

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina

**INFLUÊNCIA DA *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR TYPHIMURIUM
SOBRE A VIRULÊNCIA DA *ENTAMOEBAS DISPAR* E DA *ENTAMOEBAS
HISTOLYTICA IN VITRO* E NA COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL.**

Fabício Marcus Silva Oliveira

Belo Horizonte
2016

Fabrcio Marcus Silva Oliveira

**INFLUÊNCIA DA *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR TYPHIMURIUM
SOBRE A VIRULÊNCIA DA *ENTAMOEBAS DISPAR* E DA *ENTAMOEBAS
HISTOLYTICA IN VITRO* E NA COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL.**

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

Área de Concentração: Patologia Investigativa

Orientador: Prof. Marcelo Vidigal Caliari
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Profa. Maria Aparecida Gomes
Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2016

- OL48i Oliveira, Fabrício Marcus Silva.
Influência da Salmonella Enterica Sorovar Typhimurium sobre a virulência da Entamoeba Dispar e da Entamoeba Histolytica in Vitro e na Colite Amebiana Experimental [manuscrito]. / Fabrício Marcus Silva Oliveira. - - Belo Horizonte: 2016.
150f.: il.
Orientador (a): Marcelo Vidigal Caliarí.
Coorientador (a): Maria Aparecida Gomes.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Entamoeba. 2. Entamoeba Histolytica. 3. Fatores de Virulência. 4. Salmonella typhimurium. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Caliarí, Marcelo Vidigal. II. Gomes, Maria Aparecida. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QW 730

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e, executado nos seguintes Laboratórios do ICB/UFMG:

- Laboratório de Amebíase/Departamento de Parasitologia (ICB/UFMG).
- Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios/Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG).
- Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas/Departamento de Biologia Geral (ICB/UFMG).
- Laboratório de Protozooses/Departamento de Patologia Geral (ICB/UFMG).
- Laboratório de Técnicas Histológicas/Departamento de Patologia Geral (ICB/UFMG).

Agradecimentos

A Deus, por permitir e ter me dado força para chegar até aqui.

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari, pela oportunidade, confiança, amizade, paciência e ensinamentos em todos esses anos.

A Prof^a. Maria Aparecida Gomes, pela sua grandiosa co-orientação e por ter aberto as portas de seu laboratório para mim.

A Prof.^a Elisabeth Neumann e seu orientando Mario, pela bondosa colaboração.

Ao Prof. Álvaro Cantini Nunes e seu orientando Sávio por todo o apoio, atenção e ajuda a mim dispensados.

A Ana Cláudia, por ter me auxiliado em meus experimentos, demonstrando comprometimento e aptidão.

A Luana, Cezar e Isabela pelo grande incentivo e por tornar nossos dias de trabalho mais contentes.

Ao Joãozinho e Edna, por todo o auxílio no laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia ICB- UFMG.

Aos amigos do laboratório de Amebíase pelo apoio e excelente convívio.

A equipe do laboratório de Técnicas Histológicas do Departamento de Patologia Geral do ICB-UFMG.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Patologia, pelo conhecimento transmitido.

As funcionárias da secretaria do departamento de Patologia.

Aos amigos da pós-graduação.

Ao CNPq e Fapemig pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!!!

Dedico esse trabalho.
Aqueles que terão minha gratidão eterna.
Deus e meus pais João e Arlete.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 <i>Entamoeba dispar</i>	4
1.2 Patogênese.....	10
1.3 Mecanismos de escape e imunidade.....	12
1.4 <i>Salmonella Enterica</i> subspécie <i>Enterica</i> sorovar Typhimurium.....	15
2. JUSTIFICATIVA.....	18
3. OBJETIVO GERAL.....	18
3.1 Objetivos específicos.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Microorganismos	19
4.1.1 Bactéria <i>Salmonella Entérica</i> sorovar Typhimurium	19
4.1.2 Cepas de <i>Entamoeba dispar</i> e de <i>Entamoeba histolytica</i>	19
4.2 Padronização da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos amebianos.....	20
4.3 Cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos amebianos em associação com <i>S. Typhimurium</i>	21
4.4 Determinação da expressão de RNAm dos fatores de virulência em trofozoítos de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> , isolados da cultura.....	22
4.4.1 Extração do RNA total dos fatores de virulência em trofozoítos de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> isolados da cultura.....	22
4.4.2 Produção de cDNA a partir do RNA extraído dos fatores de virulência de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> , isolados da cultura.....	23

4.6. Experimento de co-infecção.....	24
4.6.1 Intubação intragástrica com bactéria e inóculo intracecal de trofozoítos.....	25
4.7 Necropsia e coleta de material.....	26
4.8 Análise quantitativa da área das lesões cecais (erosões e úlceras).....	27
4.9 Reações imuno-histoquímicas para IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC-2.....	28
4.9.1 Análise quantitativa da expressão de IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC2 e, da celularidade da lâmina própria.....	29
4.10 Análises estatísticas.....	30
5. RESULTADOS.....	34
5.1 Efeito da associação <i>in vitro</i> da <i>S. Typhimurium</i> sobre cepas de <i>E. dispar</i> e de <i>E. histolytica</i> na expressão de fatores de virulência amebianos.....	34
5.2 Análises histopatológica e quantitativa da área de lesão cecal de ratos infectados com <i>E. dispar</i> ou <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> ..	48
5.3 Análise histopatológica e quantitativa do infiltrado inflamatório.....	58
5.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de IL-1 α	62
5.5 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de IL-4.....	69
5.6 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de COX-2.....	72
5.7 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de MUC-2.....	79
6. DISCUSSÃO.....	84
7. CONCLUSÕES.....	94
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
9. ANEXOS.....	120
9.1 Artigo publicado.....	120
9.2 Artigo submetido.....	126
9.3 Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	149
9.4 Ata da Defesa de Tese.....	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental.....	29
Figura 2: Ceco de ratos não infectados (CTRL) e de ratos infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ST).....	50
Figura 3: Ceco de ratos infectados com a cepa MCR de <i>E. dispar</i> (MCR) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (MCR-ST).....	51
Figura 4: Ceco de ratos infectados com a cepa ADO de <i>E. dispar</i> (ADO) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ADO-ST).....	52
Figura 5: Ceco de ratos infectados com a cepa VEJ de <i>E. dispar</i> (VEJ) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (VEJ-ST).....	53
Figura 6: Ceco de ratos infectados com a cepa EGGp de <i>E. histolytica</i> (EGGp) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (EGGp-ST).....	54
Figura 7: Ceco de ratos infectados com a cepa EGGa de <i>E. histolytica</i> (EGGa) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (EGGa-ST).....	55
Figura 8: Ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>E. dispar</i> (MCR, ADO, VEJ) ou <i>E. histolytica</i> (EGGp, EGGa) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST).....	60
Figura 9: Ceco de rato infectado com a cepa ADO de <i>E. dispar</i> . Controles negativos das reações imuno-histoquímicas para IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC-2.....	65
Figura 10: Reação imuno-histoquímica para IL-1 α no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>E. dispar</i> (MCR, ADO, VEJ) ou <i>E. histolytica</i> (EGGp, EGGa) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST).....	66
Figura 11: Reação imuno-histoquímica para IL-4 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>E. dispar</i> (MCR, ADO, VEJ) ou <i>E. histolytica</i> (EGGp, EGGa) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST).....	71
Figura 12: Reação imuno-histoquímica para COX-2 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com <i>S. Typhimurium</i> (ST), <i>E. dispar</i> (MCR, ADO, VEJ) ou <i>E. histolytica</i> (EGGp, EGGa) e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST).....	76

