

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Modulação da atividade funcional de fagócitos
mononucleares de sangue periférico por citocinas na
presença de *Entamoeba histolytica***

Lucélia Campelo de Albuquerque Moraes

Belo Horizonte - MG

2015

LUCÉLIA CAMPELO DE ALBUQUERQUE MORAES

**Modulação da atividade funcional de fagócitos
mononucleares de sangue periférico por citocinas na
presença de *Entamoeba histolytica***

Tese apresentada ao Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências-Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientadora: Dra. Adenilda Cristina Honório-França

Coorientador: Dr. Eduardo Luzia França

Belo Horizonte

2015

Título da Tese: Modulação da atividade funcional de fagócitos mononucleares de sangue periférico por citocinas na presença de *Entamoebahistolytica*

Nº de Páginas da Tese: 112 páginas

Palavras chave: Leucofagocitose, Atividade Amebicida, Citocinas, Células Mononucleares, *Entamoebahistolytica*.

Banca Examinadora:

Dra. Adenilda Cristina Honório França (Orientadora)

Dr. Eduardo Luzia França (Coorientador)

Dra. Maria Aparecida Gomes

Dr. Carlos Kusano Bucalen Ferrari

Dra. Inês Aparecida Tozetti

Dra. Angélica Rosa Faria

Data da defesa: 24/02/2015

Data do Início do Curso: 12/03/2012

Data do Término do Curso: 24/02/2015

Orientadora: Dra. Adenilda Cristina Honório França

Coorientador: Dr. Eduardo Luzia França

Colaboradores

Laboratório de Imunomodulação e Cronobiologia, ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças-MT.

Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França

Profa. Dr. Eduardo Luzia França

Laboratório de Amebíase, Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG, Belo Horizonte-MG.

Prof.^a Dra. Maria Aparecida Gomes

Instituições Parceiras:

Universidade Federal de Mato Grosso- UFMT

Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG

Suporte Financeiro

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMAT- Fundação para o Amparo à Pesquisa de Estado de Mato Grosso

Agradecimentos

A Deus pela força, refúgio e fortaleza.

A minha Orientadora, Profa. Dra. Adenilda Cristina Honório França, a qual pude conhecê-la e admirá-la pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à Ciência. Neste período em que fui sua orientanda, fui agraciada com parte de seu conhecimento, ao qual serei sempre grata. Agradeço à paciência com que me orientou ao longo deste processo. Foi a somatória de tudo isso que me possibilitou realizar este projeto.

Ao meu Coorientador, Dr. Eduardo Luzia França, pela alegria, sabedoria e palavras de entusiasmo em todo este período, além dos conselhos para amadurecimento. Com certeza, seus ensinamentos levarei ao curso de minha vida profissional.

À Equipe do Laboratório de Amebíase ICB/UFMG, em especial à Profa. Dra. Maria Aparecida Gomes e ao Sr. João da Costa Viana, Élide, Thaísa, Luciana e Fabricius, pela contribuição e por todos os ensinamentos durante o doutorado. Mesmo breves, nossos encontros foram fundamentais para minha evolução, muito obrigada!

Aos Colegas de Doutorado, que colaboraram durante todo o tempo de execução desse projeto; obrigada em especial à Ana Paula, Izabella, Luana, Mara Gil, Maurício, Natália e Max.

Aos Colegas do Laboratório de Imunologia Materno Infantil do ICBS/CUA/UFMT: Danny Laura, Rafael Pessoa, Tassiane, Mahmi, pelas colaboração com as metodologias, pela grata oportunidade de ter convivido com uma Equipe tão maravilhosa, e sempre muito prestativa.

À Luana Mores, por ter oferecido um pouco do seu tempo a fim de repassar algumas metodologias úteis e necessárias para execução deste estudo.

Aos meus queridos Alunos Renata Sales, Michellen Carvalho por terem contribuído nas análises laboratoriais durante o doutorado.

Ao Victor Pena Ribeiro pelo tempo dedicado aos meus experimentos e por toda disponibilidade, independente do dia e hora da semana.

As minhas Alunas Ludymilla e Daniela por terem colaborado nas culturas das cepas e em algumas metodologias.

À Larissa e Núbia, grandes Amigas, por ceder seus ouvidos nos momentos de angústia e ansiedade, mesmo longe, a nossa amizade é eterna. Obrigada!

Aos Professores do Programa Dinter pela experiência transmitida, dedicação e persistência em acreditar no potencial do grupo.

À Coordenadora Profa. Dra. Érika Martins Braga, por toda a dedicação destinada ao Programa, pela paciência e conhecimento transmitido.

Ao prof. Dr. Wagner Welber Arrais, por ter disponibilizado o uso do microscópio invertido.

A minha Mãe, exemplo de amor, liderança e fé, sempre me confortando na necessidade de palavras otimistas e encorajadoras, sempre busquei em ti minha inspiração para continuar!

Aos meus Avós *in memoriam* Jazony Smith e José Albuquerque, por terem me ensinado a ser persistente e a sempre lutar, e nunca me curvar diante das dificuldades. Quanta saudade desse casal pelo belo exemplo de amor, união, bondade e afeto. Se eu cheguei até aqui, tem muito deles nessa trajetória!

A minha Família, meu Pai, tios, tias, primos e primas que, mesmo distante, sempre reconheceram minha luta, e, se, muitas vezes, deles não estive perto foi para simplesmente conquistar este objetivo!

A CAPES pelo apoio financeiro durante o doutorado.

À Turma do Dinter de 2012. Foi ótimo estar com todos nas viagens, treinamentos e translados a Belo Horizonte, nas aulas e nos encontros sempre com muito carinho, bom humor e dedicação. Jamais me esquecerei das piadas da Profa. Mara Gil nas viagens!

Ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia e ao Departamento de Parasitologia pelo suporte de um programa de excelência. Agradecimentos às Secretárias do Curso Sumara e Sibebe pelo suporte e presteza em todos os momentos solicitados.

Gostaria de agradecer em especial ao meu Noivo Ricardo pelo amor, companheirismo, paciência, e, por muitas e muitas noites, ter me acolhido, mostrando que estava comigo neste percurso. Agradeço ainda por me auxiliar em muitas decisões, por todo afeto e preocupação demonstrados a mim, muitas vezes abdicando da própria vida profissional para estar ao meu lado neste momento tão especial. Ele permitiu que eu não me abatesse diante dos problemas, incentivando-me a continuar, e a jamais desistir.

A ele, além do meu amor, minha imensa gratidão.

Você é joia rara do Senhor, valioso és para mim!

“Não devemos ter medo dos confrontos. Até os planetas se chocam e do caos nascem as estrelas”.
Charles Chaplin

Sumário

Lista de Tabelas	viii
Lista de figuras	ix
Lista de abreviaturas	x
Resumo	xii
Abstract	xiii
1. Introdução	1
1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	2
1.2. Amebíase e epidemiologia	5
1.3. Patogênese e patogenicidade	7
1.4. Diagnóstico	9
1.4.1. Clínico	9
1.4.2. Laboratorial	10
1.5. Tratamento e profilaxia	12
1.6. Resposta imune para a <i>E. histolytica</i>	12
2. Justificativa	18
3. Objetivos	21
3.1. <i>Objetivo Geral</i>	22
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	22
4. Material e Métodos	23
4.1. Sujeitos e aspectos éticos	24
4.2. Parasitos	24
4.3. Obtenção e separação de amostras de sangue periférico humano	25
4.5. Culturas de fagócitos com <i>E. histolytica</i>	25
4.6. Quantificação das citocinas	26
4.7. Imunofenotipagem	26
4.8. Incubação das citocinas com os fagócitos do sangue periférico	27
4.9. Atividade Funcional de fagócitos mononucleares	27
4.9.1. Dosagem de ânion superóxido	27
4.9.2. Ensaio de Leucofagocitose	28
4.9.3. Ensaio de Apoptose	28

4.9.4. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano	29
4.10. Análise Estatística	29
5. Resultados	31
5.1. Imunofenotipagem	33
5.2. Concentrações de citocinas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17) liberadas em culturas de fagócitos MN e trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	34
5.3. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas.....	35
5.4. Leucofagocitose	37
5.5. Atividade amebicida dos fagócitos MN	38
5.6. Índice de apoptose de fagócitos MN em presença, ou não, de <i>E. histolytica</i> , tratados, ou não, por citocinas.....	39
5.7. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados, ou não, por citocinas.	41
6. Discussão	45
7. Conclusões	56
ReferênciasBibliográficas	58
Anexos.....	75
Anexo 1 – Parecer do comitê de ética.....	77
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	78
Anexo 4 - Comprovante.....	80
Anexo 5 – Artigo	81

Lista de Tabelas

Tabela I. Imunofenotipagem de linhagens celulares do sangue periférico, caracterizando as células mononucleares.....	33
Tabela II. Concentração de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura pelos fagócitos e na presença de trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	34
Tabela III. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas (IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).....	35
Tabela IV. Liberação de Anion superóxido na interação entre Fagócitos MN e <i>Entamoeba histolytica</i> na ausência e presença de citocinas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).....	36

Lista de figuras

Figura 1. Leucofagocitose de amebas durante interações com fagócitos mononucleares tratados por citocinas.....	37
Figura 2. Atividade amebicida dos fagócitos MN tratados por citocinas (INF- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) na presença de <i>Entamoeba histolytica</i>	38
Figura 3. Índice de apoptose de fagócitos MN tratados por citocinas (INF- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) durante interações com <i>Entamoeba histolytica</i>	40
Figura 4. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados por INF- γ TGF- β IL-4 e IL-17.....	42
Figura 5. Intensidade de liberação de Ca ²⁺ pelos fagócitos MN do sangue tratados ou não por citocinas. A (INF- γ) e B (TGF- β).....	43
Figura 6. Intensidade de liberação de Ca ²⁺ pelos fagócitos MN do sangue tratados por citocinas A (IL-4) e B (IL-17).....	44

Lista de abreviaturas

ANOVA = análise de variância

BSA = soro albumina bovino

CBA = Cytometric Bead Array

CP = cisteína proteinase

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

DNA = ácido desoxirribonucleico

ELISA = ensaio imunoenzimático

INF- γ = Interferon gama

IL-4 = Interleucina 4

IL-17 = Interleucina 17

MN = mononuclear

OMS = Organização Mundial da Saúde

PBS = solução salina tamponada

PCR = reação em cadeia da polimerase

ROS = espécies reativas de oxigênio

TYI-S33 = Trypticase Yeast Extract Iron Serum

TCLE = termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β = fator de transformação do crescimento do tipo β

Th = célula T helper

Resumo

A *E. histolytica* é o agente causador da amebíase, a qual é uma doença com alta morbidade e mortalidade. As células fagocíticas e citocinas têm funções importantes na doença, mas os mecanismos de interação entre as células e estas proteínas nas infecções por protozoários ainda não está totalmente elucidado. Dessa forma o objetivo deste estudo foi analisar em sobrenadante de culturas de células mononucleares (MN) e *E. histolytica*: 1) os níveis das citocinas INF- γ e TGF- β , IL-4 e IL-17; 2) a atividade funcional de células MN tratadas por estas citocinas na presença do parasito. Amostras de sangue foram coletadas de 60 doadores voluntários sadios. Foram avaliadas no sobrenadante de cultura de células MN e amebas os níveis de INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17, a liberação de ânion superóxido, leucofagocitose, atividade amebicida, a apoptose e a liberação de cálcio intracelular pelas células MN. Observou-se que as células MN, independente do tipo de citocinas, na presença de *E. histolytica* apresentaram aumento da liberação do ânion superóxido. As células MN tratadas com citocinas reduziram a capacidade de leucofagocitose dos trofozoítos. A atividade amebicida e dos índices de apoptose foram maiores quando os fagócitos MN foram tratados pelas citocinas. Os maiores índices amebicidas e de morte por apoptose foram observados quando as células MN foram tratadas pelo TGF- β . As citocinas TGF- β e IL-17 aumentaram a liberação de cálcio intracelular por parte dos fagócitos MN. Os resultados sugerem que as citocinas desempenham um papel benéfico para o hospedeiro, por ativação de células MN para *E. histolytica*, e que ocorre a morte de amebas durante leucofagocitose. A modulação da atividade funcional de fagócitos MN por INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 pode ser fundamental no controle das infecções amebianas.

Palavras chave: Leucofagocitose, Atividade Amebicida, Citocinas, Células Mononucleares, *Entamoeba histolytica*.

Abstract

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) is the agent that causes the amoebiasis, which is a disease with significant morbidity and mortality. Phagocytic cells and cytokines appear to be important in amoebiasis, but the influence of these cells and cytokines in protozoan infections is not totally elucidated. The aim of this study was to analyze the supernatant of cultures of MN cells with *E. histolytica* to determine: 1) the levels of the cytokines IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-17; 2) the functional activity of MN cells after incubation with cytokines. Blood samples were collected from 60 volunteer donors healthy. The levels of IFN- γ , TGF - β , IL-4 and IL-17 were quantified in cell culture supernatants -trophozoite. The superoxide release, leukophagocytosis, amoebicidal activity, apoptosis and intracellular calcium release were analyzed during interactions of MN phagocytes and amoebae. It was observed that the MN cells, regardless of kind of cytokines, in the presence of *E. histolytica* increased superoxide release. The MN cells treated with cytokines reduced leukophagocytosis is capacity of trophozoites. The amebicidal activity and apoptosis rates were higher when the MN phagocytes were treated by cytokines. The highest amebicidal and apoptosis rates were observed when the MN cells were treated by TGF- β . The cytokines TGF- β and IL-17 increased the release of intracellular calcium by MN phagocytes. The results suggest that cytokines play a beneficial role to the host by activation of MN cells for *E. histolytica*. They also suggest that during leukophagocytosis is occur death of amoebae the modulating the functional activity of phagocytes MN IFN- γ , TGF- β , IL-4 and IL-17 appear to be essential in controlling the amoebic infections.

Key Words: Leukophagocytosis, amoebicide activity, cytokines, MN cells, *Entamoeba histolytica*.

1. Introdução

1.1. *Entamoeba histolytica*

1.1.1. Morfologia

A amebíase foi descoberta e descrita por Lösch em 1891 (Ravdin 1995), porém, apenas foi definida como uma doença que tem como agente etiológico o protozoário anaeróbico *Entamoeba histolytica* (Garcia-Zepeda 2007).

Esse parasito, pertencente ao filo *Sarcomastigophora*, classe *Lobosea*, gênero *Entamoeba*, ordem *Amoebida* e família *Entamoebidae*, é diferenciado pela locomoção e incorporação de alimentos por meio de pseudópodes, particularidade essencial para os representantes do subfilo *Sarcodina* (Chaves et al. 2010). Nessa família, estão incluídas várias espécies de amebas que podem parasitar o homem tais como: *E. histolytica*, *E. coli*, *E. hartmani*, *E. gingivalis* (*E. gingivalis*) entre outras. Destas, a *E. histolytica* é a mais importante por causar doença no homem (Silva & Gomes 2005).

A *E. histolytica* e a *E. dispar* são morfologicamente iguais, entretanto, diferenciam-se pela virulência, testes enzimáticos, imunológicos e genéticos. Morfologicamente, possuem forma amebóide apresentando, na maioria das vezes, um núcleo, pleomórfico, com rápida emissão de pseudópodes, permitindo movimentos rápidos. Essa forma se alimenta de restos celulares, partículas líquidas por pinocitose e fagocita pequenas bactérias. Os trofozoítos de *E. histolytica* variam de 10 a 60 μm de diâmetro, com as formas comensais medindo geralmente de 15 a 20 μm na maior dimensão (Pessoa & Martins 1978, Silva et al. 2005).

O citoplasma apresenta duas regiões: uma hialina (ectoplasma) e outra granulosa (endoplasma). O endoplasma apresenta citoesqueleto e sistema de lisossomo primário e

secundário, além de vacúolos digestivos que, na forma patogênica, podem conter hemácias (Lohia 2003).

O cisto é esférico ou oval, medindo de 8 a 20 μm de diâmetro (Silva & Gomes 2005), apresenta de 1 a 4 núcleos, com cromatina periférica, corpos cromatóides em forma de bastões, e cariossomo central. Exibe uma membrana de quitina que confere resistência ao suco gástrico estomacal e a fatores ambientais externos como: acidificação, cloração e dissecação (Bernal-Redondo et al. 2004).

Os trofozoítos são formas vegetativas e pleomórficas, com respiração anaeróbica ou aeróbica facultativa, se multiplicam por reprodução assexuada, alimentam-se, locomovem, excretam, e são extremamente sensíveis a mudanças de temperaturas, pH, osmolaridade e potencial de oxirredução, ou seja, desenvolvem todas as atividades mantenedoras da vida (Stanley 2003, Manoel et al. 2011). Seu habitat é o intestino grosso e/ou outros tecidos do hospedeiro, os movimentos são através da emissão de pseudópodes, rápidos e unidirecionais (Stanley 2003).

1.1.2. Ciclo biológico e transmissão

A *E. histolytica* foi descrita como agente patogênico, enquanto a *Entamoeba coli* (*E. coli*) como não patogênica (Walker 1913). Em 1919, foi estabelecido o gênero de amebas; em 1925, outra espécie de ameba também foi relatada, a *E. dispar*. Essa nova espécie foi contestada na literatura, porém a *E. dispar* foi reconhecida como espécie infectante para o homem em 1997 (OMS 1997).

O ciclo biológico de *E. histolytica* é monoxênico, e possui quatro fases: a forma vegetativa ou trofozoíto, metacisto, pré-cisto e forma resistente ou cisto. A forma pré-cisto é uma fase intermediária entre o trofozoíto e o cisto, este é oval ligeiramente arredondado, menor que o trofozoíto apresenta um núcleo de aparência grosseira devido às transformações da divisão nuclear no cisto. O pré-cisto evolui para a constituição do cisto, forma resistente ao meio externo (Silva & Gomes 2005).

O ciclo de vida da *E. histolytica* se inicia pela ingestão de água ou alimentos contaminados, quando o homem ingere o parasito no estágio de cisto maduro eliminado pelas fezes de pessoas parasitadas. Mãos sujas infectadas podem transmitir o parasito pessoa a pessoa, mas formas menos habituais como o sexo oral/anal e equipamentos de lavagem intestinal contaminados também são meios de transmissão desse parasito (Cordeiro & Macedo 2007; Wong et al. 2011).

Os cistos se desencistam no lúmen do intestino delgado originando o metacisto (ameba com quatro núcleos). Esse metacisto sofre divisão binária, formando os trofozoítos que migram para o intestino grosso (Stanley 2003), local em que aderem ao muco do cólon e às células epiteliais, podendo se reencistar no lúmen do cólon, e serem excretados nas fezes, dando continuidade ao seu ciclo biológico (Huston 2004). No intestino, crescem e se alimentam ingerindo bactérias e partículas nutritivas do meio multiplica-se por divisão binária simples e, ao se desprenderem da mucosa intestinal por mecanismos que ainda não foram totalmente esclarecidos, transformam-se em pré-cistos, em seguida, em cistos, que são as formas de resistência (Cordeiro & Macedo 2007, Dolabella et al. 2007). Os cistos são eliminados nas fezes, completando o ciclo de vida do parasito e, se os dejetos fecais não forem devidamente descartados (saneamento básico), poderão infectar outros indivíduos (Wong et al. 2011). Essa

espécie de ameba possui período de incubação que depende da quantidade de cistos ingeridos e das condições clínicas do aparelho digestivo do hospedeiro, podendo variar de uma semana até quatro meses (Silva et al. 2005). A interação entre *E. histolytica* e as células do hospedeiro desencadeia um processo de invasão no epitélio do intestino grosso, resultando na ativação da resposta inflamatória. A modulação desses eventos pelo parasito garante sua sobrevivência e a progressão da doença (Mortimer & Chadee 2010).

O efeito citotóxico que a *E. histolytica* exerce em células hospedeiras é uma evidência de que o parasito possui uma variedade de fatores de virulência. No entanto, esses fatores do parasito que interagem com as células do hospedeiro em cada fase da doença, são parcialmente compreendidos. Elucidar os mecanismos pelos quais os trofozoítos interagem colonizando ou invadindo as células intestinais pode contribuir para o desenvolvimento de futuros medicamentos antiparasitário (Botelho et al. 2010).

1.2. Amebíase e epidemiologia

Apesar de todo o avanço científico e tecnológico, as parasitoses ainda são importantes objetos de estudo e preocupação, principalmente nos países em desenvolvimento, nos quais, até na atualidade, são observadas precárias condições higiênicas sanitárias e de baixa qualidade de vida da população (Araújo & Fernández 2005).

A amebíase possui elevada prevalência em países de regiões tropicais localizados nas Américas do Sul e Central e também na Oceania, África e Ásia devido a baixas condições socioeconômicas e sanitárias, que favorecem a transmissão do parasito. Em países desenvolvidos,

a amebíase apresenta incidência em viajantes, em imigrantes e em pacientes internados em instituições coletivas (Ximénez et al. 2009).

A literatura relata que cerca de 500 milhões de pessoas estão infectadas com esse protozoário, sendo que 10% dos casos são sintomáticos, e destes 80 a 98% dos sintomas estão relacionados a distúrbios intestinais (Coura et al. 1994).

