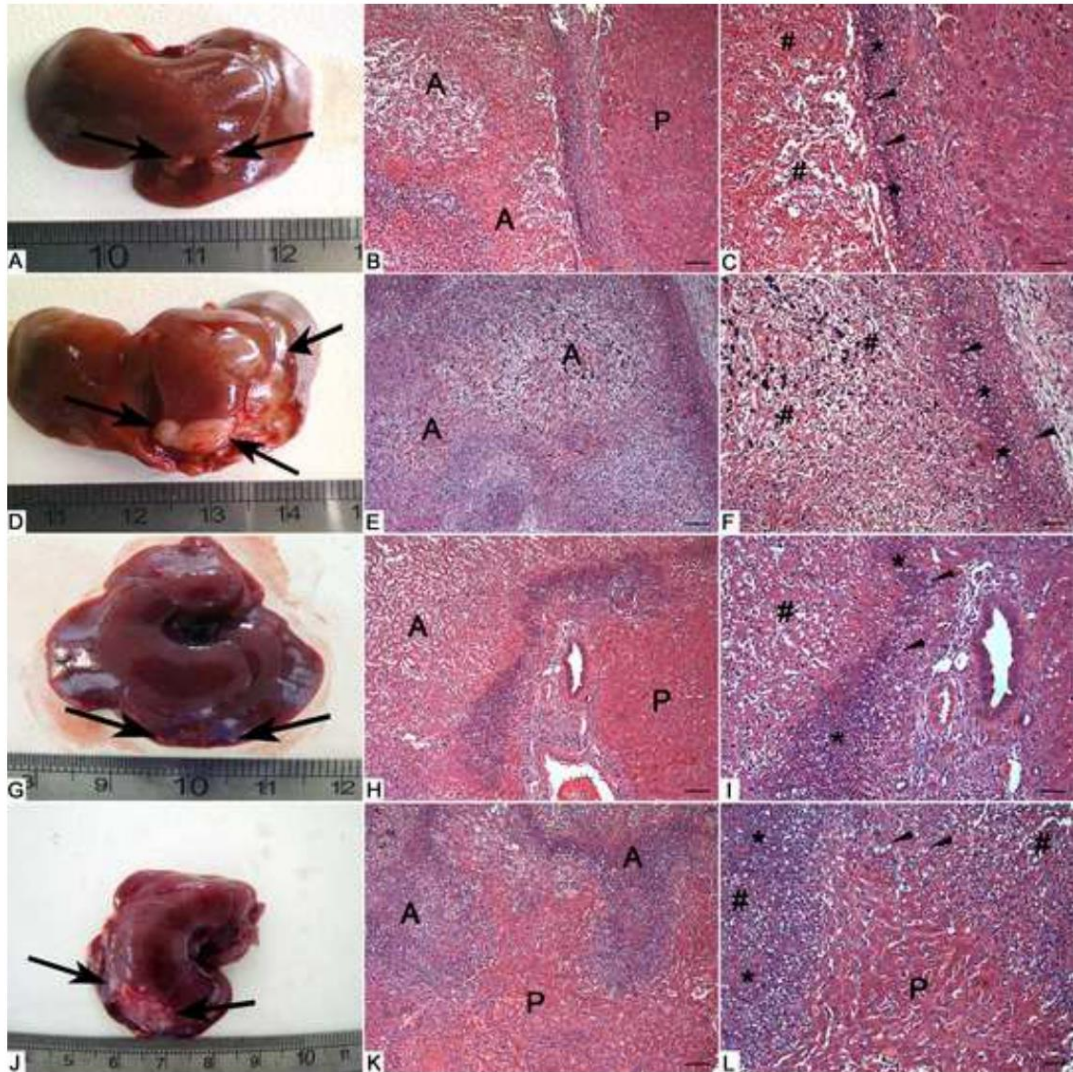
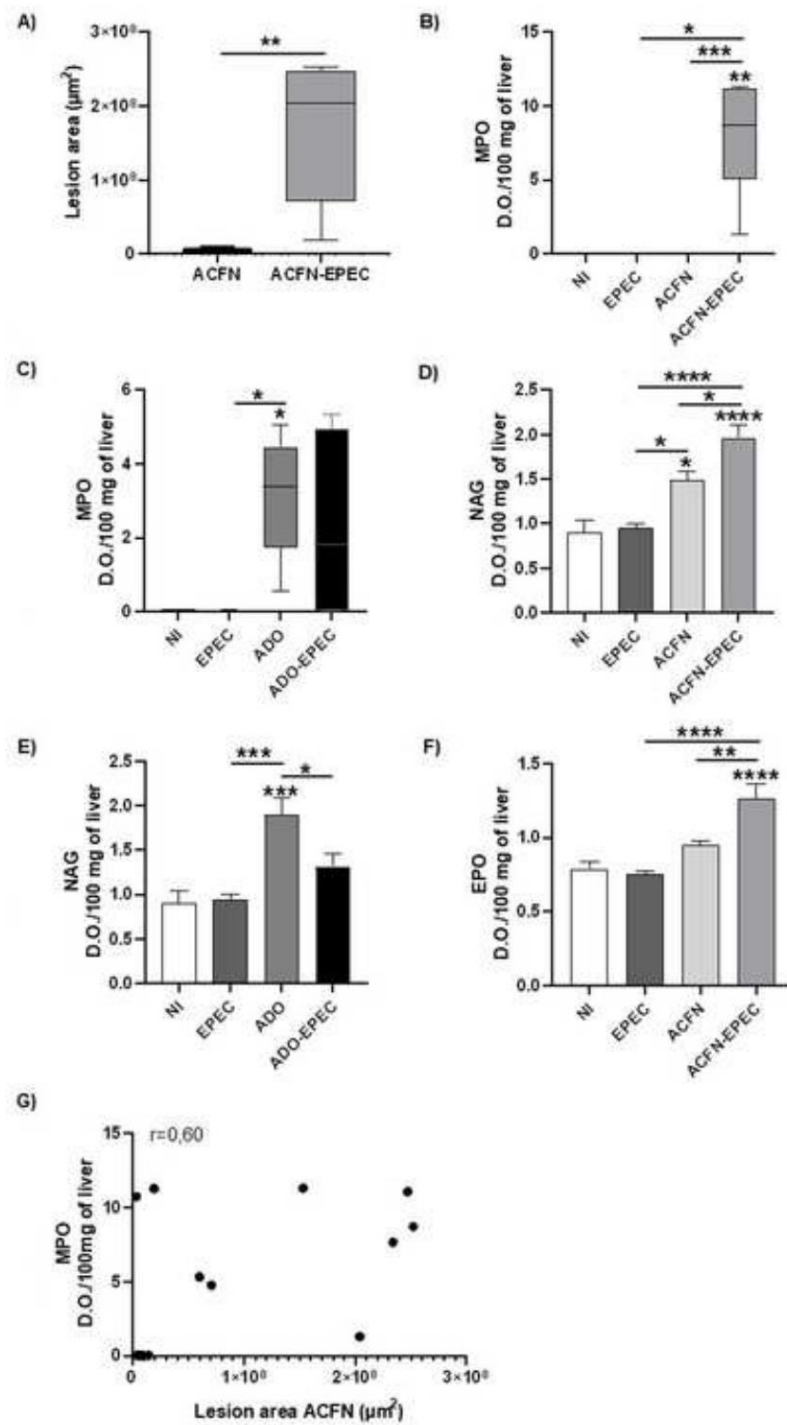
[Click here to access/download;Figure;Figure2.tif](#)