Figura 13: Reação imuno-histoquímica para MUC-2 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST)..... 81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação do efeito dos genes normalizadores (actin e GAPDH) sobre os grupos experimentais.....	35
Gráfico 2: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. dispar</i> pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de amebaporo A (Ap-A).....	37
Gráfico 3: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de amebaporo A (Ap-A).....	38
Gráfico 4: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. dispar</i> pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 2 (CP-2).....	40
Gráfico 5: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 2 (CP-2).....	41
Gráfico 6: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. dispar</i> pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 5 (CP-5).....	43
Gráfico 7: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 5 (CP-5).....	44
Gráfico 8: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. dispar</i> pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de lectina específica para Gal/GalNAC.....	46
Gráfico 9: Avaliação do efeito da associação de <i>S. Typhimurium</i> na cultura <i>in vitro</i> de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de lectina específica para Gal/GalNAC.....	47
Gráfico 10: Análise quantitativa da área de lesão cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	56
Gráfico 11: Análise quantitativa da área de lesão cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	57
Gráfico 12: Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i> ...	61
Gráfico 13: Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	62

Gráfico 14: Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	66
Gráfico 15: Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	67
Gráfico 16: Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	71
Gráfico 17: Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	72
Gráfico 18: Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	76
Gráfico 19: Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	77
Gráfico 20: Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. dispar</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	82
Gráfico 21: Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de <i>E. histolytica</i> e co-infectados com <i>S. Typhimurium</i>	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volume dos reagentes usados no tratamento com a Turbo DNase I...	23
Tabela 2: Mistura de reagentes utilizados para confecção do cDNA.....	24
Tabela 3: Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica dos fatores de virulência amebianos obtidos em amostras de culturas de trofozoítos de cepas <i>E. dispar</i> / <i>E. histolytica</i>	25

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- AHA - Abscesso hepático amebiano
- APC's - Células apresentadoras de antígenos
- BHI - *Brain Heart Infusion*
- COX - Cicloxigenase
- COX-2 - Cicloxigenase -2
- COX-1 - Cicloxigenase -1
- Cp - ponto de cruzamento
- CP's - Cisteína-proteinases
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- DEPC - dietilpirocarbonato
- EGGa - EGG axênica
- EGGp - EGG polixênica
- E. dispar* - *Entamoeba dispar*
- E. histolytica* - *Entamoeba histolytica*
- Gal/GalNAC - Galactose e N-acetil galactosamina
- HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
- H&E - hematoxilina e eosina
- IgA - Imunoglobulina A
- IgG - Imunoglobulina G
- LPPG - Lipofosfopeptidoglicano
- LPG - Lipofosfoglicano
- LPS - Lipopolisacarídeo
- MDCK - Madin-Darby Canine Kidney
- MEC - Matriz extracelular
- MLIF - Inibitório da locomoção de monócitos
- MUC-2 - Mucina 2
- NFκ-B - Fator nuclear potenciador de células B ativadas
- NK T - Natural *Killer* T
- nm - nanômetros
- NRE - nível relativo de expressão
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