A amebíase é considerada a segunda maior causa de mortes por protozoários no mundo, dentre as doenças parasitárias. A estimativa é que, 48 a 50 milhões de pessoas são infectadas pela *E histolytica*, e que 100 mil morrem por ano (Cimerman & Cimerman 2008).

Poucos estudos apresentam a incidência da doença no Brasil, porém, há uma grande variação na prevalência da doença dependendo da localização. As regiões com maior índice de pobreza e falta de saneamento básico são as que apresentam os maiores índices de infecção, tais como, Belém-PA, cuja prevalência chega a 29,35%, caracterizando a amebíase como problema de saúde pública; Fortaleza-CE apresenta prevalências de até 14,9%, e em Manaus-AM 6,8% (Pinheiro et al. 2004, Silva et al. 2005, Dourado et al. 2006).

No Brasil, em 2009, as doenças infecciosas e parasitárias foram a segunda causa de óbitos e segunda de hospitalizações no grupo etário de 0 a 4 anos. Desse grupo de doenças, as diarreicas foram responsáveis por 1258 óbitos por ano. Os lactentes e menores de um ano são mais suscetíveis de desenvolverem a doença crônica, aumentando o tempo de hospitalização, óbitos e infecções sistêmicas (Façanha & Pinheiro 2005). Em termos de morbidade e mortalidade infantil, representam dois bilhões de casos, levando ao óbito um milhão e meio de crianças anualmente em países em desenvolvimento (Who 1997).

1.3. Patogênese e patogenicidade

A suscetibilidade do hospedeiro à infecção por *E. histolytica* vem sendo questionada desde 1913, quando Walker e Sellards demonstraram variações de resposta individual do hospedeiro e manifestações clínicas diferenciadas, desde assintomáticas até colites disentéricas (Mota et al. 2013). A patogênese depende da relação específica com o hospedeiro e a virulência do parasito que pode ser variável, desde formas assintomáticas até as formas invasivas letais (Vieira 2004, Hamm et al. 2009).

A citotoxicidade da *E. histolytica* é multifatorial, e vários fatores estão envolvidos nos mecanismos de virulência e de patogenicidade. Entre eles, fatores intrínsecos do hospedeiro, do parasito e do meio ambiente podem influenciar na progressão da infecção (Cordeiro & Macedo 2007).

A patogênese da amebíase requer eventos coordenados que abrangem a adesão dos trofozoítos às células do hospedeiro, lise e fagocitose de células epiteliais e bactérias, destruição e invasão dos tecidos pela ação de enzimas amebianas liberadas durante a lise dos neutrófilos. Três classes de moléculas amebianas têm sido principalmente apontadas como os principais fatores de virulência da *E. histolytica*: a lectina galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNac), os amebaporos e as cisteína proteases (CPs) (Lejeune et al. 2009, Costa 2010).

A imunidade do hospedeiro pode ser modificada na presença de CPs que são secretadas pelos trofozoítos. Essas proteínas são capazes de degradar as imunoglobulinas (IgA e IgG) presentes na mucosa intestinal do hospedeiro (Brito 2007, Oliveira 2011).

Uma característica da invasão tecidual pela *E. histolytica* é a sua capacidade de lisar as células do hospedeiro pelo contato direto e destruir a matriz extracelular (Mirelman et al. 2008).

Após a adesão dos trofozoítos, os amebaporos causam a lise celular, sem necessidade de interação com um receptor específico na membrana da célula do hospedeiro (Vivanco et al. 2007). Ao lisar as células, os amebaporos contribuem para a resposta inflamatória, uma vez que a principal célula envolvida é o neutrófilo, e essas células liberam seu conteúdo enzimático, que intensifica a resposta inflamatória (Mirelman et al. 2008).

Na literatura, muitos trabalhos têm-se concentrado em identificar novos fatores determinantes para a virulência de *E. histolytica* (Santi-Rocca et al. 2009). Acredita-se que vários fatores contribuem para esse fenótipo entre as cepas, visto que existem diferenças não somente entre as espécies de *E. histolytica* e *E. dispar*, mas também interespecie, no caso da *E. histolytica*.

As manifestações clínicas da amebíase, quando presentes, são bastante diversificadas. Dentre os indivíduos sintomáticos, a colite não disentérica é a manifestação mais frequente (90%). É caracterizada por evacuações diarreicas, contendo muco ou sangue, raramente com manifestação febril, podendo ocorrer alternância entre períodos silenciosos e sintomáticos (Upcroft & Upercrof 2001).

A forma disentérica é caracterizada por cólicas intestinais, diarreia muco-sanguinolenta, acompanhada de tenesmo e frio intenso. Pode evoluir para um quadro mais severo de disenteria amebiana aguda, com diarreia muco-sanguinolenta, prostração, desidratação grave e perfurações do intestino por ulcerações e necrose (Martínez-Palomo & Espinosa-Cantellano 1998).

A amebíase extra intestinal é considerada rara, mas quando existente atinge principalmente o fígado formando abscessos hepáticos caracterizados por dor, febre e hepatomegalia. O abscesso hepático começa pela invasão do epitélio intestinal e posterior migração do trofozoíto via porta (Salles et al. 2003).

Os abscessos pulmonares e cerebrais são extremamente raros, ocorrendo na maioria das vezes com a ruptura dos abscessos hepáticos e posterior proliferação no organismo (Andrade & Andrade 1996).

Estudos da amebíase em populações humanas e modelos experimentais mostram que alguns fatores do hospedeiro influenciam a suscetibilidade a *E. histolytica* e que estes do parasito podem alterar diretamente a virulência. Alguns trabalhos confirmam que a desnutrição aumenta significativamente a suscetibilidade à infecção por *E. histolytica* (Black et al. 2008). A desnutrição aumenta o risco de diarreia e o índice de mortalidade (Yoon et al. 1997). Crianças desnutridas têm taxas mais altas de infecção por protozoários, particularmente *E. histolytica*, comparadas a crianças bem nutridas (Mondal et al. 2009). A desnutrição energético-proteica é a causa mais comum de imunodeficiência secundária humana, o que é particularmente problemático para as doenças diarreicas que diminuem ainda mais a absorção de nutrientes pelo trato gastrointestinal (Chandra 1992), que podem interferir nas funções imunológicas. (Aaby et al. 2002, Schaible & Kaufmann 2007).

Os indivíduos infectados apresentam redução da imunidade e predisposição a outras infecções. Em crianças, outros agentes etiológicos podem constituir fatores agravantes decorrentes do parasitismo (Oliveira & Chiuncheta 2010).

1.4. Diagnóstico

1.4.1. Clínico

O diagnóstico clínico etiológico é difícil, uma vez que a amebíase não apresenta um padrão sugestivo. O quadro clínico se assemelha a de outras infecções intestinais causadas por vírus, outros parasitos, ou por bactérias (Tanyuksel & Petri 2003).

1.4.2. Laboratorial

O diagnóstico laboratorial de rotina da *E. histolytica* é realizado a partir da pesquisa de cistos e/ou trofozoítos nas fezes por microscopia de luz. Geralmente, a forma cística pode ser observada nas fezes sólidas e os trofozoítos nas amostras fecais liquefeitas, diarreicas ou pastosas (Manuel et al. 2011). Contudo, a inexperiência técnica, a eliminação intermitente do cisto de *E. histolytica/ E. dispar* (Walsh, 1986) e a não diferenciação morfológica com outras amebas intestinais, leucócitos e artefatos podem promover erros no diagnóstico microscópico (Brucker, 1992). Além disso, os métodos coproscópicos não detectam parasitas rompidos e não possibilitam a diferenciação entre a *E. histolytica* e *E. dispar* (Manuel et al. 2011). Apesar dessas limitações e da baixa sensibilidade, esse métodos têm sido os de escolha para o diagnóstico de amebíase intestinal (Ravdin 1994).

Assim, o exame parasitológico de fezes, na prática, tem sido utilizado como um recurso de fundamental importância para o diagnóstico das enteroparasitoses e distintos métodos deve ser usado para evidenciar cistos de protozoários (Ponciano et al. 2012).

Os métodos coproparasitológicos não permitem a identificação específica quando o diagnóstico é realizado para cistos e/ou trofozoítos nas fezes. Nesses casos, o resultado deve ser expresso como infecção pelo complexo *E. histolytica / E. dispar*. Isso pode ser equivocadamente interpretado como amebíase, uma vez que a infecção pela *E. dispar* é cerca de 10 vezes mais frequente que a de *E. histolytica*. Como consequência dessa interpretação é a realização de tratamentos desnecessários (Haque et al. 2006).

1.4.3. Imunodiagnóstico

No imunodiagnóstico, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para pesquisa de anticorpos específicos do parasito no soro do paciente e o ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de coproantígenos nas fezes são empregados como alternativa diagnóstica. Ambas as técnicas podem ser utilizadas para o diagnóstico de casos isolados ou para estudos epidemiológicos (Feitosa 1986; Jelinek et al. 1996; Haque et al. 1998), mostrando superior especificidade e sensibilidade no diagnóstico em relação à microscopia (Katzwinkel et al. 1994)

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos do parasito nas fezes tem sido utilizado em inquéritos epidemiológicos (Urdaneta et al. 1994, Haque et al. 1998, Haque et al. 2001, Blessamann et al. 2002; Silva et al. 2005; Dourado et al. 2006). O teste é baseado na detecção de uma adesina responsável pela mediação da ligação dos trofozoítos às células da mucosa intestinal (lectina inibidora de N-acetil-D-galactosamina), presente exclusivamente na membrana da *E. histolytica* (Petri et al. 1999).

1.4.3. Diagnóstico molecular

A presença da *E. histolytica* também pode ser confirmada por técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA, uma vez que o tratamento é preconizado somente nos casos confirmados de amebíase (Who 1997).

O conhecimento da distribuição da *E. histolytica* e da *E. dispar* é essencial para a tomada de decisões com relação à medida de controle e de tratamento (Yera et al. 2003, Doganci et al. 2004, Calderaro et al. 2005).

Pesquisas têm demonstrado a aplicação bem sucedida de PCR para esses fins (Verweij *et al.* 2004; Leiva *et al.* 2006). No entanto, não existe um método padronizado da PCR para o diagnóstico específico da infecção por *E. histolytica*. Diferentes autores utilizam métodos distintos para extração do DNA, sequências de iniciadores diversas para amplificação dos fragmentos gênicos do DNA-alvo, e estratégias variadas de amplificação como RAPD-PCR (Random Amplification of Polymorphic DNA) (Valle *et al.* 2000), PCR (Polymerase chain reaction-solution hybridization enzyme-linked immunoassay) e Real Time-PCR (Roy *et al.* 2005) e -PCR (Rivera *et al.* 2006).

1.5. Tratamento e profilaxia

O tratamento de escolha para amebíase é o metronidazol, pois é o amebicida mais utilizado mundialmente. Mas importante lembrar que medidas profiláticas são importantes e ajudam a prevenir a amebíase, com cuidados básicos de higiene condições sanitárias adequadas. (Silva & Gomes 2005).

1.6. Resposta imune para a *E. histolytica*

A resposta imune do hospedeiro é outro fator importante na evolução da infecção, visto que as células do sistema imunológico podem desempenhar um importante papel, tanto para o dano tecidual quanto para o controle da infecção amebiana (Stanley 2001).

A reprodução do ciclo completo de *E. histolytica in vivo* em modelos experimentais ainda é um desafio. Não existe ainda modelo animal no qual a administração de cistos por via

oral, reproduza a amebíase intestinal e hepática espontaneamente. Estudos experimentais *in vivo*, relatam que, para se provocar a doença tanto intestinal como hepática, os trofozoítos devem ser injetados direto e separadamente no órgão alvo (Tsutsumi & Shibayama 2006). Entretanto, trabalhos relatam semelhanças na infecção experimental por *E. histolytica* em hamsters e em humanos, porém os trofozoítos utilizados em animais experimentais aparentemente são menos virulentos. Ratos e diferentes espécies de camundongos são animais resistentes à amebíase, e têm sido úteis em estudos imunológicos, em que se demonstram a participação de neutrófilos, a produção de óxido nítrico, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias no processo de infecção amebiana (Tsutsumi & Shibayama 2006, Ivory et al. 2008).

Embora, os mecanismos da imunidade inata ainda sejam parcialmente conhecidos na amebíase, trabalhos mostram que ela parece ser essencial para eliminar o parasito (Shibayama et al. 2007). Sabe-se que lesões da amebíase aguda são caracterizadas pela presença de células inflamatórias, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas por sinais pró-inflamatórios, produzidas pelas células epiteliais e por outras células do hospedeiro em resposta à infecção. Mediadores como mediadores pró-inflamatórios as citocinas as quais são responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos (Bracha et al. 2002). A IL-1 ativada induz a liberação de quimiocinas como IL-8 que promove a migração de neutrófilos e macrófagos (Zhang et al. 2003, Gutiérrez- Alarcon et al. 2006).

Os macrófagos também desempenham um importante papel na patogênese da amebíase intestinal e amebíase hepática, pois representam uma linha de defesa após a infiltração maciça de neutrófilos durante amebíase hepática aguda. Estas células são ativadas por trofozoítos de *E. histolytica*, e apresentam atividade amebicida quando estimulados com Fator estimulador de colônia (CSF), IFN- γ , e TNF- α (Guerrant et al. 1981). A atividade amebicida do macrófago

parece ser mediada por óxido nítrico sintase (NOS) (Seydel et al. 2000). Em modelos de animais infectados com *E. histolytica* foi demonstrado que houve desenvolvimento de amebíase hepática, com aumento do estresse oxidativo (Ramirez-Emiliano et al. 2007).

Os macrófagos e neutrófilos são as células do sistema imune envolvidas no processo de fagocitose. A fagocitose é um dos principais mecanismos de destruição de microrganismos e se inicia com a aderência deles à membrana celular. Essa interação pode ser potencializada por fatores hormonais e imunológicos (Honorio-França et al. 2001, França-Botelho et al. 2006, França et al. 2011, França et al. 2012, França-Botelho et al. 2012, Morceli et al. 2013).

Poucos estudos têm avaliado a interação da ameba com fagócitos. Sabe-se que a *E. histolytica* é capaz de inibir a produção de metabólitos ativos do oxigênio em monócitos do sangue e que, provavelmente, pode contribuir para evasão do parasito durante o processo de leucofagocitose (França- Botelho et al. 2011).

Além disso a atividade fagocitária de amebas envolve a leucofagocitose, porque elas estão constantemente em contato com leucócitos *in vivo* e deve ser capaz de destruí-los para sua sobrevivência (França-Botelho et al. 2012). Em infecções amebianas, a fagocitose, bem como a indução de apoptose de células do hospedeiro pelos trofozoítos, parece limitar a inflamação e possibilitar ao parasito sua evasão da resposta imunológica (Huston 2004).

A imunidade adaptativa também participa durante a infecção por amebas. Acredita-se que resulta, principalmente, a partir da produção de anticorpos neutralizantes da classe IgA tipo secretória (Petri & Bixel 2006, Abd Alla et al. 2012). Essas substâncias estão envolvidas na ativação de leucócitos durante as interações entre a *E. histolytica* e essas células e pode ser de fundamental importância para entendimento das respostas do hospedeiro na amebíase. Desta forma as citocinas se tornam importantes durante a evolução da infecção. Foram descritos vários

aspectos em relação à infecção e citocinas. TNF- α é uma citocina com diversas funções na imunidade. O TNF- α pode estimular o crescimento e a diferenciação das células assim como sua sobrevivência ou ainda aumentar a inflamação, ou a induzir morte celular (Locksley et al. 2001). O papel das citocinas está relacionado diretamente com o perfil de imunidade e de acordo com estímulo qual será o tipo de resposta em presença do parasito, como por exemplo uma resposta imune do tipo Th1 está diretamente relacionada a contensão da progressão na amebíase invasiva (Krestschmer et al 1985). A IL-10 e TGF- β são produzidas em níveis elevados em pacientes infectados por *E. histolytica*. Essas citocinas têm atividade imunomoduladora na infecção, limitando a resposta inflamatória. Dessa forma, indivíduos portadores de sintomas para amebíase intestinal ou invasiva apresentam concentrações mais elevadas de IL-4, IL-10 e TGF- β . Indivíduos assintomáticos, portadores de *Entamoeba sp.* Não apresentam diferenças significativas nas concentrações dessas citocinas. De uma forma geral, as Inter leucinas IL-4, IL-10 e TGF- β , parecem suprimir a resposta imune celular, resultando em uma infecção sintomática (Bansal et al. 2005).

Neutrófilos e macrófagos, na presença de TNF- α , aumentam a morte de trofozoítos (Denis & Chadee 1989), porém *in vivo*, o TNF- α parece exacerbar a doença (Zhang et al. 2003) aumentando a suscetibilidade à diarreia por *E. histolytica* (Peterson et al. 2010). Tem sido sugerido que o IFN- γ modula a produção de TNF- α durante a infecção (Wang 2010), e há estudos, avaliando a vacinação em camundongos, que demonstram que o IFN- γ confere proteção para *E. histolytica* (Guo et al. 2011).

A IL-10 é outra citocina importante na infecção por amebas. Camundongos deficientes de IL-10 são mais suscetíveis à infecção amebiana, e a função da IL-10 provavelmente esteja relacionada ao estado nutricional do hospedeiro e formas graves da amebíase (Fock et al. 2008).

Trabalhos na literatura relacionam aumento de IL-4, TNF- α e IL-13 e diminuição de INF- γ , IL-12 IL-5 e IL-10 durante o curso da infecção. Estudos da IL-17, em modelos de colite amebiana, ainda são parcialmente compreendidos (Guo et al. 2011). A IL-17 é produzida principalmente por células T CD4⁺, mas células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais também a produzem. A IL-17 aumenta a expressão de ICAM-1 em fibroblastos, epitélios, endotélios e estimula a secreção de IL-6, IL-8, GM-CSF, PGE₂ por essas células. Essas citocinas mantêm a proliferação de progenitores hematopoéticos e sua maturação preferencial em neutrófilos (Varella et al. 2001).

A IL-17 se apresenta como potente ativadora do endotélio *in vivo*, promovendo o recrutamento de neutrófilos para locais inflamatórios. As células endoteliais expressam receptores para IL-17 e, desse modo, respondem de maneira rápida quando estimuladas por esta citocina, produzindo moléculas quimiotrativas para neutrófilos, além de moléculas de adesão envolvidas no extravasamento de leucócitos. A IL-17, desse modo, participa ativamente na migração de leucócitos (principalmente de neutrófilos) tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Roussel et al. 2010).

Apesar de avanços em pesquisas que demonstram os mecanismos fisiopatogênicos da amebíase, ainda não está claro o perfil da imunidade celular. Isto é, o papel dos fagócitos na amebíase e suas interações com citocinas não está totalmente elucidado.

A literatura tem reportado redução em áreas de necrose observada em infecção amebiana experimental, juntamente com o aumento da morte de amebas durante leucofagocitose na presença de hormônios como a melatonina (França-Botelho et al. 2012), e a importância dos mecanismos de fagocitoses na patogênese da *E. histolytica* (Christy & Petri 2011). No entanto, o mecanismo efetor de sinalização intracelular, como influxo de cálcio, bem como o funcionamento dessas vias sinalizadoras durante a ingestão de células do hospedeiro pelo parasito, ainda não está

claro. Na literatura, estudos têm demonstrado que proteínas imunorreativas são capazes de destruir trofozoítos de *E. histolytica in vitro* (Asgharpour et al. 2005). Apesar das células fagocíticas desempenharem importante função na amebíase, os efeitos imunomoduladores de citocinas sobre fagócitos nas infecções por protozoários ainda é parcialmente compreendido.

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos buscando elucidar os mecanismos de lesão tecidual, mas estudos que incluem sinalização intracelular e interação de células do hospedeiro com imunomoduladores, como as citocinas e os mecanismos de ativação intracelular durante a infecção, permanecem incompletos. É provável que alterações durante a infecção por amebas possam interferir nos mecanismos imunológicos do hospedeiro, alterando as interações entre as citocinas e células. Conhecer as interações entre leucócitos e *E. histolytica*, bem como modular a atividade funcional de células por meio dessas proteínas, pode contribuir para o controle de lesões amebianas e ser útil como uma alternativa na terapia antiamebiana.

2. Justificativa

Dados epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde (OMS 1997) estimam que a *E. histolytica* causa aproximadamente 100 mil mortes por ano, infectando 500 milhões de pessoas em todo mundo.

A infecção por *E. histolytica* /*E. dispar* apresenta ampla distribuição geográfica, sendo que a maioria dos casos está concentrada na América do Norte (México), Central e do Sul, África, Índia, Iran e Vietnam.

No Brasil, estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência de sintomatologia da amebíase tem grande diversidade, variando de região para região. Nas regiões Sul e Sudeste, a prevalência de *E. histolytica*/ *E. dispar* varia de 2,5 a 11%, na Região Amazônica legal atinge 19% e nas demais regiões cerca de 10%.