Figure3

[Click here to access/download;Figure;Figure3.tif](#)


**Table 1:** Primer sequences used to assess the relative expression of amoebic virulence factors and constitutive genes by RT-qPCR

Gene	Primer sequences
Beta-actin	F 5' AAGCTGCATCAAGCGTGAA 3' R 5' ACCAAGGAATGATGGAGA 3'
GAPDH	F 5' GGAAGTGTGAAGCTGGAGA 3' R 5' CCCCATCCAATTTGAGCTGG 3'
CP2	F 5' GTTTGTGCTGTTGGATATGGTGT 3' R 5' CCTTTATCCCCATCCTGTTCC 3'
APA	F 5' TCACTGCTACTCACCAAGGA 3' R 5' CTTTATCAGCTCCCTTAGTGGT 3'
APC	F 5' TGTGCTAAAGCAGATGGTGTAT 3' R 5' AAGTTTAGCACTTCCTCCCTCT 3'
Gal/GalNAc lectin	F 5' TGCGAAACTGCAACATGTGATC 3' R 5'GGTGTGATTGTGGGAATTCTTC 3'

Table(Editable version)

[Click here to access/download;Table\(Editable version\);Table 2.docx](#)**Table 2.** Semi-quantitative analysis of inflammation and parasitism of ACFN and ADO strains of *E. dispar* associated or not with EPEC.

Group	Inflammation intensity score					Parasitism intensity score				
	0 (n)	I (n)	II (n)	III (n)	p*	0 (n)	I (n)	II (n)	III (n)	p*
ACFN	4	4	0	0		5	3	0	0	
ACFN-EPEC	0	1	7	0	0,0008	0	0	2	6	0,0002
ADO	0	3	3	0	>0,9999	2	2	2	0	
ADO-EPEC	1	3	4	0		2	4	1	1	0,81

0 = Absence of inflammation or parasitism, I = Slight inflammation or parasitism, II = Mild inflammation or parasitism, III – Intense inflammation or parasitism, (n) = number of animals categorized in the score. ( $p^* = 0,0008$ ) ACFN inflammation vs. ACFN-EPEC; ( $p^* = 0,0002$ ) ACFN trophozoites vs. ACFN-EPEC; ( $p^* = > 0,9999$ ) ADO inflammation vs. ADO-EPEC/ ( $p^* = 0,81$ ) ADO trophozoites vs ADO-EPEC.