S. Typhimurium - *Salmonella Enterica* sorovar Typhimurium

PGs - prostaglandinas

Th 1 - T *helper* tipo 1

Th 2 - T *helper* tipo 2

UFC - Unidades formadoras de Colônias

RESUMO

A amebíase é a protozoose mais grave que atinge o ser humano e a segunda maior causa de morte entre as doenças parasitárias, superada apenas pela malária. Considera-se que apenas a *Entamoeba histolytica* é capaz de penetrar nos tecidos e produzir amebíase invasiva. Contudo, alguns estudos têm demonstrado que a *Entamoeba dispar* é capaz de produzir lesões em modelos experimentais. Com o objetivo de determinar se as bactérias enteropatogênicas contribuem para aumentar a expressão gênica dos fatores de virulência amebianos, bem como de induzir lesões mais intensas, propusemos avaliar a influência da bactéria *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium sobre a virulência da *Entamoeba dispar* e da *Entamoeba histolytica* em trofozoítos isolados da cultura *in vitro* e avaliar patologicamente a colite amebiana, em ratos infectados com trofozoítos amebianos e co-infectados com *S. Typhimurium*. As cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e, EGGp e EGGa de *E. histolytica* foram cultivadas separadamente e, associadas ou não à bactéria *S. Typhimurium*. Em seguida foi realizada a extração do RNA dessas culturas para produção de cDNA dos fatores de virulência de *E. histolytica* e *E. dispar* e quantificada a expressão dos fatores de virulência. Para a indução de colite amebiana, 8 ratos wistar (*Rattus norvegicus*) por grupo, previamente submetidos a uma intubação intragástrica da *S. Typhimurium*, foram inoculados pela via intracecal com 5×10^5 trofozoítos. Como grupos controles, 40 ratos foram somente inoculados com trofozoítos amebianos das cepas de *Entamoeba* estudadas. Outros 16 ratos constituíram os grupos controles somente infectados com *S. Typhimurium* e controle não infectado. Todos os ratos foram sacrificados 7 dias após a infecção amebiana para a coleta do ceco, confecção de lâminas histológicas para análise histopatológica e morfométrica e, para a realização de reações imuno-histoquímicas anti IL-1 α , IL4, COX-2 e MUC-2. Nosso estudo permitiu observar que a co-cultura de *E. dispar* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão dos fatores de virulência amebianos amebaporo A, cisteína proteinase-5 e lectina ligante de Galactose e N-Acetilgalactosamina. Ao contrário do observado por outros autores, as cepas de *E. dispar* por nós estudadas foram capazes de expressar o fator de virulência amebiano cisteína proteinase-5. A co-cultura de *E. histolytica* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão do fator de virulência amebiano amebaporo A. Também verificamos que na maioria dos grupos analisados, a associação *in vivo* da *E. dispar* ou da *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a intensidade da colite amebiana ulcerativa, também acompanhada pelo aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios e da redução da expressão de IL-4. Além disso, na maioria dos grupos analisados, a associação *in vivo* da *E. dispar* ou da *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão da mucina MUC-2, em virtude da maior intensidade da agressão à mucosa colônica. Diante dos resultados obtidos, concluímos que a interação da *S. Typhimurium* com a *E. dispar* e a *E. histolytica* foi capaz de aumentar a virulência destas espécies de amebas levando à colite ulcerativa amebiana de maior intensidade.

Palavras Chaves: *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, fatores de virulência, *S. Typhimurium*, co-cultura.

ABSTRACT

Amebiasis is the most serious protozoa that hits the human intestine and is the second-leading cause of death among parasitic diseases, surpassed only by malaria. It is considered that only *Entamoeba histolytica* is able to penetrate tissues and produce invasive amebiasis. However, some studies have shown that *Entamoeba dispar* is capable of producing lesions in experimental models. In order to determine if the enteropathogenic bacteria contribute to increase the gene expression of amebic virulence factors, as well as to induce more intense lesions, we propose to evaluate the influence of *Salmonella Enterica* sorovar Typhimurium on the virulence of *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica* in trophozoites isolated from the in vitro culture and pathologically evaluate amoebic colitis in rats infected with amoebic trophozoites and co-infected with *S. typhimurium*. *E. dispar*, MCR, ADO and VEJ strains from *E. dispar* and, EGGp and EGGa from *E. histolytica* were cultured separately and associated or not with the *S. Typhimurium* bacterium. Then, the RNA extraction from these cultures was carried out to produce cDNA from the virulence factors of *E. histolytica* and *E. dispar* and quantified the expression of the virulence factors. For the induction of amoebic colitis, 8 wistar rats (*Rattus norvegicus*) per group, previously submitted to an intragastric intubation of *S. Typhimurium*, were inoculated by the intracecal route with 5×10^5 trophozoites. As control groups, 40 rats were only inoculated with amebian trophozoites from the *Entamoeba* strains studied. Another 16 rats were the control groups infected only with *S. typhimurium* and uninfected control. All rats were sacrificed 7 days after amebic infection to collect cecum, histological slides for histopathological and morphometric analysis, and for the immunohistochemical anti-IL-1 α , IL4, COX-2 and MUC-2 immunohistochemical reactions. Our study showed that the co-culture of *E. dispar* with the *S. typhimurium* enterobacterium was able to increase the expression of amebaporo A, cysteine proteinase-5 and Galactose-binding lectin and N-acetylgalactosamine virulence factors. Contrary to what was observed by other authors, *E. dispar* strains studied by us were able to express the amoebic virulence factor cysteine proteinase-5. The co-culture of *E. histolytica* with the *S. typhimurium* enterobacterium was able to increase the expression of the amebian virulence factor amebaporo A. We also found that in the majority of the groups analyzed, the in vivo association of *E. dispar* or *E. histolytica* with *S. typhimurium* was able to increase the intensity of ulcerative amebic colitis, also accompanied by increased expression of pro-inflammatory mediators and reduced IL-4 expression. In addition, in most of the analyzed groups, the in vivo association of *E. dispar* or *E. histolytica* with *S. typhimurium* was able to increase MUC-2 mucin expression, due to the greater intensity of aggression to the colonic mucosa. In view of the results obtained, we conclude that the interaction of *S. Typhimurium* with *E. dispar* and *E. histolytica* was able to increase the virulence of these species of amoebae leading to ulcerative amebic colitis of greater intensity.

Keywords: *E. histolytica*, *E. dispar*, virulence factors, *S. Typhimurium*, co-culture.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Entamoeba histolytica (*E. histolytica*) é um dos sete parasitos do gênero *Entamoeba* capazes de infectar seres humanos. Ao contrário de *E. polecki* e *E. histolytica*, as demais espécies, *Entamoeba dispar* (*E. dispar*), *Entamoeba coli*, *E. gingivalis*, *E. moshkovski* e *E. hartmanni* não são capazes de produzir doença no homem (Clark; Diamond, 1991; Garcia; Bruckner, 1998; Walsh, 1986). *E. histolytica* é o protozoário causador da amebíase, doença que produz cerca de 50 milhões de casos por ano em todo o mundo e mata anualmente cerca de 100 mil pessoas (OMS, 1997). A amebíase é a protozoose mais grave que atinge o ser humano e a segunda maior causa de morte entre as doenças parasitárias, superada apenas pela malária (Stanley, 2003). *E. histolytica* causa duas grandes síndromes clínicas, a colite amebiana e abscesso hepático amebiano (AHA) (Hira *et al*, 2001; Stanley; Reed, 2001).

A importância da amebíase decorre da mesma apresentar uma distribuição geográfica de amplitude mundial, elevada incidência e acompanhar-se, em certa proporção dos casos, de quadros patológicos graves, eventualmente fatais, permanecendo como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento apesar das medicações existentes (Huston, 2004).