Vários são os mecanismos imunológicos do hospedeiro envolvidos durante a infecção por *E. histolytica*. Acredita-se que os fagócitos tem importante papel na patogênese da amebíase. Sabe-se que a atividade amebicida de fagócitos do sangue para *E. histolytica* pode ser potencializada por interações com agentes imunoestimuladores como hormônios (França-Botelho et al. 2012). No entanto, não se sabe como é a atuação da atividade microbicida dessas células e suas interações com outros agentes imunoestimuladores, entre eles, as citocinas. Essas proteínas têm papel importante na defesa para algumas bactérias, mas para a *E. histolytica* os resultados ainda não estão claros. É possível que interações entre células e citocinas possam ter efeito na proteção do hospedeiro.

Assim, trabalhos que buscam compreender os mecanismos envolvidos na atividade funcional dos fagócitos do sangue são importantes para compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infecção por *E. histolytica*, que acomete a população brasileira,

sobretudo, na região da Amazônia Legal, onde as condições socioeconômicas e sanitárias são muito precárias.

Considerando neste contexto que a amebíase ainda tem altas taxas de mortalidade e morbidade, sobretudo onde há pobreza e precariedade em higiene, afetando principalmente países em desenvolvimento como o Brasil, há uma gravidade iminente desta doença, que acomete principalmente crianças.

Sendo um importante problema de saúde pública, e com bases em estudos com outras substâncias as quais pode ser comprovada a modulação da função imune, a partir disso surge a possibilidade de entender a influencias das citocinas sobre a interação do parasito e hospedeiro sejam estas promovendo estímulo inibitórios ou regulatórios. É de fundamental importância esclarecer esse viés da inter-relação parasito hospedeiro e sistema imune regulado pela ação das citocinas. Diante disso este projeto se propôs a estudar essa relação da *E. histolytica* com células fagocíticas mononucleares em presença e ausência das citocinas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Verificar a concentração de citocinas INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de cultura de fagócitos mononucleares do sangue periférico humano na presença de *E. histolytica* e analisar a atividade funcional destes fagócitos tratados por estas citocinas na presença do parasito.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar concentração de citocinas INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de culturas de fagócitos mononucleares do sangue periférico humano na presença de *E. histolytica*;
- Verificar os efeitos imunomoduladores de citocinas INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 sobre a liberação do ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares na presença de *E. histolytica*;
- Avaliar a leucofagocitose, atividade amebicida e índice de apoptose dos fagócitos de *E. histolytica* na presença das citocinas;
- Verificar os efeitos de citocinas INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 sobre a liberação de Ca²⁺ intracelular pelos fagócitos mononucleares.

4. Material e Métodos

4.1. Sujeitos e aspectos éticos

Participaram deste estudo 60 indivíduos clinicamente saudáveis, do sexo masculino com idade entre 18 a 35 anos, com sorologia negativa, de acordo com a pesquisa, todos os sujeitos foram voluntários e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido sobre os objetivos a serem realizados. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Campus Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso (Anexo 1). As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade do doador, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no trabalho. Os doadores foram previamente informados e o material somente foi coletado ou utilizado, sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – Anexo 2), conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP). Os experimentos foram realizados dentro de normas de biossegurança.

4.2. Parasitos

Foram realizadas subculturas *E. histolytica* Cepa HM-1 assegurando sua viabilidade e crescimento. Todas as culturas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Amebíase da UFMG/MG. Os parasitos foram mantidos no Laboratório de Imunomodulação da UFMT, com repiques três vezes por semana, garantindo a utilização deles em fase exponencial de crescimento.

4.3. Obtenção e separação de amostras de sangue periférico humano

Foram coletadas amostras de sangue periférico, de aproximadamente 8 ml de sangue, foram coletadas em tubos, contendo EDTA (Marca Top Glass), e processadas imediatamente.

O sangue coletado foi centrifugado por 15 minutos a 160 x g. O plasma foi retirado e as células foram separadas em gradiente de densidade com Ficoll-Paque (Pharmacia-Upsalla Sueder) por 30 minutos a temperatura ambiente. O anel rico em fagócitos MN foi retirado e lavado por três vezes em meio 199 (Sigma-Aldrich). A seguir os fagócitos MN foram contados em câmara de Neubauer, e as concentrações celulares ajustadas para 2×10^6 células/ml.

As células foram utilizadas para os ensaios de liberação de ânion superóxido, de leucofagocitose, de atividade microbicida, de apoptose e de Ca^{2+} intracelular.

4.5. Culturas de fagócitos com *E. histolytica*

Após a separação dos fagócitos MN do sangue, as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio à cultura RPMI (Sigma-Aldrich), acrescidas de 10% de soro bovino fetal. A seguir, as células (2×10^6 cels/ml) foram incubadas com *E. histolytica* (4×10^4 parasitos/ml) durante duas horas a 37°C em estufa a 5% de CO_2 . Após esse período, as culturas foram centrifugadas por 10 min. a 160 x g e os sobrenadantes foram reservados para quantificação da citocinas.

4.6. Quantificação das citocinas

As concentrações de citocinas IFN- γ e TGF- β , IL-4 e IL-17, presentes no sobrenadante de culturas de amebas e células foram avaliadas pelo Kit “Cytometric Bead Array” (CBA, BD Bioscience, USA). As análises dessas citocinas foram realizadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD Bioscience, USA). Os dados foram analisados com o software FCAP Array e os resultados foram expressos em pg/dl.

As concentrações de TGF- β presentes nas culturas de amebas e células foram avaliadas pela técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Para as concentrações de TGF- β , foi utilizado um kit da Enzo Life Science (UK). As análises foram realizadas em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Os resultados foram calculados utilizando curva padrão e os resultados foram expressos em pg/dl.

4.7. Imunofenotipagem

Células MN do sangue foram lavadas com Tampão Salina Tamponada (PBS) acrescido de BSA (Soro bovino adulto) - Sigma- St Louis - USA por 10 minutos a 4^o C. As células foram marcadas com 10 μ l de anti-CD14⁺ FITC, anti-CD3⁺ Per CP, anti CD4⁺ FITC, anti CD8⁺ PE e anti CD19⁺ FITC por 30 minutos sob refrigeração. As células MN foram lavadas e ressuspensas em PBS-BSA e analisadas por citometria de fluxo (FACS Scalibur, BD Bioscience, USA). O mínimo de 10.000 células foram avaliadas pelo tamanho, granulosidade e intensidade de fluorescência. Os dados foram analisados por meio do software Flowjo 7.2.5.

4.8. Incubação das citocinas com os fagócitos do sangue periférico

A incubação dos fagócitos MN com as citocinas para modular a atividade funcional de fagócitos foi de 120 minutos. Para cada ensaio realizado, como controle dos experimentos, os fagócitos MN (2×10^6 cels/ml) foram incubados por tempo similar, dependendo do tipo de ensaio em meio 199 ou PBS na ausência de citocinas. A concentração de citocinas foi de 100 ng/ml, de acordo com protocolo previamente estabelecido (Fagundes et al. 2013).

4.9. Atividade Funcional de fagócitos mononucleares

4.9.1. Dosagem de ânion superóxido

A modulação dos fagócitos MN do sangue por citocinas foi verificada por meio da liberação de ânion superóxido, utilizando-se o cromógeno Ferricitocromo C, segundo o método de Pick & Mizel 1981, e adaptado por Honório-França et al. 1997. Em presença do ânion superóxido, o ferricitocromo C sofre oxidação passando a ferrocitocromo C. Essa mudança colorimétrica é detectável em espectrofotômetro com filtro de 620nm. As suspensões de células MN (2×10^6 /ml) foram misturadas com trofozoítos de *E. histolytica* (4×10^4 parasitos/ml), incubadas e agitadas durante 120 minutos a 37° C. A suspensão foi ressuspensa em 0.5 ml de PBS glicosado contendo ferricitocromo C (Sigma, St. Louis USA) concentração de 2mg/ml. Um controle contendo somente células foi realizado paralelamente para verificação da liberação espontânea do ânion superóxido pelas células MN. Após a cultura, as suspensões foram colocadas em placas de cultura celular de 96 poços com um volume de 100 µl por poço e deixadas em estufa a 37° C durante 1 hora. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para placa com filtro

de 550 nm. A concentração do ânion superóxido foi calculada por meio da seguinte relação:

$$\text{Concentração O}^{2-} \text{ (nmol)} = \text{DO}/6.3 \times 100.$$

4.9.2. Ensaio de Leucofagocitose

Foram misturadas as suspensões de células MN (2×10^6 células/ml) com trofozoítos de *E. histolytica* (4×10^4 parasitos/ml), seguido de incubação por duas horas a 37°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos, a 160 x g sob refrigeração a 4°C. O "pellet" foi corado com 200 µl de alaranjado de acridina (Sigma, St. Louis USA - concentração 14,4 mg/ml) por 1 minuto e, a seguir, foi ressuspensionado em meio 199 (Sigma, St. Louis USA), centrifugado e lavado mais duas vezes. Os resultados foram obtidos pela análise em microscópio de fluorescência.

4.9.3. Ensaio de Apoptose

Para o ensaio de apoptose foi utilizado o Kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection (Sigma, St. Louis USA), conforme as recomendações do fabricante. Suspensões de fagócitos MN de sangue foram pré-tratados ou não com citocinas e incubadas com *E. histolytica* durante um período de tempo de 120 minutos em estufa (37°C-5% de CO₂). Um controle positivo foi preparado utilizando-se suspensão de fagócitos mononucleares de sangue estimulados com estaurosporina (Sigma 100µg/ml), incubadas por um período de oito horas (Pundt et al. 2009) em estufa (37°C-5% de CO₂). A seguir, os fagócitos MN-amebas foram incubados por 10 min. à temperatura.

ambiente com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Depois desse período, a suspensão, células e trofozoítos, foram analisadas no fluorímetro (Fluoroskan/Science- Thermocientific).

4.9.4. Liberação de Cálcio Intracelular pelos fagócitos do sangue periférico humano

A liberação de cálcio intracelular foi realizada utilizando o cromógeno Fluo-3 (Fluo3-Acetoxyethyl, AM-Sigma, St. Louis USA). A aquisição e análises dos resultados foram realizadas no Citômetro de Fluxo (FacsCalibur, BD Bioscience, USA). Suspensões de células MN do sangue foram pré-incubadas com as citocinas, conforme descrito anteriormente. A suspensão foi centrifugada duas vezes (160 x g, 10 min, 4° C) ressuspendida em PBS contendo BSA (5mg/ml) e incubadas com 5 µL de Fluo-3 (1µg/ml) por uma hora a 37° C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS-BSA e a leitura foram detectadas no filtro 530/30nm para Ca²⁺ intracelular. A proporção de liberação intracelular de Ca²⁺ foi expressa pela média geométrica (%) de intensidade de fluorescência de Fluo-3.

4.10. Análise Estatística

Para avaliar os percentuais de células CD14⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ a concentração de citocinas INF-γ, TGF-β IL-4 e IL-17, bem como os índices de liberação do ânion superóxido, leucofagocitose, atividade amebicida e apoptose, liberação de cálcio intracelular, foram realizados ensaios *in vitro* todos em duplicata e utilizou-se o teste de Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. As estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0.05 (P<0.05).

5. Resultados

A análise dos dados se dispõe sob a forma de figuras e tabelas, apresentados na sequência abaixo:

- Imunofenotipagem dos fagócitos;
- Concentração de citocinas em culturas de células e amebas;
- Produção de ânion superóxido
- Leucofagocitose
- Atividade amebicida
- Apoptose
- Liberação de cálcio intracelular

5.1. Imunofenotipagem

Na tabela 1 estão apresentados os percentuais de células do sangue humano expressando marcadores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e CD19⁺ na presença de citocinas e incubados por *E. histolytica*. Observa-se que houve a expressão de marcadores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD 19⁺ e CD14⁺ após incubação de células MN com a *E. histolytica*.

Tabela I. Imunofenotipagem de linhagens celulares do sangue periférico, caracterizando as células mononucleares.

Marcadores de superfície celular	Intensidade de Fluorescência
	Expressão (%)
CD 3	24,2± 0,2
CD 4	10,6 ±1,0
CD 8	4,74±0,9
CD14	10,8 ±0,8
CD19	6,4±0,8

5.2. Concentrações de citocinas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17) liberadas em culturas de fagócitos MN e trofozoítos de *E. histolytica*.

A tabela II mostra a concentração de citocinas liberadas em culturas de fagócitos MN e trofozoítos de *E. histolytica*. Observa-se que durante a interação de fagócitos MN e *E. histolytica* houve liberação de todas as citocinas avaliadas. As maiores concentrações de citocinas detectadas foram de INF- γ (17,3 pg/ml) seguida por TGF- β (11,2 pg/ml).

As liberações de IL-4 e de IL-17 foram similares em culturas de fagócitos MN e trofozoítos de *E. histolytica* (Tabela II).

Tabela II. Concentração de citocinas liberadas em sobrenadante de cultura pelos fagócitos e na presença de trofozoítos de *E. histolytica*

<i>Citocinas</i>	<i>Concentração (pg/ml)</i>
IL-4	6.84 \pm 0.83
INF- γ	17.3 \pm 0.42
TGF- β	11.2 \pm 0.82
IL-17	6.46 \pm 0.45

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

5.3. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas.

A tabela III mostra a liberação de ânion superóxido, pelos fagócitos MN, na presença das citocinas. Houve aumento da liberação do ânion superóxido pelos fagócitos mononucleares quando tratados pelas citocinas. Os maiores níveis de liberação do ânion superóxido foram observadas em fagócitos MN tratados por INF- γ e TGF- β .

Tabela III. Liberação de ânion superóxido por fagócitos MN na presença de citocinas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).

Fagócitos MN incubados com	Ânion Superóxido (nmols)
PBS	2.6 \pm 0.4
INF- γ	6.3 \pm 0.9*
TGF- β	6.2 \pm 0.8*
IL-4	4.5 \pm 0.1*
IL-17	4.8 \pm 0.2*

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão.

* P<0.05 diferenças s entre os fagócitos controle não tratados e os tratados com citocinas.

Na tabela IV estão apresentados os resultados da liberação de ânion superóxido incubados com *E. histolytica* tratados por citocinas. Observa-se que houve aumento de superóxido quando os fagócitos foram incubados com *E. histolytica*. O tratamento dos fagócitos por citocinas, independente do tipo, aumentou a liberação de superóxido quando estas células foram incubadas com *E. histolytica*, com valores superiores aos encontrados quando os fagócitos não foram tratados por citocinas.

Tabela IV. Liberação de ânion superóxido na interação entre Fagócitos MN e *E. histolytica* na ausência e presença de citocinas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).

Fagócitos MN incubados com	Ânion Superóxido (nmols)
PBS	3.6±0.4
<i>E. histolytica</i>	4.6±0.5*
<i>E. histolytica</i> + INF- γ	9.3±0.8* ⁺
<i>E. histolytica</i> + TGF- β	8.2±0.8 * ⁺
<i>E. histolytica</i> + IL-4	8.4±0.2* ⁺
<i>E. histolytica</i> + IL-17	8.5±0.9* ⁺

Os resultados estão apresentados em média e desvio padrão. P<0.05

*diferenças entre os fagócitos não tratados (controle) e os tratados com citocinas.

⁺ diferenças entre fagócitos incubados com *E. histolytica* não tratados (controle) por citocinas e os incubados com *E. histolytica* tratados pelas citocinas.

5.4. Leucofagocitose

A figura 1 mostra a capacidade da *E. histolytica* em fagocitar fagócitos MN tratados por IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17. Observou-se que os fagócitos tratados com citocinas reduziram a capacidade fagocítica dos trofozoítos. Os menores índices de leucofagocitose apresentados pelos trofozoítos foram observados quando as células MN foram tratadas com IL-17.

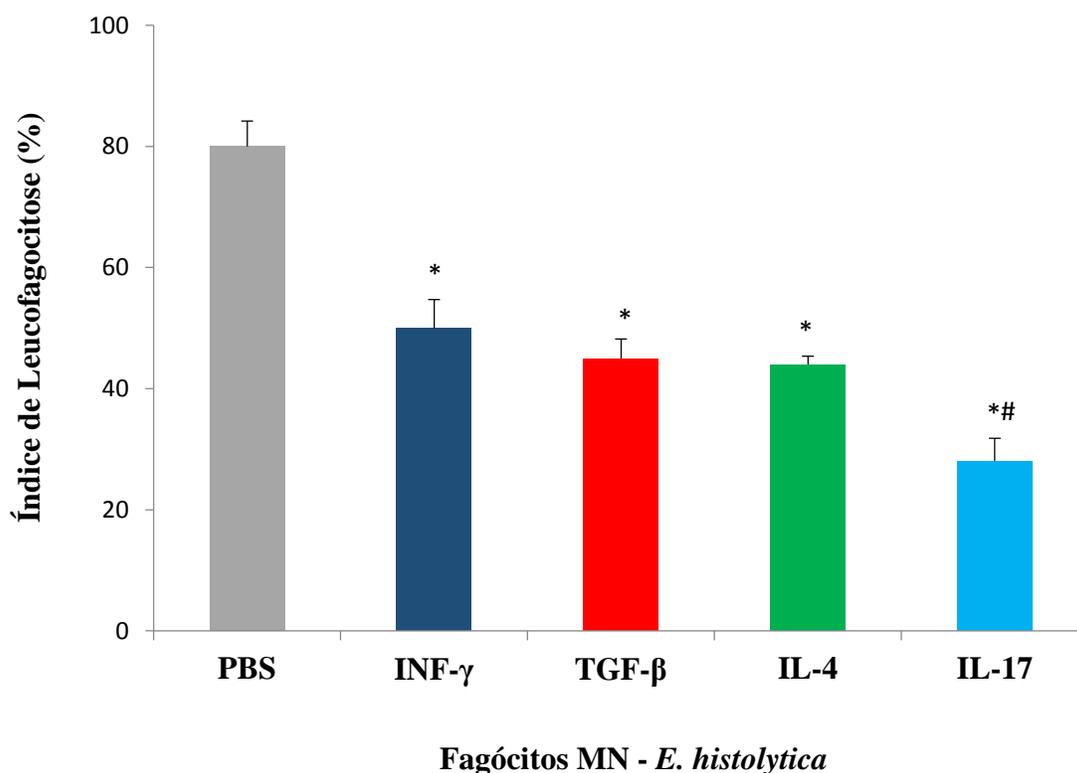


Figura 1. Leucofagocitose de amebas durante interações com fagócitos mononucleares tratados por citocinas.

P < 0.05

* indica diferenças em relação aos fagócitos não tratados (controle) e os tratados com citocinas.

indica diferenças entre os fagócitos tratados por citocinas.

5.5. Atividade amebicida dos fagócitos MN

A atividade amebicida dos fagócitos MN tratados com INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 para *E. histolytica* estão apresentados na Figura 2. Observam-se maiores índices amebicidas quando os fagócitos foram tratados pelas citocinas em comparação aos índices observados quando os fagócitos não foram tratados por citocinas. Os maiores índices amebicidas foram observados quando os fagócitos foram tratados pelo TGF- β .

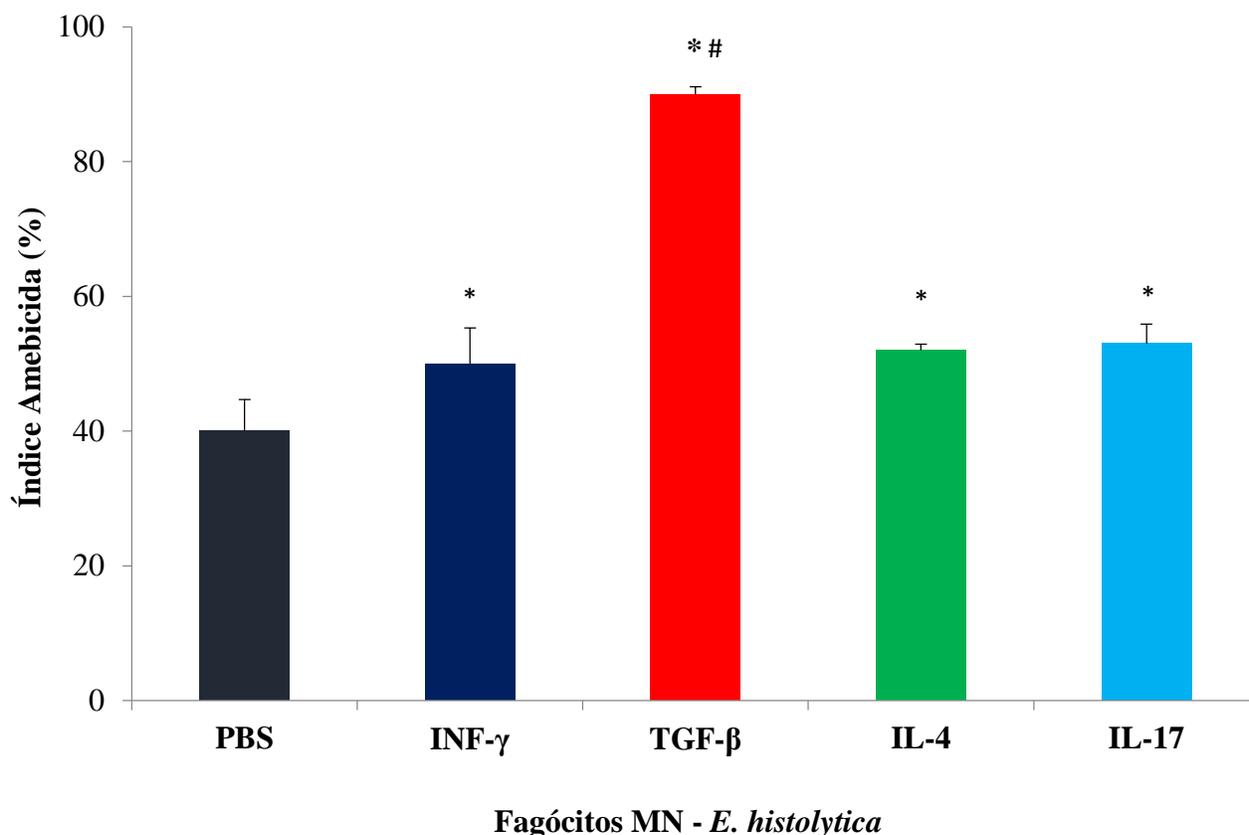


Figura 2. Atividade amebicida dos fagócitos MN tratados por citocinas (INF- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) na presença de *E. histolytica*. P<0.05.