E. histolytica foi descrita pela primeira vez há mais de 130 anos na Rússia por Lösch em 1875, citado por Jackson (1998) e denominada formalmente em 1903 por Schaudinn, citado por Clark (1998). Na tentativa de explicar a grande prevalência de indivíduos infectados assintomáticos, foi proposta por Brumpt em 1925, citado por Walsh (1986) a Teoria Dualista que afirmava a existência de duas amebas. Embora morfologicamente idênticas estas amebas eram biologicamente distintas (Walsh, 1986). Considerou-se, no entanto, que apenas *E. histolytica* deveria ser capaz de penetrar nos tecidos e produzir amebíase invasiva. Posteriormente, através da eletroforese de isoenzimas, a *E. histolytica* foi separada em dois grupos distintos: patogênica e não patogênica como afirmou Brumpt citado por Sargeant *et al.* (1978). A espécie não patogênica poderia então realmente explicar a prevalência de assintomáticos, em torno de 90%, dos infectados no mundo (Walsh, 1986). A prova definitiva que estes dois grupos representavam espécies distintas foi conseguida através da análise do DNA (Tannich *et al*, 1989), sendo a nova espécie de ameba denominada *E. dispar* (Brumpt, 1925). O perfil de isoenzimas, as diferenças nas sequências gênicas e a utilização de

anticorpos monoclonais reforçaram a existência das duas espécies que foram oficialmente reconhecidas pela OMS (WHO, 1997).

Esta parasitose apresenta ampla distribuição geográfica com alta prevalência em regiões tropicais, onde as condições de higiene e educação sanitária são consideradas deficientes. Hoje estima-se que, *E. histolytica* e *E. dispar* infectem cerca de 12% da população mundial, sendo muito mais comum a infecção pela última, podendo a *E. histolytica* representar 1% deste universo (WHO, 1997).

A taxa de mortalidade estimada para a forma invasiva da doença é de aproximadamente 100.000 mortes por ano. A maioria das mortes ocorre em consequência de graves complicações associadas com a doença invasiva intestinal ou extra-intestinal (Clark; Diamond, 1993).

Vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados para estimar a incidência e a prevalência da amebíase no Brasil. Na maioria dos estudos, os métodos parasitológicos de fezes são os mais utilizados, embora não sejam capazes de diferenciar a *E. histolytica* (patogênica) da *E. dispar*, (não patogênica) (Cardoso *et al*, 1995; Tavares-Dias; Grandini, 1999; Prado *et al*, 2001). A prevalência desta protozoose é bastante variável (5,6% a 40,0%) nas diferentes regiões do país, assim como sua patogenicidade e virulência (Cunha *et al*, 1991).

O homem e alguns primatas talvez sejam os únicos hospedeiros naturais que podem ser parasitados pela *E. histolytica*, que possui um ciclo de vida simples e apenas duas formas do parasito, os cistos e os trofozoítos amebóides. A infecção geralmente inicia com a ingestão de alimento e/ou água contaminados com cistos de *E. histolytica* proveniente de fezes humanas ou através do contato fecal-oral direto (Reeves, 1984).

A maioria das infecções intestinais é assintomática, resultando em encistamento e excreção de cistos (Haque *et al*, 2002). Os cistos de *E. histolytica* são arredondados, possuem 10-15 µm de diâmetro, são envoltos por uma parede de quitina, contêm quatro núcleos, glicogênio e conjuntos ribossomais chamados de corpos cromatóides. Depois de ingeridos pelo hospedeiro, sobrevivem à acidez estomacal e chegam ao intestino delgado através dos movimentos peristálticos (Reeves, 1984). Uma vez na porção final do íleo ou cólon, os cistos perdem a sua parede de quitina e sofrem divisão nuclear e citoplasmática gerando 8 trofozoítos. Cistos maduros podem sobreviver por semanas no solo ou na água, os quais são as maiores fontes de infecção (Kretschmer, 1990). Ao

contrário dos cistos inertes, trofozoítos de *E. histolytica* são pleomórficos e altamente móveis, com diâmetro variando de 10-50 µm. (Reeves, 1984). Os trofozoítos reproduzem por divisão binária, e encistam dentro do cólon, completando o ciclo de vida que se finaliza com a excreção dos cistos infecciosos para o ambiente junto às fezes. Os sinais que levam ao encistamento ou desencistamento não são bem compreendidos (Eichinger, 2001).

Os trofozoítos de *E. histolytica* habitam o intestino grosso de hospedeiros infectados, podendo ocasionalmente penetrar através da mucosa intestinal, atingir a circulação sanguínea e disseminar para outros órgãos. Os fatores que desencadeiam essa invasão ainda não são completamente conhecidos, bem como as formas extra-intestinais (Haque *et al*, 2003).

Os grupos de alto risco para infecção por *E. histolytica* incluem viajantes, imigrantes, trabalhadores sazonais, indivíduos imunocomprometidos, indivíduos em instituições mentais e homens homossexuais sexualmente ativos (Allason-Jones *et al*, 1986). Há maior susceptibilidade para o desenvolvimento das formas invasivas da amebíase nos indivíduos imunossuprimidos, em particular naqueles com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Kershenovich; Corona, 2008; Moran *et al*, 2005).

A disenteria, colite fulminante, apendicite amebiana e o ameboma do cólon são as quatro manifestações clínicas da amebíase intestinal invasiva, que se correlacionam, com achados histopatológicos específicos. Disenterias constituem 90% dos casos de amebíase intestinal. A colite amebiana aguda dura entre 1 a 4 semanas e, os pacientes queixam-se de dor abdominal leve a moderada, com aproximadamente seis episódios de diarreia por dia, quantidade escassa de fezes, muco abundante com ou sem sangue. São pouco frequentes a febre, taquicardia e hipotensão. Esta síndrome resolve dentro de poucos dias com apropriado tratamento anti-amebiano (Kretschmer, 1990).

De acordo com o estabelecido pela OMS, o tratamento da amebíase deverá ser adotado somente nos casos em que a *E. histolytica* for especificamente confirmada (WHO, 1997b). A droga de escolha para o tratamento da amebíase é o fármaco Metronidazol devido à sua potente ação amebicida, farmacocinética favorável, excelente biodisponibilidade e distribuição generalizada na parede do intestino e demais tecidos (Ayeh; Petri, 2002). Sem um tratamento adequado, a colite amebiana é

extremamente grave, podendo rapidamente desenvolver úlceras que podem coalescer e, por vezes, atingir o cólon por inteiro (Abd-Alla; Ravdin, 2002; Natarajan *et al*, 2000).

As disenterias podem evoluir para graves complicações intestinais como a perfuração do cólon, colite fulminante e ameboma. O ameboma é uma forma rara de lesão amebiana constituída por massa de tecido de granulação bem desenvolvido que pode obstruir o trato intestinal, tornando-se grave quando ocorre perfuração (Kretschmer, 1990).

O AHA é a forma mais frequente de amebíase extra-intestinal que acomete principalmente homens entre 18 a 50 anos de idade (Acuña-Soto *et al*, 2000; Katzentein *et al*, 1982;). A maioria dos estudos “*in vivo*” sobre amebíase tem sido realizada no modelo de abscesso hepático amebiano devido às dificuldades de reproduzir a colite amebiana experimental (Meerovitch; Chadee, 1998).

O uso de varias linhagens de roedores com diferentes susceptibilidades, especialmente camundongos, têm fornecido maiores informações sobre a patogênese da amebíase intestinal (Cieslak *et al*, 1992). Os camundongos não eram usados frequentemente como modelo para amebíase, pois foram considerados resistentes à infecção pela *E. histolytica* (Tsutsumi; Shibayama, 2006). Estudos posteriores usando dez diferentes linhagens de camundongos mostraram diferenças na susceptibilidade à infecção intestinal após inoculação com trofozoítos de cultura axênica, as linhagens C3H/HeCr, BALB/C, NZB/B1N, B10. A, DAB/2 e C57BL/6 foram susceptíveis e, as linhagens A/J, CE, DAB/1 e CD-1, foram considerados como resistentes (Ghadirian; Kongshavn, 1984). A cobaia também foi usada para o estudo de amebíase intestinal, havendo somente alguns relatos sobre a produção bem sucedida de úlcera amebiana utilizando trofozoítos de culturas axênicas neste modelo animal (Diamond *et al*, 1978). O rato tem sido utilizado como modelo experimental adequado para o desenvolvimento de amebíase intestinal, especialmente da linhagem *wistar*, por ser mais susceptível à manifestação da colite amebiana (Tsutsumi; Shibayama 2006; Neal, 1951).

1.1 *Entamoeba dispar*

A infecção por *E. dispar* resulta em colonização assintomática do intestino grosso sendo considerada não invasiva e está geralmente associada a casos assintomáticos ou sintomáticos de colite não disentérica (Costa *et al*, 2000).

Pesquisadores estudaram a ultraestrutura da *E. dispar* e da *E. histolytica* através de microscopia eletrônica e verificaram que os trofozoítos da *E. dispar* são mais alongados e, seus vacúolos citoplasmáticos têm uma distribuição irregular, sem formar grumos como na *E. histolytica*. O núcleo da *E. dispar* é alinhado por uma fina camada de grânulos densos distribuídos regularmente. Além disso, a *E. dispar* possui depósitos de glicogênio (Espinosa-Cantellano *et al*, 1998). Apesar de idênticas à microscopia óptica, esses resultados demonstraram que as duas espécies possuem algumas diferenças ultra estruturais.

Para diferenciar a infecção por *E. histolytica* ou *E. dispar* passou-se a utilizar a pesquisa de antígeno do parasito em amostras fecais (Haque *et al*, 2002) e a amplificação de segmentos gênicos não só em amostras fecais como também do abscesso hepático amebiano (Ali *et al*, 2005). Os levantamentos epidemiológicos têm mostrado que a maioria dos indivíduos assintomáticos infectados pelas duas espécies são colonizados pela *E. dispar*. Entretanto, em algumas regiões, é alta a prevalência de *E. histolytica* em indivíduos assintomáticos e em pacientes com diarreia (Haque *et al*, 2002; Gomes *et al*, 1999; Evangelopoulos *et al*, 2001). O estudo das variações genéticas em espécies de amebas fornece pistas importantes para explicar os diferentes aspectos clínicos da infecção por *E. histolytica* e permite o conhecimento da distribuição geográfica e a mobilidade das linhagens epidemiologicamente importantes.

Estudos sobre a epidemiologia da amebíase em áreas endêmicas têm utilizado abordagens moleculares para caracterizar as espécies prevalentes de Entamoeba na infecção humana (Gosh *et al*, 2000; Ramos *et al*, 2005). Estes estudos têm procurado correlacionar as diferentes espécies e subpopulações com o espectro diversificado das formas clínicas: (a) infecções sintomáticas (amebíase intestinal ou extra-intestinal) devido *E. histolytica*; (b) infecções assintomáticas por *E. dispar*; (c) infecções mistas assintomáticas causadas por *E. histolytica* e *E. dispar*; (d) Infecções assintomáticas provocadas por *E. histolytica* (Gosh *et al*, 2000; Ramos *et al*, 2005).

A pesquisa de antígeno fecal identificado por ELISA visando a lectina específica para Gal/GalNAC, a qual distingue a *E. histolytica* da *E. dispar*, constatou que a *E. dispar* acomete aproximadamente 95% das infecções assintomáticas previamente identificadas como sendo de *E. histolytica* em um cenário não endêmico (Pillai *et al*, 1999a). Entretanto, em algumas regiões, é alta a prevalência de *E. histolytica* em indivíduos assintomáticos e em pacientes com diarreia (Haque *et al*, 1997; Gomes *et al*,

1999; Evangelopoulos *et al*, 2001). O estudo de variações genéticas em espécies de amebas pode fornecer pistas importantes para explicar os diferentes aspectos clínicos da infecção por *E. histolytica* e permitir o conhecimento da distribuição geográfica e a mobilidade das linhagens epidemiologicamente importantes (Ximénez *et al*, 2009).