*indica diferença entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.

indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

5.6. Índice de apoptose de fagócitos MN em presença, ou não, de *E. histolytica*, tratados, ou não, por citocinas.

Os índices de apoptose estão apresentados na figura 3. Os fagócitos MN apresentaram baixos índices apoptóticos na ausência de *E. histolytica*. Quando estas células foram incubadas com *E. histolytica* houve aumento de morte por apoptose.

O tratamento dos fagócitos pelas citocinas INF- γ e TGF- β aumentou os índices de apoptose durante a interação destas células com os trofozoítos. Os fagócitos tratados com IL-4 induziram a morte celular, porém o índice de apoptose apresentado foi menor quando comparado aos índices observados pelos fagócitos tratados por INF- γ e TGF- β . O tratamento dos fagócitos pela IL-17 induziu baixos índices de apoptose similares aos índices observados no grupo controle.

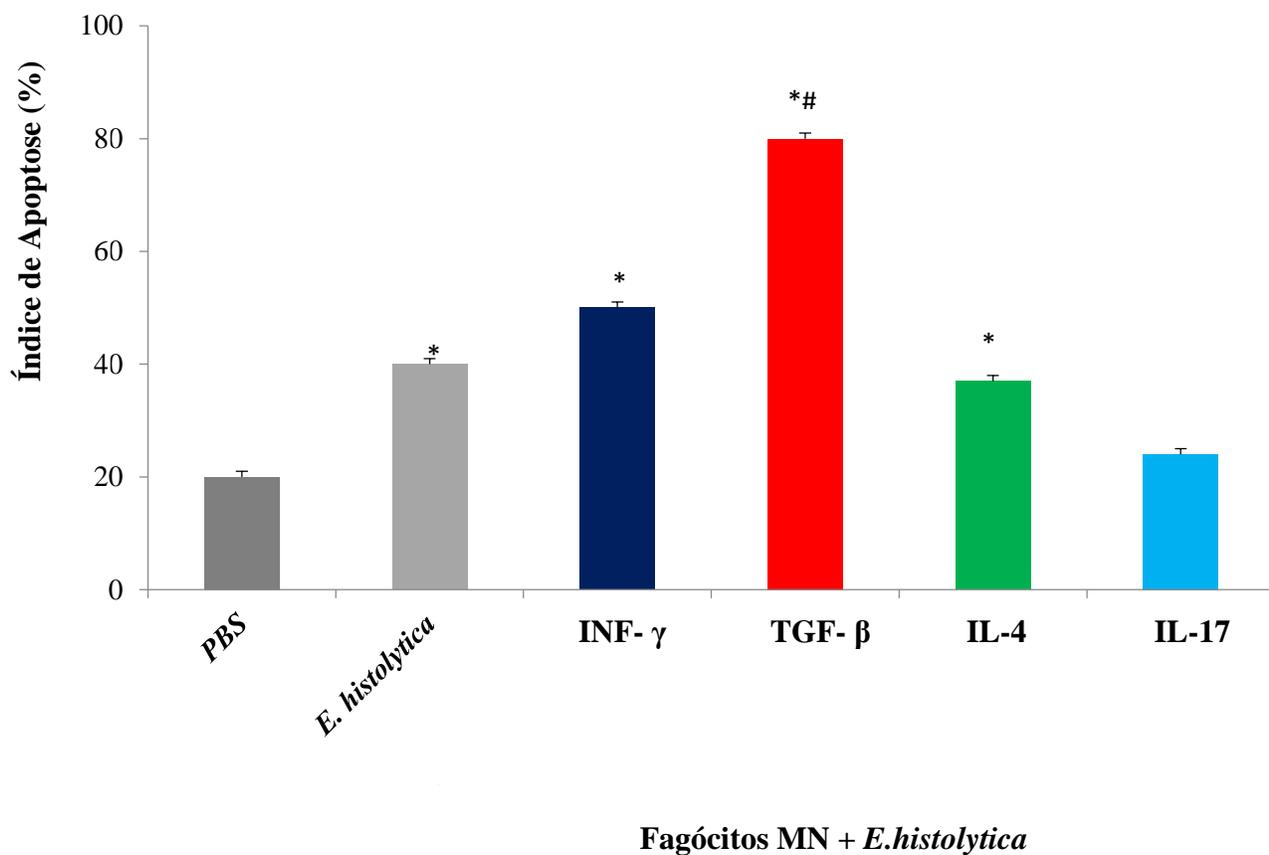


Figura 3. Índice de apoptose de fagócitos MN tratados por citocinas (INF- γ TGF- β , IL-4 e IL-17) durante interações com *E. histolytica*. $P < 0.05$.

*indica diferenças entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.

indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

5.7. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados, ou não, por citocinas.

A liberação de cálcio intracelular por fagócitos estimulados por citocinas IFN- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 estão apresentadas nas figuras 4. As células foram marcadas por Fluo-3 (Fluo-3 Acetoxymethyl) e a intensidade de fluorescência foi analisada por citometria de fluxo e expressa em média geométrica da intensidade de fluorescência (Figuras 5 e 6). Observa-se que a liberação de cálcio intracelular de células tratadas com INF- γ foi similar à liberação observado pelo grupo controle.

Quando as células foram tratadas com as TGF- β , IL-4 e IL-17 houve a liberação de cálcio intracelular maior quando comparado à liberação de células do grupo controle e ao grupo com INF- γ . Embora as maiores médias de liberação de cálcio intracelular foram observadas em fagócitos tratados por TGF- β .

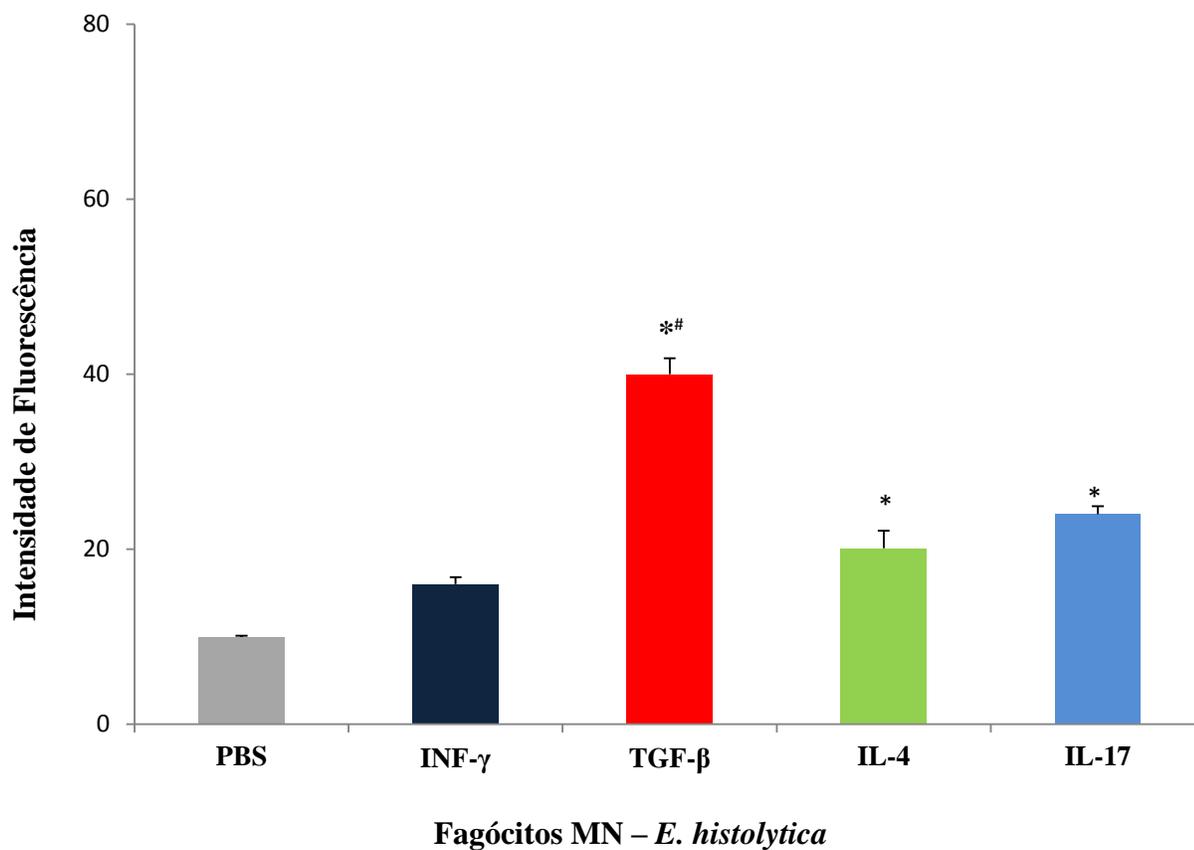


Figura 4. Liberação de cálcio intracelular pelos fagócitos MN tratados por INF- γ TGF- β IL-4 e IL-17. $P < 0.05$.
* indica diferenças entre o grupo controle (sem citocinas) com os grupos tratados com citocinas.
indica diferenças entre os grupos tratados com citocinas.

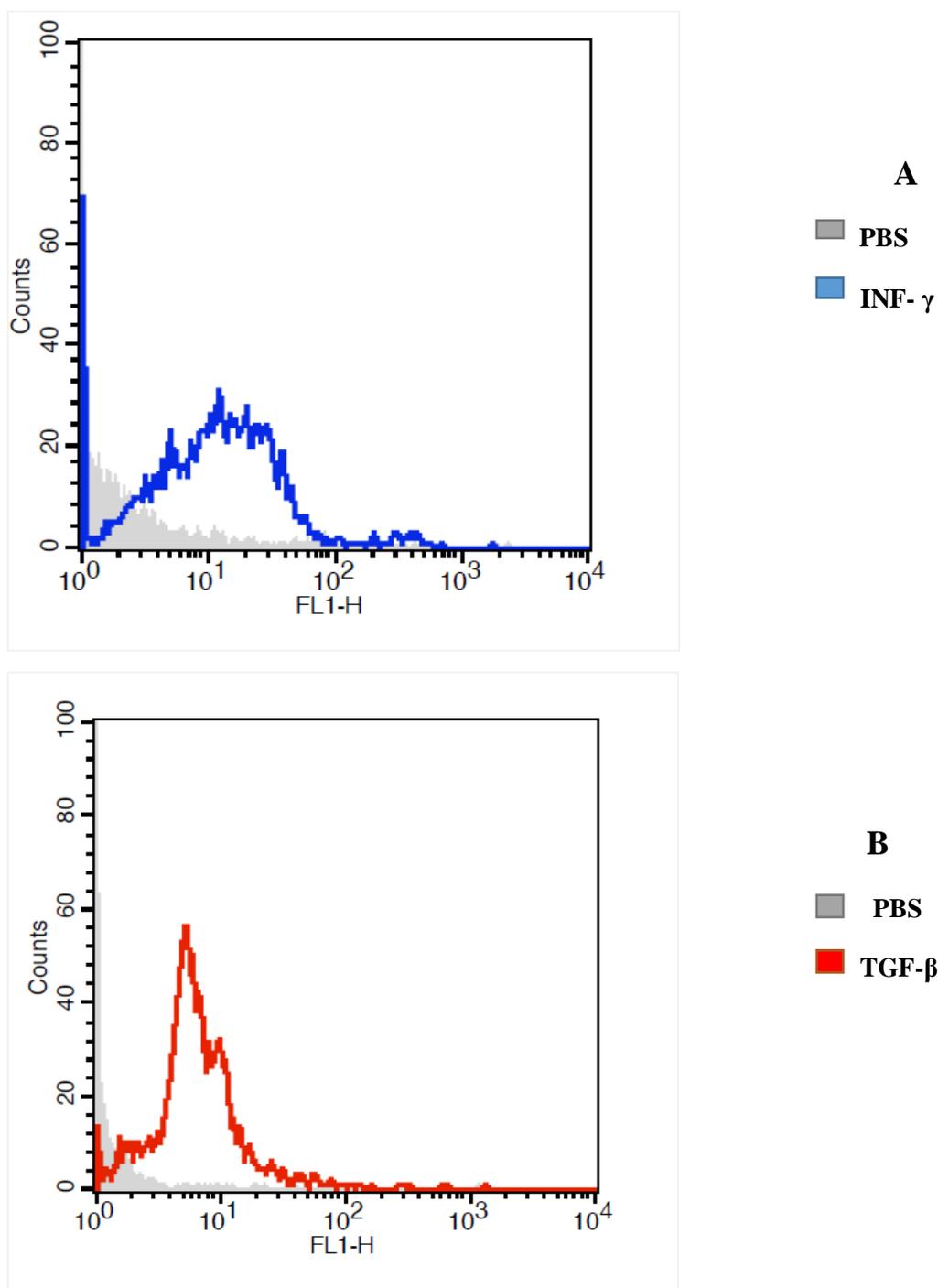


Figura 5. Intensidade de liberação de Ca^{2+} pelos fagócitos MN do sangue tratados ou não por citocinas. A ($\text{INF-}\gamma$) e B ($\text{TGF-}\beta$)

As células foram marcadas com Fluor-3, e as análises de imunofluorescência foram realizadas por citometria de Fluxo (FacsCalibur, Becton Dickson, USA).

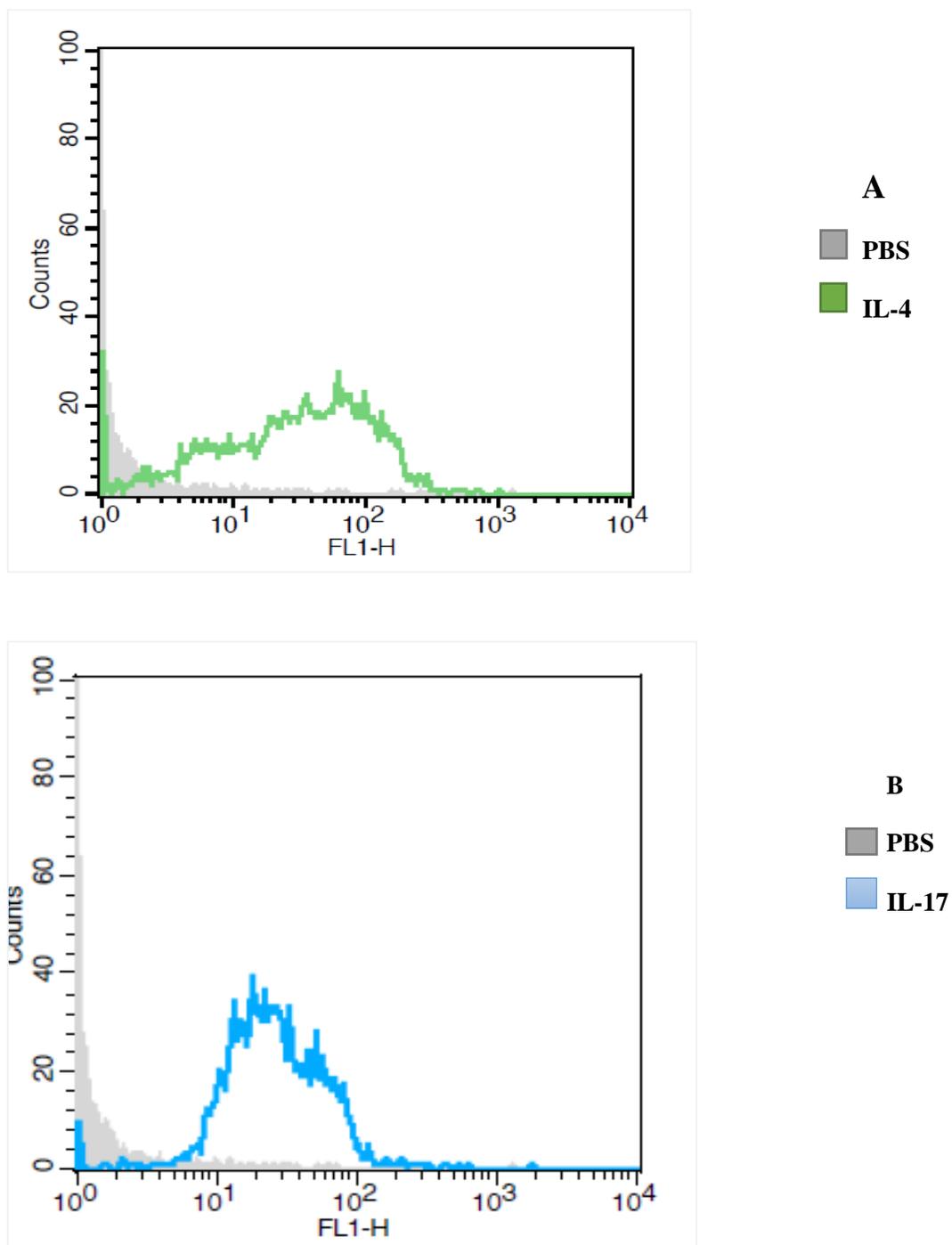


Figura 6. Intensidade de liberação de Ca^{2+} pelos fagócitos MN do sangue tratados por citocinas. A (IL-4) e B (IL-17). As células foram marcadas com Fluor-3, e as análises de imunofluorescência foram realizadas por citometria de Fluxo (FacsCalibur, Becton Dickson, USA).

6. Discussão

A amebíase é um dos principais problemas de saúde nos países em desenvolvimento, com base nisso foi realizado o presente estudo, o qual descreve as concentrações das citocinas INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 em sobrenadante de culturas de fagócitos MN do sangue humano e *E. histolytica*, e a modulação destas citocinas sobre a atividade funcional destes fagócitos durante interações com o parasito.

Para a realização das interações dos fagócitos mononucleares na presença de citocinas, foi necessário realizar a identificação dos tipos celulares, esta análise permitiu identificar os marcadores de superfície celular, por sua vez denominados de CD (“cluster of differentiation”) os quais são úteis para identificação de preparações celulares na utilização em ensaios biológicos *in vitro* (Zola et al. 2000). Para este estudo foram utilizados anticorpos monoclonais marcados com Fluo-3 e a partir disso foi possível identificar a população de células utilizadas, garantido para a pesquisa um número considerável de células que expressaram os marcadores CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD 14⁺ permitindo assim seu uso para as análises.

Para entender a influência das citocinas em culturas de fagócitos e trofozoítos de *E. histolytica*, INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17 foram quantificadas e houve uma liberação expressiva dessas citocinas, sobretudo de INF- γ . O INF- γ tem grande relevância, sobretudo na atividade de fagócitos. Por isso a participação da imunidade mediada por células MN tem papel fundamental nas infecções por protozoários. Sabe-se que esta resposta imunológica induz uma cascata de eventos como a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que permite o parasito evadir do sistema imunológico do hospedeiro, contribuindo para patogênese na amebíase (Baeza et al. 2010).

Estudos em culturas de *E. histolytica* relatam a inibição da quimiotaxia e da mobilidade de fagócitos MN em humanos (Kresthmer et al. 1985). Contudo, ainda assim, os fagócitos MN do sangue humano conseguem desempenhar suas funções durante as infecções pelo parasito. Eles

são direcionados para os locais da inflamação e são responsáveis pela regulação positiva de algumas moléculas de adesão em células endoteliais (Puente et al. 2009). Além disso, eles têm atividade antimicrobiana direta em locais de infecção e podem, também, particularmente transportar antígenos microbianos para linfonodos (Puente et al. 2009).

Estudos têm mostrado que os monócitos atuam em conjunto com outras células, entre estas as células TCD4⁺ e TCD8⁺. Isto sugere que eles possam contribuir para a resposta de células T específicas em algumas infecções (Cheong et al. 2010), e promover a liberação de inúmeros mediadores inflamatórios. Esta cooperação entre as citocinas foi avaliada neste trabalho, sobretudo se a citocina interferiu na funcionalidade da célula, ou na atividade do parasito.

Vários fatores afetam a produção de citocinas, em especial durante as infecções por protozoários. Neste trabalho a interação das células na presença de trofozoítos desencadeou maior liberação de INF- γ e TGF- β . A literatura reporta que o aumento de citocinas pró-inflamatórias está relacionado com a virulência do parasito e que células do sangue em presença de trofozoítos apresentam níveis elevados de INF- γ (Denis & Chadee 1989).

O INF- γ atua principalmente em monócitos e macrófagos potencializando a capacidade fagocítica e atividade microbicida. Esta citocina permite proteção para amebíase através de sua capacidade de ativar fagócitos. Estudo avaliando fagócitos MN estimulados com extrato amebiano solúvel têm mostrado aumento na produção de IFN- γ e redução de diarreia em pacientes com amebíase (Galvan et al. 2009). O aumento na concentração de INF- γ correlaciona-se com diminuição de quadros graves de amebíase (Shanonn et al. 2013) o que sugere que esta citocina está associada à proteção de infecções por *E. histolytica* (Guo et al. 2011).

Neste trabalho também foi evidenciada a presença de TGF- β em culturas de células MN e *E. histolytica*. As altas concentrações de TGF- β observada neste estudo, também foram relatadas em outros trabalhos (Bansal et al. 2005). Isso ocorre porque o TGF- β promove proteção e imunidade de mucosa através da indução de produção de Ig A (Corthésy 2007). A IgA pode agir no lúmen intestinal impedindo a adesão amebiana, além de impossibilitar a permanência de antígenos excretados pelo parasito ao lúmen. Esta imunoglobulina pode neutralizar esses antígenos durante o transito pelo epitélio, inibindo diretamente a reprodução de *E. histolytica*. Além de todas essas características, uma característica desta citocina foi mostrada neste trabalho que é a capacidade de desencadear a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias, essa informação corrobora com outros trabalhos na literatura (Carrero et al. 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o TGF- β é uma importante citocina capaz de atuar em cooperação, isso porque um de seus efeitos estimulatórios consiste na ativação da atividade de monócitos humanos, no aumento do recrutamento de colônias de macrófagos ao local (Celada & Maki 1992). Essa atuação do TGF- β pode estimular os efeitos de outras citocinas, principalmente aquelas presentes na mucosa durante as infecções por *E. histolytica*. Sabe-se que esta produção de TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro* é importante para determinar a suscetibilidade parasitária (Celada & Maki 1992). No entanto há controvérsias sobre o papel imunomodulador do TGF- β . Alguns autores relatam que esta citocina apresenta efeitos inibitórios (Fank et al. 1992), enquanto outros efeitos estimulatórios (Fagundes et al. 2013). Acredita-se que a função do TGF- β depende de vários fatores como fenótipo da célula, estímulo e o local da resposta imunológica.

Por outro lado, neste estudo houve menor liberação da IL-4 e IL-17. Como a proteção do hospedeiro e a menor suscetibilidade a amebíase está diretamente relacionada ao equilíbrio de

uma resposta imune celular entre perfil Th1 e Th2, há relatos na literatura correlacionando as lesões amebianas a concentrações elevadas de IL-4 (Puente et al. 2009), trabalhos experimentais com células do sangue também mostraram aumento de IL-4 quando estimulados com extratos amebianos (Bernin et al. 2014)..

A IL-4 foi identificada como uma citocina que participa da resposta mediada por célula T durante infecção experimental por *E. histolytica*. E a depleção de células T CD4⁺ de murinos infectados diminui a produção de IL-4 contribuindo para a resolução da infecção experimental (Houpt et al. 2002). Estudos experimentais indicam que a IL-4 desempenha importante papel na patogênese da amebíase, levando a regulação de linfócitos T com maior produção de células do tipo Th2 o que poderia inibir a produção de INF- γ , agravando o quadro de infecção pelo parasito (Houpt et al. 2002)..

No trabalho realizado a menor liberação de IL-4 correlaciona-se com o padrão de imunidade do tipo Th2, esse perfil não é o tipo de resposta protetora para esse parasito. Como para outros patógenos é sabido que citocinas do perfil Th2 contribui para as condições fisiopatológicas de algumas doenças, principalmente parasitose intestinal (Hegewald et al.2015). Em crianças parasitadas por *E. histolytica* a IL-4 em grandes quantidades diminui a resposta inflamatória (Ham 2009).

É de conhecimento que a fase crônica da colite amebiana necessita de um equilíbrio adequado entre as diferentes citocinas liberadas por células Th1 e Th2 (Houpt et al. 2002; Guo et al. 2009). As citocinas pró-inflamatórias têm papel na regulação da inflamação durante a estimulação *in vitro* ou após a infecção *in vivo* por *E. histolytica*. Uma resposta desregulada de células Th1 e Th2 pode ser responsável pela indução de colite em modelos murinos, isso se deve a deficiência de mecanismos reguladores mediados por células (Izcue et al. 2009).

Dada a importância das citocinas na progressão de doenças infecciosas, a resposta caracterizada como Th17 foi relevante neste trabalho, isso porque corrobora com outros trabalhos a importância desta citocina, cuja função pró-inflamatória é capaz de induzir a expressão de vários mediadores inflamatórios, e desempenha um papel crucial na defesa do hospedeiro para várias infecções (Ablamunits, et al. 2012; Jiyeon & Martha 2013; Kim et al. 2013). Isto foi observado neste estudo, onde a liberação desta citocina em culturas de fagócitos-ameba pode interferir na patogênese do parasito.

As citocinas exercem efeitos na sinalização e regulação biológica em vários processos fisiológicos e estão relacionadas com a ativação dos fagócitos e produção de espécies reativas de oxigênio (Séguin et al. 1997). A eficiência da atividade microbicida dos fagócitos está relacionada ao estresse oxidativo e formação de ROS, pois ela é fundamental para eliminação de patógenos, a geração dos radicais livres, pois contribui para a eficiência dos fagócitos, porém a persistência desses radicais e a produção de enzimas por alguns parasitos podem culminar em morte da célula do hospedeiro (Ferrari et al. 2011).

Estudos relatam que, durante infecções por protozoários ocorre participação ativa dos metabólitos de oxigênio (França et al. 2012; França et al. 2009; França-Botelho et al. 2013). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são importantes para proteção durante a infecção por *E. histolytica*, isto porque são capazes de eliminar os trofozoítos.

No presente estudo, as citocinas modularam a liberação do ânion superóxido. Houve aumento de liberação de ânion superóxido pelos fagócitos MN na presença de *E. histolytica*. Este aumento foi mais expressivo quando os fagócitos foram tratados pelas citocinas. Resultados similares de ânion superóxido foram obtidos durante as interações de células MN e ameba na presença de hormônios (França et al. 2011), o que sugere que essas interações são dependentes de

agentes imunomoduladores. Neste trabalho a liberação do ânion superóxido, interferiu positivamente na capacidade amebicida das células.

Esse resultado mostra a ligação direta entre o estresse oxidativo e atividade amebicida. O aumento do estresse oxidativo parece ser induzido pelo parasito e estimulado pelas citocinas, este efeito refletiu na leucofagocitose e na atividade amebicida. A fagocitose desempenha um papel importante na patogenicidade da *E. histolytica*. Uma das estratégias na relação parasito-hospedeiro é a capacidade de fagocitose da ameba, como um dos mecanismos de evasão (França-Botelho et al. 2011; França-botelho et al 2010; França-Botelho et al 2012). Estudos envolvendo leucócitos e amebas demonstram que linhagens virulentas de ameba são letais para leucócitos, pois as células perdem sua motilidade e são fagocitadas e mortas pelo parasito (Guerrant et al. 1981).

No presente trabalho, as citocinas foram capazes de modular a leucofagocitose de trofozoítos de *E. histolytica*. Houve redução na capacidade de ingestão de células por amebas isto ocorreu na presença de todas as citocinas avaliadas (INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17).

A fagocitose e a atividade microbicida de células, com produção de metabólitos ativos do oxigênio, são importantes mecanismos de defesa para várias infecções bacterianas (Carares & Richie 2011) fúngicas (Pacheco et al. 2014) e protozoários (França-Botelho et al 2011). Citocinas como INF- γ primeiramente atuam sobre monócitos e macrófagos ativando seus mecanismos de fagocitose e microbicidas (Dickson- Gonzalez et al 2009). Estudos *in vitro*, comprovaram que células mononucleares tem melhor atividade sob a ativação de citocinas como INF- γ , uma vez que aumenta sua atividade amebicida (Chadee & Heerovitch, 1989).

Trabalhos *in vitro* reforçam que INF- γ ativam macrófagos e neutrófilos para *E. histolytica*. Além disso, INF- γ diminui tanto a infecção quanto a inflamação em modelos

experimentais. É possível que o INF- γ exerça um efeito protetor sobre o epitélio. Estudos anteriores em sistemas de helmintos intestinais relataram que o INF- γ pode regular e promover apoptose epitelial durante a infecção. *In vitro*, o INF- γ gama tem diversos efeitos sobre células epiteliais, tais como o aumento da permeabilidade epitelial, o aumento da expressão de moléculas na função inata e produção de ânion superóxido (Guo et al. 2009).

Os fagócitos mononucleares são as células efetoras capazes de eliminar às cepas virulentas de *E. histolytica*. A morte de *E. histolytica* pelas células MNs envolvem tanto os mecanismos não-oxidativos como oxidativos. Em estudos, utilizando trofozoítos de cepas virulentas axênicas de *E. histolytica* demonstrou que estes parasitos foram capazes de induzir uma resposta oxidativa em populações de monócitos. Isso mostra que estas células produzem estresse oxidativo na presença de amebas. Por isso esta interação de cepas virulentas de *E. histolytica* e leucócitos humanos mostra o potencial amebicida de fagócitos MN. Macrófagos derivados de monócitos humanos são ativados por citocinas e eficazes na atividade microbicida para o parasito. Através do contato célula-ameba a ativação de mecanismos oxidativos aumenta a capacidade celular de eliminar o parasito (Ravdin et al. 1985).

Também o papel do TGF- β tem sido relatado em estudos histopatológicos de colite amebiana, bem como em células do sangue estimuladas com ameba (Haupt et al. 2002). Neste trabalho, os fagócitos MN expostos a *E. histolytica* e estimulados por citocinas mostraram redução na leucofagocitose, e o aumento na atividade amebicida e de apoptose. Estes resultados sugerem que as citocinas desempenham um papel benéfico para o hospedeiro, pela ativação de células MN na presença de *E. histolytica*. Além disso, os níveis mais elevados de superóxido foram mensurados durante as interações de células MN-ameba tratados por citocinas, que se correlacionam com maior atividade amebicida.

Parece que *E. histolytica* é capaz de induzir diretamente a apoptose de células hospedeiras (Becker et al. 2010). Por outro lado, o aumento na atividade microbicida é crucial para a resposta imune do hospedeiro na amebíase intestinal, e a atividade funcional de fagócitos modulada por citocinas também tem sido relatada como importante mecanismo de proteção para outras infecções (Fagundes et al. 2013).

Quando as culturas de células e amebas foram tratadas por IL-17 foi observado que na presença desta citocinas as células mononucleares aumentam sua capacidade amebicida, com aumento da liberação de ânion superóxido e do influxo de cálcio intracelular. Também a IL-17 interferiu na capacidade leucofagocítica do parasita, e reduziu o índice de apoptose das células. Sabe-se que a presença de IL-17 impede a apoptose de monócitos e macrófagos e induz a intensa diferenciação, garantindo assim a remoção eficiente dos neutrófilos apoptóticos e da restauração das condições anti-inflamatórias (Zizzo & Cohen 2013).

As células Th17 são conhecidas por desempenhar um papel importante na mucosa e na defesa para infecção por bactérias patogênicas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Helicobacter pylori* e *Salmonella enterica* (Schulz 2008). Porém os mecanismos de proteção de IL-17 são mediados por recrutamento das células, e envolve os locais infectados, e a regulação da resposta Th1 através de citocinas e quimiocinas induzidas por IL-17 (Bai et al. 2009, Zhang et al. 2009).

Curiosamente, a acentuada redução de IL-17 ocorre na ausência de IFN- γ , sugerindo interação entre Th1 e células Th17 (Lin et al. 2009). Os dados apresentados neste estudo revelaram essa interação da IL-17 com as citocinas de perfil Th1. Estes resultados sugerem que a IL-17 pode atuar em cooperação com INF- γ na proteção para *E. histolytica*. No entanto, ainda

não há um consenso atual devido à falta de evidências da ação destas citocinas e o mecanismo exato que ela possa desempenhar durante as infecções por protozoários.

A função de proteção da IL-17 para doenças infecciosas tem sido alvo de especulação. Inicialmente pensavam que esta citocina fosse derivada apenas de células T CD4. Mas as fontes de IL-17 são agora conhecidas por serem variadas e pertencerem a ambas, tanto na resposta inata quanto adaptativa. Os mecanismos que induzem a produção de IL-17 em células linfoides são provocados por estimulação antigênica e parece também existir o efeito regulador negativo de IFN- γ em roedores e humanos sobre a produção de IL-17. Parece que adição de INF- γ *in vitro* diminui a produção de IL-17 em ambos os tipos de células. Além disso, em algumas infecções por protozoários ela pode induzir um fenótipo Th17 que tem atividade amebicida, e causa a morte das células alvo infectadas (Peckham et al. 2014).

Em estudo com parasitos intestinais foi observado pela primeira vez uma resposta da IL-17 com perfil protetor, isto porque em comparação com outros trabalhos pode perceber que em modelos murinos as células TCD 4 produtoras de IL-17 foram importantes para depuração do parasito neste modelo (Dressen et al 2014).

Interessante que neste trabalho foi evidenciado em culturas de células MN-amebas, altas concentrações de IFN- γ e acentuada produção de IL-17. Mais estudos devem ser realizados para elucidar os mecanismos efetores que ocorrem durante as interações células MN-parasito em presença de ambas as citocinas.

A ação de citocinas também está associada com um número de processos tais como alterações no Ca²⁺ intracelular por fagócitos (Fagundes et al. 2013). Neste trabalho o TGF- β induziu aumento na liberação de Ca²⁺ intracelular em fagócitos MN. A literatura tem demonstrado que o aumento da liberação de superóxido modifica a resposta de Ca²⁺ intracelular e

os eventos de fosforilação durante o metabolismo oxidativo (Carrichon et al. 2011), em resposta a hormônios (Morceli et al. 2013; Pundt et al. 2009) e citocinas (Fagundes et al. 2013). O aumento da liberação de superóxido pelas células na presença de TGF- β provavelmente alterou os níveis de Ca²⁺ intracelular e promoveu atividade amebicida destes fagócitos. Considerando que *E. histolytica* vive no intestino em contato constante com os fatores imunológicos da mucosa, a interação do TGF- β e células MN pode ser um importante mecanismo de proteção conferido pela imunidade de mucosa para as infecções por *E. histolytica*.

A imunidade para *E. histolytica* é dependente de resposta do tipo Th1, e parece que a resposta do tipo Th2 com a produção de IL-4 pode causar danos aos tecidos do hospedeiro. Por outro lado a resposta discreta em relação a IL-4 se deve a mudança de resposta celular. Os resultados encontrados neste estudo suporta a hipótese que a resposta associada ao tipo Th2 pode estar correlacionada a processos inflamatórios e danos teciduais (Garcia et al. 2007).

A evidência do papel modulador das citocinas sobre a atividade funcional de fagócitos sugere a importância de interações entre componentes solúveis, em especial as citocinas. Considerando que o habitat do parasito, os resultados do presente estudo reforçam a necessidade da integridade da imunidade do hospedeiro, tanto sistêmica como de mucosa, durante as infecções por *E. Histolytica* (Garcia et al. 2007).

Outros trabalhos mensuraram que o estresse oxidativo em camundongos é mediado pela produção de INF- γ e pelas células MNs. Para os humanos ainda é pouco esclarecido quais as citocinas envolvidas. Os resultados encontrados neste estudo revelam que mesmo sendo o INF- γ importante citocina, os melhores índices amebicidas e de apoptose ocorreram quando as células foram tratadas por TGF- β . Por outro lado, a IL-17, apesar de aumentar a atividade amebicida de

fagócitos MN, esta citocina não foi capaz de induzir morte por apoptose, o que sugere que distintos mecanismos celulares estão envolvidos na morte do parasito.

Enquanto a resposta Th1 é conhecida por mediar a resistência à amebíase (Rafiei et al 2009; Baxt et al 2010). Existe ainda pouca informação disponível para o papel de IL-17 durante a infecção amebiana.

As Células Th17 são conhecidas por desempenhar papéis importantes na defesa da mucosa. O mecanismo de IL-17 está relacionado à proteção, e envolve o recrutamento de células para os sítios de infecção, assim também a regulação da função de células Th1 (Zhang et al. 2009). Portanto, a IL-17 poderia representar uma nova estratégia de prevenção de infecção por *E. histolytica* e capaz de aumentar resposta protetora Th1. É interessante notar que em outros estudos foram observados diminuição na produção de IL-17 sobre a produção de INF- γ sugerindo uma interação entre as células Th1 e Th17 (Bai et al. 2009; Guo et al, 2011). A via Th17 tem sido associada à cooperação de resposta entre a IL -17 e INF- γ , ou seja, elas coexistem durante a inflamação intestinal. Entretanto a cooperação entre perfil Th1 e Th17 não está claro em doenças intestinais (Bamis et al. 2007).

De acordo com os dados encontrados, mais estudos devem ser conduzidos buscando elucidar os mecanismos imunomodulares mediados por citocinas, sobretudo na associação da IL-17 a outras citocinas, em doenças parasitárias. Entretanto é evidente que esta citocina possa promover efeito protetor regulando a resposta do tipo Th1, sendo benéfico nas interações parasito- hospedeiro, sobretudo na amebíase.

7. Conclusões

- ✓ As maiores concentrações de citocinas presentes em culturas de fagócitos MN-ameba foi de INF- γ e TGF- β ;
- ✓ O tratamento dos fagócitos MN pelas citocinas, independentemente do tipo, aumentou a liberação de superóxido quando estas células foram incubadas com *E.histolytica*;
- ✓ A leucofagocitose foi menor quando os fagócitos MN foram tratados pelas citocinas, sugerindo que ocorre a morte de amebas durante a leucofagocitose
- ✓ A atividade amebicida dos fagócitos MN foi maior quando estas células foram tratadas pelas citocinas. Os maiores índices amebicidas foram observados quando os fagócitos foram tratados por TGF- β ;
- ✓ As citocinas INF- γ , TGF- β e IL-4 induziu morte por apoptose em fagócitos MN-ameba;
- ✓ Houve aumento de influxo de cálcio intracelular pelos fagócitos MN estimulado por TGF- β e IL-17;
- ✓ Estes dados sugerem que as citocinas, INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL-17, modulam a atividade funcional de fagócitos MN do sangue e esta atividade parece ser de fundamental importância para o controle das infecções amebianas.

Referências Bibliográficas

Aaby P, Marx C, Trautner S, Rudaa D 2002. Thymus size at birth is associated with infant mortality: a community study from Guinea-Bissau. *Acta Paediatr* 91: 698-703.

Abd Alla MD, Wolf R, White GL, Ravdin JI 2012. Efficacy of a Gal-lectin subunit vaccine against experimental *Entamoeba histolytica* infection and colitis in baboons. *Vaccine* 20: 3068-3075.

Ablamunits V, Henegariu O, Hansen JB, Opare-Addo L 2012. Synergistic reversal of type 1 diabetes in NOD mice with anti-CD3 and interleukin-1 blockade: evidence of improved immune regulation. *Diabetes* 61: 145-154.

Andrade DR, Júnior DRA 1996. Amebíase. In: Veronesi R, Foccacia R. *Trat Infect*, Atheneu, São Paulo, 1149-1159.

Araújo CF, Fernández CL 2005. Incidência de enteroparasitoses em localidades atendidas pelo comando da aeronáutica no Estado do Amazonas. *Rev Med Aer Bras* 55: 40-46.

Asgharpour A, Gilchrist C, Hamano S, Houpt E 2005. Resistance to intestinal *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. *Infect. Immun.* 73: 4522-4529.

Baeza IW, Alcantara-Hernandez M, Mancilla-Herrera, Ramirez-Saldívar I 2010. The Role of Lipopeptidophosphoglycan in the Immune Response to *Entamoeba histolytica*. *Biomed Biotechnol* 2010:1-12.

Bai H, Cheng J, Gao X 2009. IL-17/Th17 promotes type 1 T cell immunity against pulmonary intracellular bacterial infection through modulating dendritic cell function. *J. Immunol* 183: 5886-5895.

Bansal D, Bhati HS, Sehgal R 2005. Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids in Health and Disease* 4: 1-7.

Bernin H, Marggraff C, Jacobs T, Brattig N 2014. Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex. *BMC Infect Dis* 14: 1-10.

Black RE, Allen LH, Bhutta ZA 2008. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* 371: 243-260.

Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ravdin JI 2002. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. *J Clin Microbiol.* 40: 4413-4417.