Ambas as espécies de *Entamoeba* têm quase o mesmo conjunto de genes que codificam os principais fatores de virulência. Considera-se a presença em *E. dispar* de moléculas importantes à patogenicidade da *E. histolytica*, como a lectina específica para Gal/GalNAC (Campos-Rodrigues; Jarillo-luna, 2005). A análise genética de *E. dispar* identificou pelo menos dois membros de cadeia pesada desta lectina de *E. histolytica* e quatro da cadeia leve (Dodson *et al*, 1997). A conformação diferenciada da lectina específica para Gal/GalNAC de *E. dispar* poderia explicar as reduzidas aderência e citotoxicidade já observadas *in vitro* e a menor virulência desta ameba em modelos animais (Pillai *et al*, 2001).

E. histolytica secreta cerca de 10 a 1.000 vezes mais cisteína proteases do que a *E. dispar*, sendo este um dos achados que sugerem ser *E. dispar* apenas um organismo comensal (North *et al*, 1990). A CP-5 (gene ID, EHI_168240) que é uma cisteína protease essencial para a degradação da mucina MUC2, é apenas um pseudogene em *E. dispar* (Willhoeft *et al*, 1999; Bruchhaus *et al*, 1996; Mortimer; Chadee, 2010).

Além disso, *E. dispar* é capaz de produzir amebaporos dos tipos A, B e C, com homologia de 95% em relação às produzidas pela *E. histolytica*. No entanto, a produção ocorre em menor concentração, cerca de um terço da que é observada na *E. histolytica* (Leippe, 1997). Estudos *in vitro* mostraram que a *E. dispar* utiliza amebaporos para destruir bactérias fagocitadas (Leippe, 1997). Além das diferenças de secreção de cisteína proteinases e amebaporos citados anteriormente, a *E. dispar* possui lipofosfopeptidoglicano (LPPG) ao invés de lipofosfoglicano (LPG) (Moody *et al*, 1997). Não há trabalhos confirmando os LPG's como agentes promotores de virulência na *E. histolytica* (Brattacharya *et al*, 1999). Também foi observado que ao contrário da *E. histolytica*, é ausente a secreção de fator inibitório da locomoção de monócitos (MLIF) pela *E. dispar*. Entretanto, este produto de secreção não impede totalmente a migração e, os macrófagos são encontrados normalmente no infiltrado inflamatório. Até mesmo é especulada sua participação no desenvolvimento das lesões na amebíase humana e experimental (Rico *et al*, 2003). Neste contexto, a similaridade morfológica

entre *E. histolytica* e *E. dispar* torna importante uma adequada diferenciação entre as duas espécies (Espinosa-Cantellano *et al*, 1998; Gomes *et al*, 1999).

E. histolytica não-patogênica (NP) era o termo usado para se referir à *E. dispar* antes de sua descrição como uma espécie distinta de *E. histolytica* (Diamond; Clark 1993). Os estudos experimentais envolvendo *E. histolytica* NP não conseguiram demonstrar sua capacidade em produzir lesões significativas em animais de laboratório (Chadee *et al*, 1985; Vohra *et al*, 1989). Também após a descrição de *E. dispar* as pesquisas experimentais continuaram demonstrando os mesmos resultados. Espinosa-Cantellano e colaboradores inocularam 5×10^5 e 5×10^6 trofozoítos de *E. dispar* em hamsters pela via intra-hepática. Sete dias após a infecção, os autores observaram apenas infiltrado inflamatório focal, sem a formação de necrose e granulomas (Espinosa-Cantellano *et al*, 1997). Tais achados, aliado às observações “*in vitro*” de que *E. dispar* secreta produtos tóxicos em menor quantidade e atividade do que a *E. histolytica*, reforçou a idéia de que a *E. dispar* seria apenas comensal, incapaz de gerar lesões humanas e experimentais. De fato, a cepa axênica SAW 760 de *E. dispar* produziu efeito citopático mais lento sobre células epiteliais MDCK quando comparado com a *E. histolytica* (Espinosa-Cantellano *et al*, 1998).

A prevalência de *E. dispar* não é conhecida. Especula-se que esta espécie seja responsável por grande maioria das infecções antes atribuídas à *E. histolytica*. Diferentes trabalhos dispersos têm demonstrado maior prevalência de *E. histolytica* em países em desenvolvimento, contudo, mesmo nestes países, é grande a prevalência de *E. dispar* (Acuna-Soto *et al*, 1993; Evangelopoulos *et al*, 2001; Guzmán *et al*, 2001; Rivero *et al*, 2009; Reyes; León, 2002; Ouattara *et al*, 2010; Hegazi *et al*, 2013; Rivera *et al*, 1998; Ramos *et al*, 2005; Leiva *et al*, 2006; Levecke *et al*, 2011; Stauffer *et al*, 2006).

No Brasil, a amebíase constitui importante causa de morbidade (Ferreira; Marçal 1997; Santos *et al*, 2005). *E. histolytica* é mais prevalente em Manaus, infectando 6,8% da população (Benetton *et al*, 2005); em Fortaleza, 14,9% da população de baixa renda (Braga *et al*, 2001), e, em Belém, 29,5% dos indivíduos residentes na região metropolitana (Silva *et al*, 2005). No restante do país, os estudos apontam uma maior prevalência da *E. dispar*, a exemplo de Pernambuco, Belo Horizonte (Minas Gerais) e em Salvador (Bahia) onde foi detectada somente a ocorrência de *E. dispar*. Nosso grupo tem encontrado em torno de 5% de infecções por *E. histolytica/E. dispar* em

comunidades da grande Belo Horizonte (Gil *et al*, 2013). Até o momento, 99% destas infecções representaram *E. dispar* (dados não publicados).