- Botelho ACF, França JL, França EL, Honório-Franca AC, Gomes MA 2010. Relationship between oxidative stress production and virulence capacity of *Entamoeba* strains. *J Parasitol* 5: 139-147.
- Bracha R, Nuchamowitz Y and Mirelman D 2002. Amoebapore is an important virulence factor of *Entamoeba histolytica*. *J. Biosci. (Suppl. 3)* 27: 579–587.
- Brito KNO 2007. *Avaliação histopatológica e imuno histoquímica de cepas xênicas e axênica*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 70 pp.
- Bruker. AD 1992. *Amebiasis Clinical Microbiology*. 5: 356-369.
- Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G 2005. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in a non-endemic setting. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100: 450-7.
- Carrero JC, Cervantes-Rebolledo, Aguilar-Díaz H, Díaz-Gallardo MY 2007. Secretory immune response in amoebiasis. The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 29: 331-338.
- Carrichon L, Picciocchi A, Debeurme F, Beaumel S 2011. Characterization of superoxide overproduction by the D-LoopNox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes -Differential sensitivity to calcium and phosphorylation events. *Biochim Biophys Acta* 1808: 78-90.
- Celada A, Maki RA 1992. Transforming growth factor- β 1 enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol* 148: 1102-1105.
- Chadee K, Heerovitch E 1989. *Entamoeba histolytica*: diffuse liver inflammation in gerbils (*Meriones unguiculatus*) with experimentally inducedamebic liver abscesso. *J Protozool* 36: 154-8.
- Chandra RK 1992. Protein-Energy Malnutrition and Immunological Responses. *Journ Nutrit* 122: 597-600.
- Chaves ACP, Seixas-Filho JTS, Dantas MML 2010. Revisão do mecanismo fisiopatológico da amebíase. *Rev. Aug* 14: 74-87 pp.
- Cheong C , Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143:416-429.
- Christy NCV, Petri JR WA 2011. Mechanisms of adherence, cytotoxicity and phagocytosis modulate the phatgenesis of *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 6: 1501-1519.

Cimerman B, Cimerman S 2008. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais, 2th ed., Atheneu, São Paulo, 390pp.

Cordeiro TGP, Macedo HW 2007. Amebíase. *Ver Patol Trop* 2: 119-127.

Corthésy B 2007. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? *J Immunol* 78: 27-32.

Costa CAX 2010. Influência da imunidade sobre os trofozoítos e as lesões amebianas produzidas pela *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar*, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 84 pp.

Coura CF, Willcox HPF, Tavares AM, Paiva DD 1994. Aspectos epidemiológicos, sociais e sanitário de uma área no rio Negro, Estado do Amazonas, com especial referência as parasitoses intestinais e a infecção chagásica. *Cad Saúde Publ* 10: 331-334.

Denis M, Chadee K 1989. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Infect Immun* 57: 1750-1756.

Diamond LS, *Entamoeba histolytica* Schaudin 1903: from xenic to axenic cultivation. *J Protozool* 1986; 33:1-5.

Doganci L, Tanyuksel M, Doganci T 2004. Accurate diagnosis is essential for amebiasis. *World J Gastroenterol.* 10: 1231.

Dolabella SS, Coelho PM, Borçari IT, Mello NA, Andrade ZA, Silva EF 2007. Morbidity due to *Schistosoma mansoni-Entamoeba histolytica* coinfection in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 170-174.

Dourado A, Maciel A, Aca IS 2006. Ocorrência de *Entamoeba histolytica/ Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 388-389.

Espinosa-Cantellano M, Gonzales-Robles A, Chavez B 1998. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol* 45: 265-272.

Façanha MC, Pinheiro AC 2005. Acute diarrhea treated by health care services in Fortaleza, Ceará State, Brazil, from 1996 to 2001. *Cad Saud Pub* 21:49-54.

Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Honorio-França AC 2013. The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers. *Clinical Develop Immunol* 2013:1-12.

Fank RQ, Sensenbrenner L, Chen B 1992. Transforming growth factor- β 1 bifunctionally regulates murine macrophage proliferation. *Blood* 79: 1679-1685.

- Ferrari CK, Junior A 2011. Mitochondrial Metabolism, Free Radicals and Aging. *Rev. Bras. Geriatr. Gerontol* 3:441-451.
- Fock RA, Vinolo MA, Crisma AR, Nakajima K, Borelli P 2008. Protein-Energy Malnutrition Modifies the Production of Interleukin-10 in Response to Lipopolysaccharide (LPS) in a Murine Model. *J Nutr Sci Vitaminol* 54: 371-377.
- França-Botelho AC, França JL, Oliveira FMS, Franca EL, Honório-França AC, Caliari MV, Gomes MA 2011. Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis. *Parasite Vectors* 62:1-6
- França-Botelho AC, Honório-França AC, França EL, Gomes MA 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostrual leukocytes. *Acta Paediatr* 4: 438-443.
- França-Botelho AC, Ferreira MC, França JL, França EL, Honório-França AC 2012. Breastfeeding and its relationship with reduction of breast cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 5327-5332
- França EL, Bittencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honório-França AC 2011. Human colostrual phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. *J Microbiol Immunol Infect* 44: 1-7.
- França EL, Feliciano ND, Silva KA, Ferrari CKB, Honório-França AC 2009. Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats. *Bratisl Med J* 110: 517-522.
- França EL, Morceli G, Fagundes DLG, Calderon IMP, Honório-França, AC 2011. Secretory IgA Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics. *APMIS* 119: 710-719.
- França EL, Vieira EL Morceli G, Fagundes DLG, Rudge MVC, Calderon IMP, Honório-França AC 2012. Transfer of Maternal Immunity to Newborns of Diabetic Mothers. *Clin Develop Immunol* 2012 ID: 928187.
- Galvan-Moroyoqui JM, Domnguez-Robles M & Meza I 2009. *Entamoeba histolytica* and enteropathogenic bacteria induce expression of Toll-receptor in human intestinal cell. *XVI Seminario sobre Amibiasis and EMBO Workshop*. México, Guanajuato.
- Garcia-Zepeda EA, Rojas-Lopez A, Esquivel-Velazquez M & Ostoa-Saloma P 2007. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine / chemokine network in amoebiasis. *Parasite Immunol* 29: 679-684.
- Guerrant RL, Brush J, Ravdin JI, Sullivan JA, Mandell GL 1981. Interaction between *Entamoeba histolytica* and Human Polymorphonuclear Neutrophils. *J Infect Dis* 143: 83-93.

- Guo X, Barroso L, Lyerly DM, Petri WA Jr, Houpt ER 2011. CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated Protection against *Entamoeba histolytica*. Induced by a Recombinant Vaccine. *Vaccine* 29, 772-777.
- Guo X, Barroso L, Becker SM 2009. Protection against Intestinal Amebiasis by a Recombinant Vaccine Is Transferable by T Cells and Mediated by Gamma Interferon. *Infect. Immun* 77: 3909-3918.
- Gutiérrez-Alarcon AM, Moguel-Torres O, Mata-Leyva G, Cuellar-Nevarez 2006. *Entamoeba histolytica*: Inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. *Exp. Parasitol* 114: 154-159.
- Hamm DM, Agossou A, Gantin RG, Kocherscheidt L, Banla M 2009. Coinfections with *Schistosoma haematobium*, *Necator americanus*, and *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* in children: Chemokine and Cytokine responses and changes after antiparasite treatment. *J Infect Dis* 199: 1583-1591.
- Haque R, Ali IK, Akther S, Petri WA Jr 1998. Comparison of PCR, isoenzyme analysis and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Microbiol* 36: 449-452.
- Haque R, Ali IM, Sack RB, et al 2001. Amebiasis and Mucosal IgA Antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence Lectin in Bangladeshi Children. *J Infect Dis* 183: 1787-1793.
- Haque R, Mondal D, Duggal P, Kabir M, Roy S, Farr BM, Sack RB, Petri WA Jr 2006. *Entamoeba histolytica* infection in children and protection from subsequent amebiasis. *Infect Immun* 74: 904-909.
- Hegewald J, Gantin RG, Lechner CJ, g Huang X, Agossou A 2015. Cellular cytokine and chemokine responses to parasite antigens and fungus and mite allergens in children co-infected with helminthes and protozoa parasites. *J Inflamm* 12:1-5.
- Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MSM, Monteiro RC 2001. Colostral neutrophils express Fcα receptors (CD89) lacking γ chain association and mediate noninflammatory of secretory IgA. *J Leuk Biol* 69: 289-296.
- Honorio-França AC, Silva KA, Feliciano ND, Calderon IMP, Rudge MVC *et al.* 2009. Melatonin effects on macrophage in diabetic rats and the maternal hyperglycemic implications for newborn rats. *Int J Diabet Metabol* 17: 87-92.
- Honorio-França AC, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM 1997. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol* 46: 59-66.

- Honório-França AC, Hara CCP, Ormonde JVS, Nunes GT, França EL 2013. Human colostrum melatonin exhibits a day-night variation and modulates the activity of colostrum phagocytes. *J Appl Biomed* 11: 153-162.
- Haupt ER, Glembocki DJ, Obrig TG 2002. The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4+ T cells. *J Immunol* 169: 4496-4503.
- Huston CD 2004. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol* 20: 23-26.
- Ivory CPA, Prystajek M, Jobin C, Chadee K 2008. Toll-like receptor 9-dependent macrophage activation by *Entamoeba histolytica* DNA. *Infect Immun* 76: 289-297.
- Izcue A, Coombes JL, Powrie F 2009. Regulatory Lymphocytes and Intestinal Inflammation *Rev Immunol* 27:313-338.
- Jelinek T, Peyerl G, Loscher T, Nothdurft HD 1996. Evaluation of an antigen - Capture enzyme immunoassay for detection of *Entamoeba histolytica* in stool sample. *European Journal of Clinical Microbiol Infect Dis* 15:752-755.
- Katzwinkel-Wladarsch S, Loscher T, Rinder H 1994. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from specimens. *Am Journal Trop Med Hyg* 51:115-118.
- Kim KA, Lee YA, Shin MH 2010. Calpain-dependent cleavage of SHP-1 and SHP-2 is involved in the dephosphorylation of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 32: 176-83.
- Kim JS1, Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS 2011. The requirements for natural Th17 cell development are distinct from those of conventional Th17 cells. *J Exp Med* 208: 2201-2207.
- Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT 2013. Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nature Immunol*. 14: 611-618.
- Krestschmer RML, Collado M.G, Pacheco M.C, Salinas M, Lopez-Osuna M, Lecuona, EM, Castro, Arellano J 1985. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. *Parasite Immunol* 7: 527-543.
- Lejeune M, Rybicka JM, Chadee K 2009. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol* 4: 105-118.
- Lin Y, Ritchie S, Logar A 2009. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. *Immunity* 31:799-810.

- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ 2001. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell* 104: 487-501.
- Lohia A 2003. Midwifery and assisted reproduction in dictyostelium and *Entamoeba*. *J Biosci* 28: 139-140.
- López-Osuna M, Arellano J, Kretschmer RR 1992. The destruction of virulent *Entamoeba histolytica* by activated human eosinophils. *Arch Med Res (Méx)* 23: 143-145.
- Lucas R, Upcroft JA 2001. Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. *Rev Latinoam Microbiol* 43: 183-187.
- Manuel CPJ, Virginia SM, D'Artagnan VMJ 2011. *Entamoeba histolytica* y su relación huésped parásito. *Enf Infecc y Microbiol* 31: 63-70.
- Martínez-Palomo A, Espinosa-Cantellano M 1998. Amoebiasis: new understanding and new goals. *Parasitol Today* 14:1-3.
- Mirelman D, Anbar M, Bracha R 2008. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* epigenetically silenced in several genes are virulence-attenuated. *Parasite* 15: 266-274.
- Mondal D, Haque R, Sack RB, Kirkpatrick BD, Petri WA Jr 2009. Attribution of Malnutrition to Cause-Specific Diarrheal Illness: Evidence from a Prospective Study of Preschool Children in Mirpur, Dhaka, Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 80: 824-826.
- Morceli G, Honorio-França AC, Fagundes DLG, Calderon IMP, França EL 2013. Antioxidant effect of melatonin on the functional activity of colostral phagocytes in diabetic women. *PLoS One* 8: 1-8.
- Mortimer L, Chadee K 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 47: 527-531.
- Mortimer L, Chadee K 2010. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol* 126: 366-380.
- Mota EO, Freitas MM, França RR 2013. Contribution to the study of clinical laboratory and differential diagnosis of the *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Scire Salutis* 3: 100-112.
- Oliveira FMS 2011. *Análise da resposta imunológica e das lesões intestinais em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1-/- na fase aguda da infecção amebiana inoculados com Entamoeba histolytica*, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 93 pp.

Oliveira UD, Chiuchetta SJR 2010. Ocorrência de enteroparasitoses na população do município de Goioerê - PR. *UNICiências* 14:151-158.

Ortega C, Fernandez A, Carrillo JM, et al. 2009. IL-17-producing CD8+ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol* 86: 435-443.

OMS, World Health Organization (WHO) 1997. Report of a consultation of experts on Amoebiasis, *Week Epidem Rec*7: 97-100.

Pacheco-Yopez J, Jarillo-Luna RA, Gutierrez-Meza M, Abarca-Rojano E 2014. Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess. *Biomed Res Int* 2014: 324230.

Pearson RJ1, Morf L, Singh U 2013. Regulation of H₂O₂ stress-responsive genes through a novel transcription factor in the protozoan pathogen *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem.* 288: 4462-4474.

Peckham PK, Brill R, Foster DS, Bowen AL 2014. Two distinct populations of Bovine IL-17 T-cells can be induced and WC11IL-171cd T-cells are effective killers of protozoan parasites. *Scientif Reports* 4:1-5.

Pessoa SB, Martins AV 1978. *Parasitologia médica*. 10th ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 872 pp.

Peterson KM, Shu J, Duggal P, Haque R, Mondal D 2010. Association between TNF-alpha and *Entamoeba histolytica* diarrhea. *Am J Trop Med Hyg* 82: 620-625.

Petri WA 1999. The detection of *Entamoeba histolytica*, the causative agente of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16: 713-729.

Petri B, Bixel MG 2006. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS Journal* 273: 4399-4407.

Pinheiro SM, Carneiro RM, Aca IS, Irmão JI, Morais MA Jr, Coimbra MR, Carvalho LB Jr 2004. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in the Pernambuco State of Northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 70: 221-4.

Ponciano A, Borges AP, Muniz HÁ, Garcia JD, Peret JC 2012. Ocorrência de parasitoses intestinais em alunos de 6 a 12 anos em escolas de ensino fundamental na cidade de Alfenas, MG. *Rev. Bras Anal Clin* 44: 107-111.

- Puente RES, Campos-Rodríguez r, Jarillo-Luna ra, Muñoz-Fernández L, Rodríguez MG 2009. Expression of immune modulator cytokines in human fulminant amoebic colitis. *Parasite Immunol* 31:1-7.
- Ramirez-Emiliano J, Flores-Villavicencio LL, Segovia J, Arias-Negrete S 2007. Nitric oxide participation during amoebic liver abscess development. *Medicina (B Aires)* 67: 167-176.
- Ravdin JI 1985. Adherence of *Entamoeba histolytica* thoprozoites to rat human colonic mucosa. *Infc Imm* 48: 292-297.
- Ravdin JI 1994. Diagnosis of invasive amoebiasis – time to end the morphology era. *Gut* 35: 1018-1021.
- Ravdin JL 1995. Amebiasis. *Clin Infect Dis* 20: 1453-1466.
- Ravdin JI, Murphy CF, Salata RA, Guerrant RL 1985. *N*-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. I. Partial purification and relation to amoebic virulence in vitro. *J. Infect.* 151: 804-815.
- Rivera WL, Santos SR, Kanbara H 2006. Prevalence and genetic diversity of *Entamoeba histolytica* in an institution for the mentally retarded in the Philippines. *Parasitol Res* 98: 106-110.
- Roussel L, François H, Chan C Yao Y, Berube J', Olivenstein R, Martin JG 2010. IL-17 Promotes p38 MAPK-Dependent Endothelial Activation Enhancing Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation. *J. Immunol* 12:1-7.
- Roy S, Kabir M, Mondal D, Ali IK, Petri WA Jr, Haque R. 2005. Real-time-PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. *J Clin Micorbiol* 43: 2168-2172.
- Salata RA, Murray HW, Rubin BY & Ravdin JI 1987. The role of gamma interferon in the generation of human macrophages cytotoxic for *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Am J Trop Med Hyg* 37: 72-78.
- Salles JM, Moraes LA, Salles MC 2003. Hepatic amebiasis. *Braz J Infect Dis* 7: 96-110
- Sánchez-Pozo C, Rodriguez-Baño J, Domínguez-Castellano A *et al.* 2003. Leptin stimulates the oxidative burst in control monocytes but attenuates the oxidative burst in monocytes from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 134: 464-469.
- Santi-Rocca J, Rigother MC, Guillén N 2009. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. *Clin Microbiol Ver* 22: 65-75.
- Santos FLN, Soares NM 2008. Mecanismos fisiopatogênicos e diagnóstico laboratorial da infecção causada pela *Entamoeba histolytica*. *J Bras Patol Med Lab* 44: 249-261.

- Schaible UE, Kaufmann SH 2007. Malnutrition and Infection: Complex Mechanisms and Global Impacts. *Plos Med* 4: 806-812.
- Séguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K 1997. The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect Immun* 7: 2522-2527
- Séguin R, Mann BJ, Keller K, Chadee K 1995. Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor-alpha production by macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 92: 12175-12179.
- Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL Jr. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis 1997. *Infect Immun* 65: 1631-1639.
- Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL 2000. Innate Immunity to Amebic Liver Abscess Is Dependent on Gamma Interferon and Nitric Oxide in a Murine Model of Disease. *Infect Immun* 68: 400-402.
- Shannon NM, Nona MJ, William A, Petri Jr 2013. Host Immune Response to Intestinal Amebiasis. *PLoS Pathog* 9: 1-4.
- Schulz SM, Kohler G, Holscher C, Iwakura Y, Alber G 2008. IL-17 is produced by Th17, gamma delta T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol* 20: 1129-1138.
- Siman-Tov R, Ankri S 2003. Nitric oxide inhibits cysteine proteinases and alcohol dehydrogenase 2 of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 89: 146-149.
- Silva EF, Gomes MA 2005. Amebíase. In DP Neves, *Parasitologia Humana*, 11th ed., Atheneu, São Paulo, 127-138 pp.
- Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor-f (TGF-f). *J Exp Med* 174: 539-545.
- Silva MCM, Monteiro CSP, Araújo BAV, Silva JV 2005. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. *Cad. Saud Pub* 21: 969-973.
- Sitaraman S1, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, Merlin D 2012. Colonic Leptin: Source of a Novel Pro Inflammatory Cytokine Involved in Inflammatory Bowel. *Faseb J* 18: 696-698.

Stanley SL 2001. Pathophysiology of amoebiasis. *Lancet* 361: 1025-1034.

Stanley SL 2003. Amoebiasis. *Lancet* 361: 1025-1034.

Tanyuksel M, Petri WA 2003. Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Ver* 16: 713-729.

Tsutsumi V, Shibayama M 2006. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. *Arch Med Res* 37: 210-220.

Upcroft P, Upcroft JA 2001. Drug targets and mechanisms of resistance in the anaerobic protozoa. *Clin Microbiol Rev* 14: 150-164.

Urdaneta H, Guimarães S, Silva EF, Tavares CAP 1994. *Entamoeba histolytica*: detection of coproantigens by purified antibody in the capture sandwich ELISA. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 36: 539-535.

Valle PR, Souza MB, Pires EM, Silva EF, Gomes MA 2000. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA and DNA in *Entamoeba histolytica*. *Rev Inst Med Trop* 42: 249-253.

Verkerke HP, Petri WA Jr, Marie CS 2012. The dynamic interdependence of amebiasis, innate immunity, and undernutrition. *Semin Immunopathol* 34: 771-785.

Vieira MR 2004. Amebíase e Outras Parasitoses Intestinais no Município de São João do Piauí-Pi Brasil, Tese de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 88 pp.

Vivanco I, Palaskas N, Tran C, Finn SP, Getz G 2007. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell* 11: 555-569.

Vorobjova T, Watanabe T, Chiba T 2008. *Helicobacter pylori* immunology and vaccines. *Helicobacter*.13 (Suppl 1):18-22.

Walker EL, Sellards AW 1913. Experimental entamoebic dysentery. *Phillip J Sci B Trop Med* 8: 253-331.

Walsh JA 1986. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8: 228-238.

Walsh JA 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: JI Ravdin (ed.), *Amebiasis: human infection by Entamoeba histolytica*, John Wiley and sons, New York, 1, 93-105.

Wang W, Keller K, Chadee K 1994. *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxide synthase gene and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunol* 83: 601-610.