E. dispar é considerada não invasiva, portanto está relacionada às infecções assintomáticas. No Brasil, uma forma clínica muito frequente, é a colite não disentérica. Os isolados de ameba pertencentes a este quadro de infecção foram analisados por isoenzimas e PCR sendo identificados como *E. dispar*. Nosso grupo foi o primeiro a identificar *E. dispar* isolada de casos sintomáticos (Martinez *et al*, 1996; Gomes *et al*, 1997). As cepas isoladas destes casos, também foram capazes de infectar animais de experimentação. Conforme comentamos anteriormente, os primeiros estudos experimentais envolvendo a *E. histolytica* não-patogênica (*E. dispar*) não obtiveram sucesso em reproduzir as lesões amebianas. Contudo, a partir de 2000 começaram a ser publicados estudos utilizando cepas xênicas de *E. dispar* isoladas no Brasil que demonstraram resultados diferentes do observado em outros trabalhos. Cepas de *E. dispar* isoladas de pacientes residentes nas regiões norte e sudeste do Brasil e mantidas em cultura com bactérias oriunda da microbiota indígena intestinal do paciente, foram inoculadas em hamsters e ratos, respectivamente no fígado (5×10^4 trofozoítos) e no ceco (1×10^6 trofozoítos) (Gomes *et al*, 2000). Em todos estes animais foram encontradas lesões hepáticas e intestinais semelhantes às produzidas pela *E. histolytica*, bem como a presença de trofozoítos. O mesmo foi observado por Costa e colaboradores ao inocular no fígado de hamsters, 2.5×10^5 trofozoítos de outras cepas de *E. dispar* isoladas também no Brasil, de pacientes sintomáticos e assintomáticos (Costa *et al*, 2000). A inoculação da microbiota de cada cepa em hamsters controles não foi capaz de produzir lesões hepáticas ou produziu apenas discretas lesões purulentas, deixando claro que foram realmente os trofozoítos de *E. dispar* os responsáveis pelo desenvolvimento da necrose liquefativa. Ao contrário do uso de cepas xênicas, a utilização de cepa axênica (Espinosa-Cantellano *et al*, 1997) e monoxênica (Costa *et al*, 2000; Furst *et al*, 2002) de *E. dispar* falhou na produção do abscesso amebiano, demonstrando a importância da associação bacteriana para a aquisição de patogenicidade, por mecanismo ainda desconhecido. Recentemente, mais outros dois estudos descreveram o que tem sido observado desde o ano 2000. Assim como em relação à cepa MCR, o abscesso hepático amebiano experimental foi reproduzido em hamsters inoculados por cepas xênicas de *E. dispar* também isoladas de pacientes assintomáticos brasileiros (Dolabella *et al*, 2012; Guzmán-Silva *et al*, 2013).

Pesquisas sobre a diversidade genética da *E. histolytica* e da *E. dispar* em indivíduos com infecção assintomática ou com doença invasiva, mostram elevado polimorfismo de ambas espécies de *Entamoeba* (Gosh *et al*, 2000; Ramos *et al*, 2005). Evidências desta diversidade genética foram demonstradas através da observação de diferenças nos genótipos da *E. histolytica* isolada de amostras de fezes e de abscesso hepático amebiano obtidas a partir de um mesmo paciente (Ali *et al*, 2008). Outros autores também detectaram genótipos diferentes de trofozoítos de *E. histolytica* isolados a partir de dois abscessos hepáticos amebianos diferentes (Valenzuela *et al*, 2009). Por outro lado, a *E. dispar* já foi isolada de pacientes com colite sintomática não desintérica (Costa *et al*, 2000) e, sequências de DNA de *E. dispar* foram detectadas e genotipadas em amostras obtidas de pacientes com abscesso hepático amebiano, sugerindo que a *E. dispar* pode também estar envolvida no desenvolvimento de lesões no intestino grosso e fígado de seres humanos (Ximénez *et al*, 2010). Assim como determinadas cepas de *E. histolytica*, há cepas de *E. dispar* que também podem apresentar diferentes comportamentos biológicos, resultantes da variada diversidade genética (Costa *et al*, 2000).

Nossos estudos, bem como de outros autores, também têm demonstrado lesões hepáticas experimentais em hamsters inoculados com trofozoítos de *E. dispar* associados a flora intestinal original do hospedeiro (Costa *et al*, 2006; Costa *et al*, 2007; Costa *et al*, 2010a; Costa *et al*, 2010b; Costa *et al*, 2011; Furst *et al*, 2002). A observação de que estas lesões foram obtidas somente após a associação de bactérias com a *E. dispar*, sugere que as bactérias podem estar transferindo algum tipo de fator de virulência para os trofozoítos ou favorecendo de outra maneira o desenvolvimento destas lesões (Costa *et al*, 2006). A simbiose entre bactérias e *E. histolytica* e *E. dispar* pode modular modificações fenotípicas e propriedades de virulência das amebas (Bhattacharya *et al*, 1992; Costa *et al*, 2006; Shibayama *et al*, 2007).

Estudo recente demonstrou *in vitro* o aumento da virulência da cepa HM1:MSS de *E. histolytica* mediada pela presença de enterobactérias patogênicas. Neste estudo os pesquisadores observaram que a fagocitose de *Shigella dysenteriae* e de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) por trofozoítos de *E. histolytica*, aumentou o efeito citopático dos trofozoítos sobre as células epiteliais, bem como sobre a atividade de cisteína proteínases e a expressão de lectina específica para Gal/GalNAC. Os autores também sugerem que a infecção com enterobactérias pode tornar as células epiteliais do intestino

mais susceptíveis ao mecanismos de virulência de *E. histolytica* (Galvan-Moroyoki *et al*, 2008).

Apesar de *E. dispar* ser considerada comensal para os seres humanos, algumas evidências têm demonstrado que é necessário aprofundar os estudos à respeito do tema. *E. dispar* já foi isolada de pacientes com sintomas de colite não-disentérica (Martinez *et al*, 1996; Gomes *et al*, 1997), de paciente com colite disentérica (Graffeo *et al*, 2014) e, sequência de DNA de *E. dispar* foram detectadas e genotipadas em amostras obtidas de pacientes com abscesso hepático amebiano, sugerindo que a *E. dispar* pode também estar envolvida no desenvolvimento de lesões no intestino grosso e fígado de seres humanos (Ximénez *et al*, 2010).