- Wang W, Keller K, Chadee K 1992. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect Immun* 60: 3169-3164.
- Who/Paho/Unesco 1997. A consultation with experts on amoebiasis. *Epidemiol Bull* 18: 13-14.
- Wang Q, Zhang Y, Yang C, Xiong H, Lin Y, Yao J, Li H, Xie L, Zhao W, Yao Y, Ning ZB, Zeng R, Xiong Y, Guan KL, Zhao S, Zhao GP 2010. Acetylation of metabolic enzymes coordinates carbon source utilization and metabolic flux. *Science* 327: 1004-1007.
- Wong-Baeza I, Alcántara-Hernández M, Mancilla-Herrera I, Ramírez-Saldívar I, Arriaga-Pizano L, Ferat-Ororio E, López-Macías C, Isibasi A 2010. The role of lipopeptidophosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica*. *J Biomed Biotechnol* 2010: 1-12.
- Wong WK, Tan ZN, Othman N, Lim BH, Mohamed Z, Olivos-Garcia A, Noordin R 2011. Analysis of *Entamoeba histolytica* excretory-secretory antigen and identification of a new potential diagnostic marker. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1913-1917.
- Wong WK, Tan ZN, Lim BH, Mohamed Z, Olivos-Garcia A, Noordin R 2011. Comparison of protein-free defined media, and effect of L-cysteine and ascorbic acid supplementation on viability of axenic *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 108: 425-430
- Ximénez C, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gomez A 2009. Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art. *Infect Genet Evol* 9: 1023-1032.
- Yera H, Andiva S, Perret C, Limonne D, Boireau P, Dupouy-Camet J 2003. Development and Evaluation of a Western Blot Kit for Diagnosis of Human Trichinellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 793-796.
- Yoon PW, Black RE, Moulton LH, Becker S 1997. The effect of malnutrition on the risk of diarrheal and respiratory mortality in children < 2 y of age in Cebu, Philippines. *Am J Clin Nutr* 65: 1070-1077.
- Zhang Z, Mahajan S, Zhang X, Stanley SL 2003. Tumor Necrosis Factor Alpha Is a Key Mediator of Gut Inflammation Seen in Amebic Colitis in Human Intestine in the SCID Mouse-Human Intestinal Xenograft Model of Disease. *Infect Immun* 71: 5355-5359.
- Zhang X, Gao L, Lei L, et al. 2009. A MyD88-dependent early IL-17 production protects mice against airway infection with the obligate intracellular pathogen *Chlamydia muridarum*. *J Immunol* 183: 1291-1300.
- Zizzo G, Cohen PL 2013. IL-17 stimulates differentiation of human anti-inflammatory macrophages and phagocytosis of apoptotic neutrophils in response to IL-10 and glucocorticoids. *J Immunol* 190: 5237-5246.
- Zola H 2000. Immunological applications of flow cytometry. *J Immunol Methods* 243: 1-2

Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 3 – Email de submissão de artigo

Anexo 4 – Comprovante

Anexo 5- Artigo

Anexo 1 – Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: IMUNOMODULAÇÃO POR CITOCINAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS NA PRESENÇA DE *E. histolytica*.

Investigador: Lucelia Campelo de Albuquerque Moraes

Área Temática:

Formação: 1

CNPQ: 24220614.9.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Mato Grosso/ UFMT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 684.260

Data da Relatoria: 21/03/2014

Apresentação do Projeto:

A Amebíase é considerada a segunda maior causa de mortes no mundo, dentre as doenças parasitárias, ocasionando cerca de 40 a 100 mil óbitos por ano (WALSH, 1988). Essa doença foi descoberta e descrita por Lösch em 1875, relatada desde os tempos mais remotos de indivíduos que apresentaram diarreias com material esbranquiçado com sangue associado à icterícia e ulcerações intestinais (RAVDIN, 1995). A amebíase tem difusão mundial, é cosmopolita, ocorre principalmente em regiões de clima tropical e representa risco a saúde humana nos países em desenvolvimento, isso se justifica pela precariedade de condições sanitárias desses países. (VERONENSIS, 1997; SANTOS e SOARES, 2008; COURA, 2008). Dessa forma este projeto tem como objetivo estudar a imunomodulação das citocinas na presença de *E. histolytica* em fagócitos do sangue humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

CEP: 78.698-000

UF: MT

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

Telefone: (66)3402-1121

E-mail: marlyaugusta@yahoo.com.br

Página 01 de 03

Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT

CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA – CUA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, da pesquisa “**IMUNOMODULAÇÃO POR CITOCINAS DE CÉLULAS SANGUÍNEAS NA PRESENÇA DE *E. histolytica***”. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não terá nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que recebe assistência. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller- UFMT- pelo telefone (65) 36157254. O objetivo deste estudo é **avaliar o comportamento do protozoário frente à ação dos fagócitos modulados por citocinas**. Os riscos relacionados com sua participação na pesquisa são mínimos, devido à pequena quantidade de material a ser colhido, com técnica adequada por profissionais devidamente habilitados e com materiais descartáveis. Os dados pessoais referentes à pessoa serão confidenciais e garantimos o sigilo de sua participação durante toda pesquisa, inclusive na divulgação da mesma. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia desse termo onde tem o nome, telefone e endereço do pesquisador responsável, para que você possa localizá-lo a qualquer tempo. Lucélia Campelo De Albuquerque Moraes, biomédica, nº cel. 66 9206-9537, e-mail: luceliacampelo@ufmt.br ou Prof. Dr. Adenilda Cristina Honorio Franca UFMT/ Barra do Garças - 3402-1118; e-mail: adenildachf@gmail.com. Considerando os dados acima, **CONFIRMO** estar sendo informada por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa e em caso de divulgação por foto e/ou vídeo **AUTORIZO** a publicação. Eu (nome do participante)....., idade:.....sexo:.....Naturalidade:.....portador(a) do documento RG N°:.....declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador principal

Data (Cidade/dia mês e ano) _____ de _____ de 2013

Anexo 3 – E-mail de submissão

30/01/2015

Gmail - Article processing charge for manuscript submitted to Parasites & Vectors



Adenilda Cristina Honorio França <adenildachf@gmail.com>

Article processing charge for manuscript submitted to Parasites & Vectors

1 mensagem

BioMed Central Accounts <payment@biomedcentral.com>

28 de setembro de 2014 21:33

Responder a: BioMed Central Accounts <payment@biomedcentral.com>

Para: adenildachf@gmail.com

MS: 1687958121144241

The effect of IFN-gamma and TGF-beta in the functional activity of mononuclear cells in the presence of Entamoeba histolytica

Lucelia CA Moraes Eduardo L França Rafael S Pessoa Danny LG Fagundes Mara G Hernandes Victor P Ribeiro Maria A Gomes and Adenilda C Honorio-França
Parasites & Vectors

Dear Prof Honorio-França

Thank you for your recent submission to Parasites & Vectors. I would like to update you regarding your status with respect to the article processing charge that is normally due if a manuscript is accepted.

You have agreed to pay an article processing charge of GBP 1205.00/USD 2050.00/EUR 1525.00 if your manuscript is accepted.

Since you are based in Brazil you will be charged the price of GBP 1205.00.

Submissions from EU countries are subject to VAT at 20.0%.

Payment will become due if your manuscript is accepted for publication by the editors. We allow payment by credit card or invoice. Invoice payments are subject to an administrative charge of GBP 50.00/EUR 55.00/USD 75.00. Payments via the online credit card system will also produce an invoice/receipt that can be used for your records and will avoid the GBP 50 administration fee. The article processing charge must be paid before the manuscript will be published.

Kind regards

BioMed Central Accounts Team
236 Gray's Inn Road
London
WC1X 8HB
Tel: +44 (0) 20 3182 2009
e-mail: payment@biomedcentral.com

Anexo 4 - Comprovante

BioMed Central | My manuscripts

Page 1 of 1



My manuscripts

As an author

Submitted manuscripts

The effect of IFN-gamma and TGF-beta in the functional activity of mononuclear cells in the presence of Entamoeba histolytica

Revise

Journal: Parasites & Vectors

Manuscript ID: 1687958121144241

Submitted: 29 September 2014

Peer review status: Under review

<http://www.biomedcentral.com/my/manuscripts>

16/1/2015

Anexo 5 – Artigo

The effect of IFN- γ and TGF- β in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*

Lucélia Campelo Albuquerque Moraes- Post-Graduate Program of Parasitology of Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - luceliaufmt@gmail.com

Eduardo Luzia Franca - Post- Graduate Program in Basic and Applications of Immunology and Parasitology of Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - dr.eduardo.franca@gmail.com

Rafael Souza Pessoa - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - faelpessoa@gmail.com

Danny Laura Gomes Fagundes - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - dannyLauraagf@hotmail.com

Mara Gil Hernandes – Post-Graduate Program of Parasitology of Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - botoaraguaia@gmail.com

Victor Pena Ribeiro - Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil - luceliacampelo@ig.com.br

Maria Aparecida Gomes - Post-Graduate Program of Parasitology of Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil – mgomes@icb.ufmg.br

Adenilda Cristina Honorio-França - Post- Graduate Program in Basic and Applications of Immunology and Parasitology of Institute of Biological and Health Science - Federal University of Mato Grosso – Barra do Garças – MT, Brazil . adenildachf@gmail.com

Corresponding author: AC Honorio-França

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde –UFMT – Barra do Garças– MT

Rodovia BR070, Km 5 s/nº, Barra do Garças– MT, Brazil. Telephone number: 55-66340121121; Fax number: 55-6634021117 CEP: 78698-000 e-mail: adenildachf@gmail.com

ABSTRACT

Background: *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) causes amoebiasis, which is a disease with significant morbidity and mortality. Phagocytic cells and cytokines appear to be important in amoebiasis, but very little is known about the influence of these cells and cytokines in protozoan infections. The aim of this study was to analyze the supernatant of cultures of MN cells with *E. histolytica* to determine: 1) the levels of the cytokines IFN- γ and TGF- β , and 2) the amoebicidal activity of MN cells after incubation with cytokines.

Methods: Blood samples were collected from 30 volunteer donors. The cytokine levels in mononuclear (MN) cells culture supernatants, superoxide release, leukophagocytosis, amoebicide activity, intracellular calcium release and apoptosis were analyzed..

Results: IFN- γ and TGF- β levels were measured in cells–trophozoite culture supernatants. MN cells, independently of cytokines, in the presence of ameba increase the superoxide release. In the absence of cytokines, the ingestion of leukocytes by amoebae was higher, whereas in the presence of both cytokines, this ingestion was reduced. MN cells treated with cytokines exhibited a higher amoebicide and apoptosis indexes. The incubation of cytokines increases the intracellular calcium release.

Conclusions: These results suggest that cytokines play a beneficial role for the host by activating MN cells against *E. histolytica*. The increased death of amoebae during the leukophagocytosis suggests that both cytokines (IFN- γ and TGF- β) can modulate the functional activity of MN cells and that these cytokines probably are important in the control of amoebic infections.

Key Words: Leukophagocytosis, amoebicide activity, cytokines, MN cells, *Entamoeba histolytica*.

BACKGROUND

Amoebiasis is considered the second leading cause of death worldwide due to parasitic diseases, causing approximately 40 to 100 000 deaths per year [1]. The etiologic agent is a protozoan *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) that colonizes human intestines and presents two evolutionary forms: the cyst and trophozoite [2]. Infections are usually asymptomatic, but in approximately 10% of cases, the trophozoites penetrate the gut tissue, initiate hemorrhagic colitis and induce amoebic abscesses [3].

Acute amoebiasis lesions are characterized by the presence of inflammatory cells that are recruited by proinflammatory signals produced by epithelial cells and other host cells. Proinflammatory cytokines are responsible for the recruitment of neutrophils [4] and the release of inflammatory mediators that promote the migration of neutrophils and macrophages [5,6].

Neutrophils and macrophages are immune cells involved in phagocytosis, which serves as a major mechanism for the destruction of microorganisms beginning with the adhesion of these immune cells to the cell membrane. This interaction can be enhanced by hormonal and immunological factors [7,8,9,10,11,12].

However, few studies have evaluated the interaction between amoebae and phagocytes. It is known that *E. histolytica* is capable of inhibiting the production of active oxygen metabolites by monocytes [10], which probably contribute to the evasion of this parasite during leukophagocytosis.

The identification of mediators involved in leukocyte activation during infection by *E. histolytica* are of fundamental importance for understanding host responses in amoebiasis. Cellular interactions and cytokines have been reported during amoebic infections, and cytokines have been shown to be able to regulate monocyte function and increase the activity of amoebicides [13,14,15].

Experimental studies have demonstrated that macrophages isolated from liver abscesses are refractory to activation by IFN- γ [16]. The anergy of these cells appears to be related to the suppression of Th1 cytokine production [TNF- α and IFN- γ] without interfering with the production of Th2 cytokines [IL-4 and IL-5]. IFN- γ and TGF- β appear to be important for the activation of macrophages and the destruction of *E. histolytica* [17].

Despite advances in studies that have demonstrated the pathophysiological mechanisms of amoebiasis, the role of cellular immunity and their interactions with cytokines in this disease is unclear. The present study analyzed the supernatant of cultures of MN cells with *E. histolytica* to determine: 1) the levels of the cytokines IFN- γ and TGF- β ; and 2) the amoebicidal activity of MN cells after incubation with cytokines.

METHODS

Ethics Statement

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee of Araguaia University Center, and all of the subjects gave written informed consent before entering the experimental protocol.

Blood Sampling and MN Cell Separation

Blood samples (10 mL) were collected from 30 volunteer donors in tubes with anticoagulant. The samples were centrifuged at 160 x g for 15 min to separate the plasma from the cells. Cells were separated over a Ficoll-Paque gradient (Pharmacia, Uppsala, Sweden); producing preparations of 95% pure mononuclear cells as analyzed by light microscopy. Purified mononuclear cells were resuspended independently in serum-free 199 medium at a final concentration of 2×10^6 cells mL⁻¹. The cells were used immediately for superoxide release, leukophagocytosis, amoebicide activity, intracellular calcium release and apoptosis assays.

Entamoeba histolytica Strain

Trophozoites of the virulent strain of *E. histolytica* HM1:IMSS were grown axenically in a TYI-S-33 medium. Parasites were maintained with thrice-weekly sub-cultures, assuring their use during the exponential growth phase [10].

Amoebas from axenic cultures were centrifuged at 200 x g in individual tubes, washed twice in PBS (*phosphate buffered saline* – pH 7.2) and adjusted to 4×10^4 amoebae/mL.

Cultures of MN cells and *E. histolytica*

After separation of MN cells were centrifuged and the resuspended in RPMI culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells (2×10^6 cells/mL) were incubated with *E. histolytica* (4×10^4 parasites / mL) for 2 at 37°C with 5% CO₂. After this period, the cultures were centrifuged for 10 min at 160 x g, and the supernatant was reserved for cytokine quantification.

Cytokine dosage by ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

IFN- γ concentrations in the supernatant of cultures of MN cells with *E. histolytica* were determined by an ELISA kit from Bio Legend® Legend Max™ (San Diego, USA), and TGF- β concentrations were analyzed using an ELISA kit from Enzo® Life Sciences (United Kingdom). The reaction rates were measured by absorbance in a spectrophotometer with a 450 nm filter. The results were calculated using the standard curve and shown in pg/dl.

Treatment of MN cells with cytokines

To assess the effect of cytokines (IFN- γ and TGF- β) on superoxide anion release, leukophagocytosis, amoebicidal activity, intracellular calcium release and apoptosis, MN cells (2×10^6 cells/mL) were incubated with 5 μ L of cytokines (Sigma ST Louis, USA, final concentration 100 ng/mL) [17] for 1 hour at 37°C. The MN cells were then washed once with 199 medium at 4°C and immediately used in the assays. A control was performed with only 199 medium.

Release of superoxide anion

Superoxide release was determined by cytochrome C (Sigma, ST Louis, USA) reduction [19]. Briefly, mononuclear MN cells and *E. histolytica* trophozoites were mixed at a ratio of 1:2 and incubated for 2 hours for leukophagocytosis. The suspensions (MN cells and ameba) were then resuspended in PBS containing 2.6 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and cytochrome C (Sigma,

ST Louis, USA; 2 mg/mL). The suspensions (100 µL) were incubated for 60 min at 37°C on culture plates. The reaction rates were measured by absorbance at 550 nm, and the results were expressed as nmol/O². All experiments were performed in duplicate.

Amoebicide Assay

Cellular viability, leukophagocytosis and microbicidal activity were evaluated by the acridine orange (Acros organics, New Jesse, USA) method [8]. Equal volumes of parasite (4x10⁴ parasites/mL) and MN cell (2x10⁶ cells/mL) were incubated at 37°C for 30 min under continuous shaking. Leukophagocytosis was stopped by incubation in ice. The suspensions were centrifuged twice (160 x g, 10 min, 4°C). The suspension was resuspended in serum-free 199 medium and centrifuged. The supernatant was discarded, and the sediment dyed with 200 µL of acridine orange (Sigma, ST Louis, USA; 14.4 g/L) for 1 min. The sediment was resuspended in cold 199 medium and washed twice. Cellular viability, phagocytosis and death of trophozoites and MN cells were determined by fluorescence microscopy at 400x and 1000x magnification. One hundred amoebas were counted per slide.

The viability index was calculated by counting the number of orange-stained (dead) and green-stained [live] cells out of 100. Leukophagocytosis was considered positive when the trophozoite contained internalized MN cells. The amoebicide index is calculated as the ratio between orange-stained (dead) and green-stained (live) amoeba x 100 [12]. All experiments were performed in duplicate.

Apoptosis assay

Annexin V staining were used to assess apoptosis. Untreated cells were used as negative control and cells treated with staurosporin [Sigma ST Louis, USA -20] were used to induce apoptosis, as positive control. Controls and treated MN cells with cytokines and incubated with *E. histolytica* were resuspended in 500 µL of binding buffer containing 5 µL of annexin V-FITC (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Alexis TM, San Diego, USA) and then incubated for

10 min. at room temperature. Fluorescence of the cells were analyzed by flow cytometry (FACS Calibur system - BD, San Jose, USA).

Intracellular Ca²⁺ release determination

We performed fluorescence staining on the FACS Calibur (BD San Jose, USA) to assess intracellular Ca²⁺ release in MN cells [21]. Cells were loaded with the fluorescent radiometric calcium indicator Fluo3-Acetoxymethyl (Fluo3-AM– Sigma ST Louis, USA). Cell suspensions, pre-treated or not with 5 µL of cytokines (Sigma, final concentration of 100 ng/mL), were mixed and incubated at 37°C for 30 min under continuous stirring. Suspensions were centrifuged twice (160 x g, 10 min, 4°C) and resuspended in PBS containing BSA (5 mg/mL). This suspension was incubated with 5 µL of Fluo-3 (1µg/mL) for 30 min at 37°C. After incubation, MN cells were washed twice in PBS containing BSA (5 mg/mL; 160 x g, 10 min, 4°C) and then analyzed by flow cytometry (FACS Calibur system - BD, San Jose, USA). Fluo-3 was detected at 530/30 nm filter for intracellular Ca²⁺. The rate of intracellular Ca²⁺ release was expressed as the geometric mean fluorescence intensity of Fluo-3.

Statistical analysis

Data were expressed as the mean ± standard deviation (SD). Using analysis of variance (ANOVA), statistically significant differences were evaluated for the superoxide release anion, phagocytosis, amoebicide index and intracellular Ca²⁺ release in the presence or absence of cytokines, and the differences were considered statistically significant for p-values less than 0.05.

RESULTS

MN cell and amoeba viability were more than 90% independent of culture time [Table 1]. IFN-γ and TGF-β levels in supernatant in cultures of MN cells and *E. histolytica* are displayed in Table 1. The presence of both cytokines was observed in the supernatant of cultures of MN cells and trophozoites [Table 1].

MN cells had spontaneous superoxide release after 2 hours of incubation. MN cells, independently of cytokines, showed the highest superoxide release when exposed to the parasite [Table 2].

An analysis of the ingestion of MN cells by amoebae in the absence of cytokines revealed a higher phagocytosis index after 2 hours of incubation. In the presence of cytokines, was observed a lower ingestion of MN cells by amoebae. No difference in the ingestion of MN cells by the amoebae were observed for cytokines IFN- γ and TGF- β [Figure 1A].

In general, in the absence of cytokines, were observed a low percentage of dead amoebae during MN cells internalization. In the presence of cytokines, was observed an increase in the percentage of dead amoebae during MN cells internalization. MN cells treated with cytokines exhibited a higher amoebicide index. The highest amoebicidal activity was observed in MN cells treated with TGF- β [Figure 1B].

To evaluate the apoptosis induced by the interaction of MN cells and ameba, the annexin V assay was performed by flow cytometry [Figure 3]. The interaction of MN cells and ameba showed death of these cells. In the presence of cytokines, an increase in the percentage of dead cells. The highest apoptosis index were observed when the MN cells were treated with TGF- β and incubated with the *E. histolytica* [Figure 2].

MN cells exhibited intracellular Ca²⁺ release. In the presence of TGF- β intracellular Ca²⁺ release was increased, but INF- γ , did not change intracellular Ca²⁺ release [Figure 3 - A and B].

DISCUSSION

The present study describes IFN- γ and TGF- β levels in the supernatant of MN cells and *E. histolytica* cultures and how these cytokines affect the functional activity of MN cells when in presence of this parasite. Using an in vitro model of amebiasis we demonstrated that stimulation of MN cells with cytokines decreased the leukophagocytosis, increased the amoebicidal activity and induce death cells by apoptosis.

Several factors affect cytokine production, especially infections by protozoa [22]. In this study, MN cells and *E. histolytica* cocultures affected the levels of IFN- γ and TGF- β because the presence of virulent *E. histolytica* increased the cytokine levels. A number of studies have shown

that virulent *E. histolytica* is associated with the excessive release of proinflammatory cytokines. The supernatant of tissues cultured with *E. histolytica* has increased cytokine levels in the presence of the virulent strain but not with the non-virulent strain [23]. Cytokines have been shown to exert profound effects on the biological signaling and regulation of important physiological processes [24]. Cytokines may also be related to phagocyte activation and the production of reactive oxygen species [24].

A number of mechanisms possibly contribute to the formation of these reactive oxygen-free radicals. It has been shown that during protozoan infections there is an active participation of the metabolites of oxygen in the production of free radicals [9, 25,26]. For protection against *E. histolytica* infection, reactive oxygen species [ROS] are important, studies have shown that ROS are able to kill trophozoites and that highly virulent strains are less susceptible to ROS [27,28].

In the present study, the cytokines tested modulated superoxide release. MN cells increased superoxide release in the presence of *E. histolytica*. Similar results of superoxide anion were obtained during interactions of MN cells and amoeba in the presence of hormones [10], suggesting that these interactions are dependent of immunomodulatory agents.

The functional activity of phagocytes has been assessed during amoeba interactions [10, 29], and phagocytosis has been shown to play an important role in *E. histolytica* pathogenicity. The phagocytic capacity of amoebae are thought to involve leukophagocytosis because amoebae are constantly in contact with leukocytes in vivo and must be able to destroy them to survive [10].

The identification of the substances involved in leukocyte activation during amoeba-leukocyte interactions could help to direct the appropriate therapeutic use of these substances in amoebiasis. Here, we evaluated the action of cytokines during leukophagocytosis performed by *E. histolytica* trophozoites. MN cells in the presence of both IFN- γ and TGF- β decreased the cell-ingesting capacity of amoebae.

Phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes, with the production of active oxygen metabolites such as free radicals, make up an important defense mechanism against a number of bacterial [30,9], fungal [31]and protozoal infections [10]. Cytokines such as IFN- γ primarily act on monocytes/macrophages by activating their phagocytic and microbicidal abilities [32].

IFN- γ appears to provide protection against amoebiasis through its ability to activate neutrophils and macrophages to kill the parasite. MN cells stimulated with soluble amoebic extract and IFN- γ have shown an increased production of IFN- γ , associated with reduced diarrhea in amoebiasis patients [33].

Classical studies involving amoebae and leukocytes [34,35] have shown that virulent strains of amoebae are lethal to leukocytes, which lose their motility and are then phagocytosed and killed by the amoebae.

Interestingly, in this study, MN cells exposed to *E. histolytica* and stimulated by IFN- γ and TGF- β showed a decrease in leukophagocytosis but an increase in their amoebicide activity and higher apoptosis index. Studies have related that this increase in microbicidal activity is crucial for the immune response of the host against intestinal amoebiasis. The functional activity modulated by IFN- γ and TGF- β has also been reported for other infections [18].

However, studies support the notion that *Entamoeba histolytica* directly triggers host cell apoptosis on contact and shows that host cell apoptosis facilitates *Entamoeba histolytica* infection in the gut [36]. Interesting that in this study, the high apoptosis rates were accompanied by high index of amoeba death after interactions with MN cells stimulated by cytokines.

These results suggest that cytokines plays a beneficial role for the host by activating MN cells against *E. histolytica*. In addition, higher levels of superoxide were measured during interactions in the presence of IFN- γ and TGF- β , which correlates with higher microbicidal leukocyte activity.

Cytokine production may be associated with a number of processes such as alterations in intracellular Ca²⁺ by phagocytes [18]. In the present study, TGF- β increased intracellular Ca²⁺ release in MN cells. The literature has demonstrated that increased superoxide release modifies the response of intracellular Ca²⁺ and the phosphorylation events during oxidative metabolism [37] and in response to hormones [11,20] and cytokines [18]. It may have a direct effect on MN cells by increasing intracellular calcium release. Here, the increase in superoxide release by MN cells in the presence of cytokines altered the levels of intracellular Ca²⁺ and promoted the amoebicidal activity of these cells.

Considering that this parasite lives in the gut with constant contact with immunological factors of mucosal and the that the TGF- β is important mediators of mucosal more study can be addressed to clarify the mechanisms involved in host interaction and amoeba..

CONCLUSION

In conclusion, the increased death of amoebae during leukophagocytosis suggests that both cytokines [IFN- γ and TGF- β] can modulate the functional activity of MN cells and that these cytokines may play a beneficial role in the control of amoebic infections.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are very grateful to João da Costa Viana for technical assistance. This work was supported by Conselho Nacional de Pesquisa [CNPq] and DINTER Program in Parasitology UFMT/UFMG - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES - Brazil.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest and non-financial competing interests regarding the publication of this article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LCA Moraes carried out the assay, participated in the sequence alignment, and drafted the manuscript.

RS. Pessoa participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript.

DLG Fagundes participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript.

MG. Hernandez participated in the collect of samples, carried out the assays and help to draft the manuscript.

VP. Ribeiro participated in the collect of samples, carried out the assays.

MA. Gomes participated in the design of the study and helped to draft the manuscript.

EL França participated in the design of the study and coordination and helped to draft the manuscript.

AC Honorio-França carried out the assay, conceived of the study, carried out the assays and participated in its design and coordination and help to draft the manuscript.

REFERENCES

1- Ximénez CL, Morán P, Rojas L, Valadez A, Gómez A. **Reassessment of the epidemiology of amebiasis: state of the art.** *Infect Genet Evol* 2009, **9**:1023-32.

2- Hewitson JP, Maizels RM. **Vaccination against helminthic parasite infections.** *Expert Rev Vaccines* 2014, **4**:473-487.

3- Schmid-Hempel P. **Parasite immune evasion: a momentous molecular war.** *Trends Ecol Evol* 2008, **23**: 318-26.

4- Baxt LA, Rastew E, Bracha R, Mirelman D, Singh U. **Down regulation of an *Entamoeba histolytica* rhomboid protease reveals roles in regulating parasite adhesion and phagocytosis.** *Eukaryot Cell* 2010, **8**: 1283-1293.

5- Zhang Z, Mahajan S, Zhang X, Stanley SL. **Tumor necrosis factor alpha is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestinal xenograft model of disease.** *Infect Immun* 2003, **71**: 5355–5359.

6- Honorio-França AC, Launay P, Carneiro-Sampaio MMS, Monteiro RC. **Colostrual neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate non inflammatory properties of secretory IgA.** *J Leuk Biol* 2001,**69**: 289-296.

- 7- França-Botelho AC, França EL, Honório-França AC, Gomes MA, Costa-Cruz JM. **Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostr al leucocytes.** *Acta Paediatr* 2006, **95**: 438-443.
- 8- França EL, Morceli G, Fagundes DLG, Rudge MVC, Calderon IMP, Honorio-França AC. **Secretary IgA Fc α receptor interaction modulating phagocytosis and microbicidal activity by phagocytes in human colostrum of diabetics.** *APMIS* 2011, **119**: 710-719.
- 9- França EL, Vieira EL Morceli G, Fagundes DLG, Rudge MVC, Calderon IMP, Honório-França AC. **Transfer of Maternal Immunity to Newborns of Diabetic Mothers.** *Clin Develop Immunol* 2012, **2012**:ID 928187.
- 10- França-Botelho AC, França JL, Oliveira FMS, França EL, Honório-França AC, Caliari MV, Gomes MA. **Melatonin reduces the severity of experimental amoebiasis.** *Parasit Vectors* 2011, **4**: e62.
- 11- Morceli G, Honório-França AC, Fagundes DLG, Calderon IMP, França EL. **Antioxidant Effect of Melatonin on the Functional Activity of Colostral Phagocytes in Diabetic Women.** *PLoS ONE* 2013, **8**: e56915.
- 12- França EL, Bittencourt RV, Fujimori M, Morais TC, Calderon IMP, Honório-França AC. **Human colostr al phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant.** *J Microbiol, Immunol Infect*, 2011, **44**: 1-7.
- 13- Seydel KB, Smith SJ, Stanley SL Jr. **Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease.** *Infect. Immun.* 2000, **68**: 400–402.
- 14- Lotter H, Helk E, Bernin H, Jacobs T, Prehn C, Adamski J, González-Roldán N, Holst O, Tannich E. **Testosterone Increases Susceptibility to Amebic Liver Abscess in Mice and**

- Mediates Inhibition of IFN γ Secretion in Natural Killer T Cells.** *PLoS ONE* 2013, **8**: e55694.
- 15- Gordon S, Martinez FO. **Alternative activation of macrophages: mechanism and functions.** *Immunity* 2010, **32**: 593–604.
- 16- Guo X, Barroso L, Lyerly DM, Petri WA, Houpt ER. **CD4+ and CD8+ T cell- and IL-17-mediated Protection against *Entamoeba histolytica* Induced by a Recombinant.** *Vaccine* 2011, **29**: 772–777.
- 17- Rafiei A, Ajami A, Hajilooi M, Etemadi A. **Th-1/Th-2 cytokine pattern in human amoebic colitis.** *Pak J Biol Sci* 2009, **15**:1376-1380.
- 18- Fagundes DLG, França EL, Morceli G, Rudge MVC, Calderon IMP, Honorio-França AC. **The Role of Cytokines in the Functional Activity of Phagocytes in Blood and Colostrum of Diabetic Mothers.** *Clin Develop Immunol*, 2013, **2013**: ID 590190.
- 19- Honorio-França AC, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. **Colostrum mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostrum IgA.** *Scand J Immunol* 1997, **46**: 59–66.
- 20- PUNDT, N.; PETERS, M. A.; WUNRAU, C. et al. Susceptibility of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to FasL- and TRAIL-induced apoptosis is cell cycle-dependent. *Arthritis Research & Therapy*, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2009.
- 21- Fagundes DLG, França EL, Hara CCP, Honorio-França AC. **Immunomodulatory effects of poly (ethylene glycol) microspheres adsorbed with cortisol on activity of colostrum phagocytes.** *Int J Pharmacol* 2012, **8**: 510-518.
- 22- Campbell, D., and Chadee, K. **Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: modulation of cell-mediated immune response.** *Parasitol Today* 1997, **13**: 184–190.
- 23- Bansal V, Costantini T, Kroll L, Peterson C, Loomis W, Eliceiri B, Baird A, Wolf P,

Coimbra R. Traumatic brain injury and intestinal dysfunction: uncovering the neuro-enteric axis. *J Neurotrauma* 2009, **8**: 1353-9.

24- Séguin R , Mann BJ, Keller K, Chadee K. **The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide.** *Infect Immun* 1997, **7**: 2522–2527

25- França EL, Feliciano ND, Silva KA, Ferrari CKB, Honório-França AC. **Modulatory Role of Melatonin on Superoxide Release by Spleen Macrophages Isolated from Alloxan-Induced Diabetic Rats.** *Bratisl Med J* 2009, **110**: 517-522.

26- Botelho ACF, França JL, França EL, Honório-França AC, Busatti HGNO, Gomes MA. **Relationship between oxidative stress production and virulence capacity of *Entamoeba* strains.** *J Parasitol* 2010, **5**: 139-147.

27- Richard J, Pearson, Morf L, Singh U. **Regulation of H₂O₂ Stress-responsive Genes through a Novel Transcription Factor in the Protozoan Pathogen *Entamoeba histolytica*.** *J Biol Chem* 2013, **6**:4462-4474.

28- Ghadirian E, Somerfield SD, Kongshavn PA. **Susceptibility of *Entamoeba histolytica* to oxidants.** *Infect Immun* 1986, **51**: 263- 267.

29- Possamai MM, Honorio-França AC, Reinaque APB, França EL, Souto PCS. **Brazilian Propolis: A Natural Product That Improved the Fungicidal Activity by Blood Phagocytes.** *BioMed Res Int* 2013, **2013**: ID 541018.

30- Casares S, Richie TL (2011) Immune evasion by malaria parasites: a challenge for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 21: 321-330.

31- Pacheco-Yepey J, Jarillo-Luna RA, Gutierrez-Meza M, Abarca-Rojano E, Larsen

BA, Rodriguez RC. **Peroxynitrite and peroxiredoxin in the pathogenesis of experimental amebic liver abscess.** *Biomed Res Intern* 2014, **2014**:ID324230.

32- Dickson-Gonzalez SM, de Uribe ML, Rodriguez-Morales AJ. **Polymorphonuclear neutrophil infiltration intensity as consequence of *Entamoeba histolytica* density in amebic colitis.** *Surg Infect (Larchmt)* 2009, **2** 91-99.

33- Mortimer L, Chadee K. **The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*.** *Exp Parasitol* 2010, **126**:366-80.

34- Lin JY, Seguin R, Keller K, Chadee K. **Tumor necrosis factor alpha augments nitric oxide-dependent macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* by enhanced expression of the nitric oxide synthase gene.** *Infect Immun* 1994, **62**: 1534–1541.

35- Sanchez-Guillen MC, Perez-Fuentes R, Salgado-Rosas H, Ruiz-Argüelles A, Ackers J, Shire A, Talamas-Rohana P. . **Differentiation of *Entamoeba histolytica*/*Entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**: 731–737.

36- Becker SM, Cho KN, Guo X, Fendig K, Oosman MN, Whitehead R, Cohn SM, Houpt ER. **Epithelial Cell Apoptosis Facilitates *Entamoeba histolytica* Infection in the Gut.** *Am J Pathol* 2010, **176**: 1316-1322.

37- Carrichon L, PicciocchiA, Debeurme F, Defendi A, Beaumel S. **Characterization of superoxide overproduction by the D-LoopNox4-Nox2 cytochrome b558 in phagocytes-differential sensitivity to calcium and phosphorylation events.** *Bioch Biophys Acta* 2011, **1808**: 78-90.

Table 1– Mean (\pm SD) of MN cells viability, *E. histolytica* viability and cytokines (IFN- γ and TGF- β) concentrations in cultures of mononuclear cells and *E. histolytica*.

Parameter	
Mononuclear phagocytes viability (%)	96.4±2.0
<i>E. histolytica</i> viability (%)	95.7±1.7
IFN- γ (pg/ml)	6.22±0.36
TGF- β (pg/ml)	17.01±2.21

Table 2 – Superoxide release by mononuclear cells at different incubation times (mean \pm SD, N=10 in each treatment).

Groups	Superoxide Release (nmol)
MN Cells	3.6 \pm 0.4
MN Cells + <i>E.histolytica</i>	8.6 \pm 0.5*
MN Cells + <i>E.</i> <i>histolytica</i> +IFN- γ	9.3 \pm 0.9 *
MN Cells+ <i>E.</i> <i>histolytica</i> +TGF- β	8.2 \pm 0.8 *

Mononuclear cells were treated or not with cytokines, in the presence or absence of *E. histolytica*. * indicates statistically significant differences between MN cells treated or not with cytokines and incubated with parasites and the control (without parasite).

Legends

Figure 1. Leukophagocytosis (A) and Amoebicide index (B) by MN cells (mean \pm SD, N=10 in each treatment), determined by the acridine orange method. MN cells were incubated with *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) in the presence of gamma interferon (IFN- γ) and transforming growth factor β (TGF- β). *indicates statistically significant differences from the 199 medium and cytokines.

Figure 2. Apoptosis by Annexin-V assay in MN cells and *E. histolytica*. Results are expressed as the mean and standard error of six independent experiments. MN cells were incubated with *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) in the presence of gamma interferon (IFN- γ) and transforming growth factor β (TGF- β). *indicates statistically significant differences between MN cells incubated with cytokines and *E. histolytica* and the control (only MN cells).

Figure 3. Intracellular Ca²⁺ release (A) by mononuclear (MN) cells indicated by geometric mean fluorescence intensity of Fluo-3. MN cells were pre-incubated or not with cytokines. Intracellular Ca²⁺ release (B) after 2 hours of incubations. *indicates statistically significant differences between MN cells incubated with cytokines and the control [PBS). Cells were stained with Fluo-3 (Fluo3-Acetoxymethyl), and immunofluorescence analyses were carried out by flow cytometry [FACScalibur, Becton Dickinson, USA).

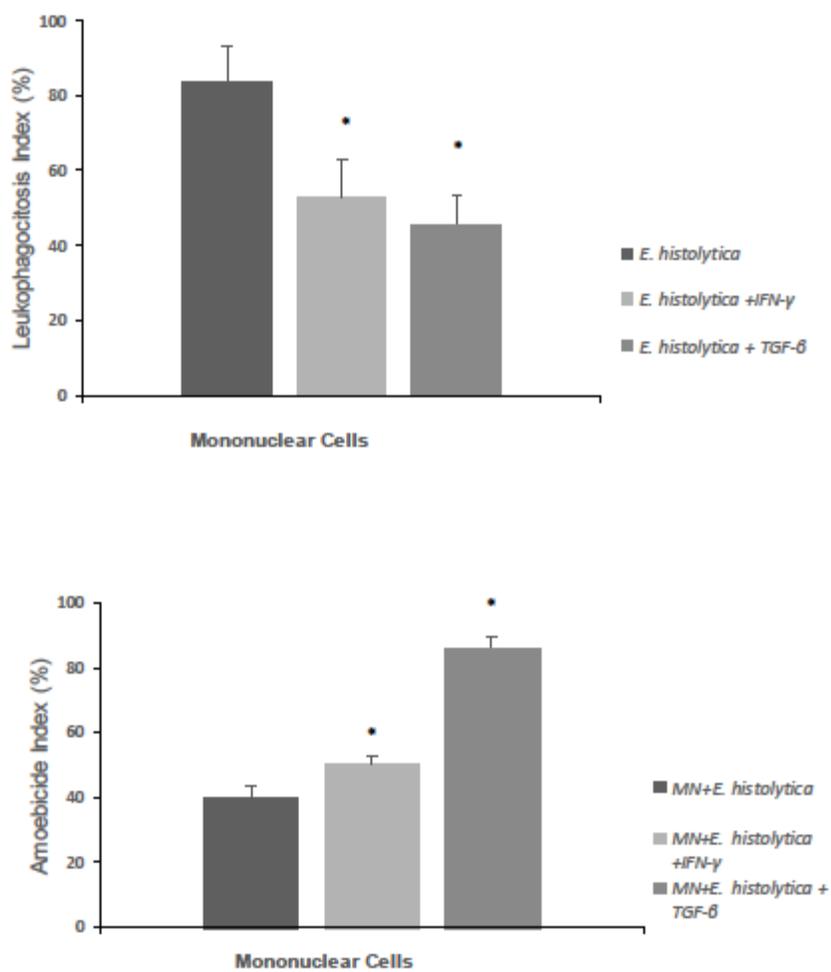


Figure 1.

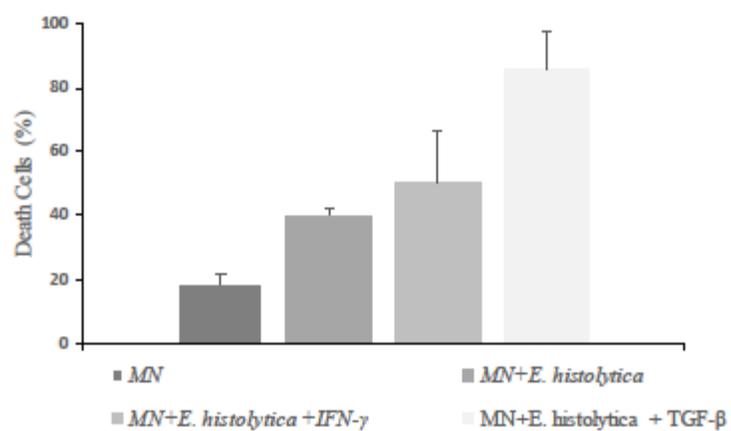


Figure 2.

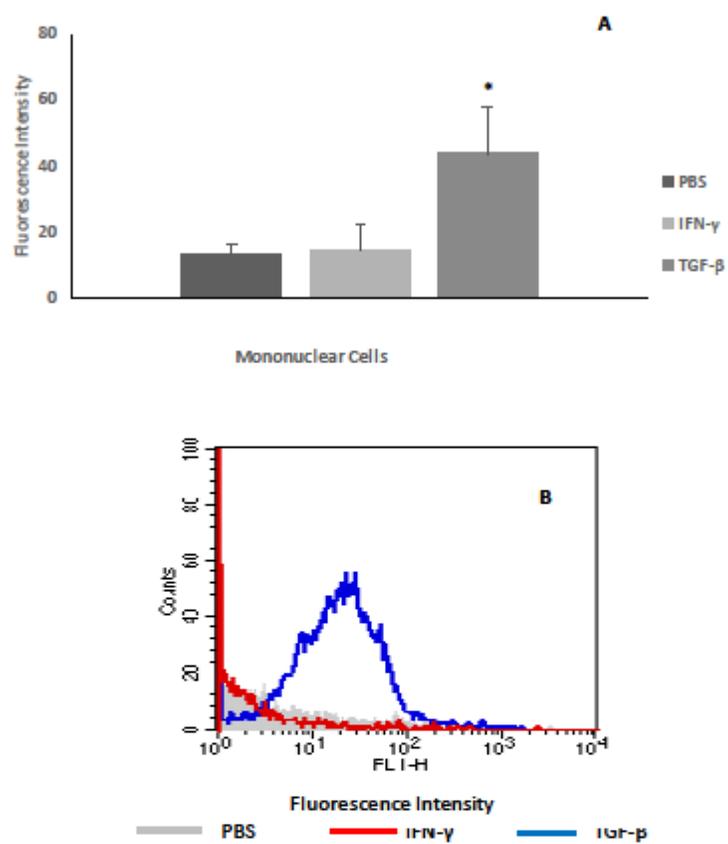


Figure 3.