1.2 Patogênese

Os trofozoítos de *E. histolytica* que hospedam o lúmen intestinal podem dar início à doença invasiva, ao prevalecerem condições favoráveis a sua patogenicidade. Estes trofozoítos invadem a camada epitelial e a lâmina própria da mucosa intestinal formando pequenos nódulos, como cabeça de alfinete, contendo um orifício central por onde eles penetram (Que; Reed, 1997). A invasão do epitélio intestinal é caracterizada por uma extensa degradação da matriz extracelular (MEC) ocasionada pela ação de proteases amebianas e fagocitose, evidenciada por células do hospedeiro danificadas em torno dos parasitos (Tavares *et al*, 2005). A mucosa é destruída, os trofozoítos de *E. histolytica* se disseminam no tecido, aprofundam a lesão e se deslocam longitudinalmente, produzindo uma zona de necrose liquefativa que conduz à formação de pequenas úlceras superficiais (Chadee; Meerovitch, 1985). A penetração profunda da parede intestinal, seguida por extensão lateral da lesão colônica, leva à formação de úlcera em forma de frasco ou botão de camisa, característica típica da amebíase intestinal, que eleva a possibilidade de disseminação extra-intestinal dos trofozoítos amebianos através da circulação sanguínea. Na medida em que a necrose progride na mucosa e submucosa, as úlceras aumentam de diâmetro, tornando-se confluentes e de limites irregulares (Huston, 2004). As lesões são encontradas com maior frequência no ceco, colón sigmóide e reto onde normalmente ocorre uma estase mais prolongada do conteúdo intestinal (Bekker-Mendez *et al*, 1997).

Os trofozoítos de *E. histolytica* são capazes de produzir diferentes moléculas relacionadas à indução direta ou indireta de dano tecidual à parede intestinal,

principalmente a lectina específica para resíduos de Galactose e N-acetil galactosamina (Gal/GalNAC), as cisteína proteinases (CP's), tais como a CP-2 e CP-5 e, as amebaporos, como as dos tipos A e C (Espinosa-Cantellano; Martínez-Palomo, 2000). Através destas moléculas, *E. histolytica* é capaz de destruir diferentes tipos celulares, tais como células do epitélio intestinal, eritrócitos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos (Burchard; Bilke, 1992; Burchard *et al*, 1992a; Guerrant *et al*, 1981).

A adesão dos trofozoítos ao muco colônico é fundamental para o início do processo de destruição da mucosa intestinal (Petri *et al*, 1987; Ravdin; Guerrant, 1982; Chadee; Meerovitch, 1984). Tal adesão ocorre principalmente através da interação da lectina amebiana específica para Gal/GalNAC com glicoconjugados do hospedeiro (Petri *et al*, 1987). A aderência mediada pela lectina é necessária para a lise das células do hospedeiro, uma vez que células de mamíferos deficientes em Gal/GalNAC foram resistentes às ações citotóxicas dos trofozoítos (Li *et al*, 1989; Ravdin *et al*, 1989).

As CP's são enzimas encontradas em diferentes organismos, que desempenham importante papel na patogenicidade da *E. histolytica*, como demonstrado em um grande número de estudos *in vitro* e *in vivo* (Ankri *et al*, 1999; Keene *et al*, 1990; Li *et al*, 1995; Reed *et al*, 1989; Stanley *et al*, 1995). Trofozoítos de *E. histolytica* com redução da expressão de CP's apresentaram capacidade diminuída de causar abscesso hepático em diferentes modelos animais (Ankri *et al*, 1999; Stanley *et al*, 1995; Bracha *et al*, 1999; Vines *et al*, 1998). As CP's digerem e prejudicam a síntese de Mucina 2 (MUC-2), que é o principal componente do muco intestinal, clivam o colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, eliminando obstáculos mecânicos para que os trofozoítos possam praticar a invasão tecidual (Que; Reed, 1997; Seydel *et al*, 1998). Experimentos *in vitro* demonstraram que o muco degradado apresenta menor eficiência no bloqueio da adesão amebiana às células do hospedeiro (Moncada *et al*, 2003). Além disso, camundongos C57BL/6 deficientes em IL-10 e infectados com *E. histolytica* apresentaram menor produção de MUC-2, reduzindo a barreira protetora do muco e aumentando a intensidade das lesões e o parasitismo (Hamano *et al*, 2006).

Nas vesículas dos lisossomos da *E. histolytica* é encontrada uma família de pequenas proteínas conhecidas como amebaporos, que exibem potente atividade antibacteriana e que são citotóxicas para células do hospedeiro através da formação de canais iônicos na membrana celular (Leippe, 1997). As amebaporos possuem homologia estrutural e funcional com a granulolisina e a NK-lisina, que são perforinas

produzidas respectivamente por linfócitos T citotóxicos e células natural killer, também capazes de formar poros na membrana celular (Leippe, 1995). Trofozoítos de *E. histolytica* deficientes da amebaporo isoforma A (AP-A), sofrem perda de sua virulência, demonstrando que esta proteína desempenha um papel importante na destruição das células do hospedeiro (Bracha *et al*, 1999; Bracha *et al*, 2003; Leippe *et al*, 1994a).

Além da necrose induzida diretamente pela ação dos produtos amebianos sobre a mucosa intestinal, a liberação de mediadores químicos da inflamação pelas células epiteliais normais e lesadas também colabora para a ampliação da inflamação da parede intestinal. Por exemplo, já foi demonstrado que infecção amebiana induz a expressão de Cicloxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente a produção de prostaglandinas pelas células epiteliais intestinais lesadas e não lesadas pelos trofozoítos, contribuindo para a ampliação do processo inflamatório na parede intestinal (William *et al*, 2001; Stanley, 2003). Também já foi observado, a capacidade dos trofozoítos em destruir leucócitos “*in vitro*” e a escassez de células inflamatórias nas proximidades das lesões amebianas sugerindo que a maioria dos leucócitos são destruídos pelo parasito, promovendo a liberação de produtos tóxicos e a ampliação da zona de necrose (Seydel *et al*, 1998).

1.3 Mecanismos de escape e imunidade

A mucosa intestinal é estruturalmente especializada para atuar como uma barreira imunológica contra a invasão de microorganismos. Esta proteção é garantida através da ação conjunta do epitélio prismático, das células produtoras de muco, células apresentadoras de antígenos (APC's), linfócitos e polimorfonucleares, bem como da IgA e de citocinas.

Alguns estudos sugerem que os principais mecanismos de resistência contra a infecção amebiana intestinal ocorrem nos primeiros dias de infecção mediados pela imunidade inata, independente da ativação de linfócitos (Burchard *et al*, 1993; Salata; Ravdin, 1986; Seydel *et al*, 1998). A mucosa do ceco e colón consiste de glândulas ou criptas tubulares, formadas principalmente por enterócitos e células caliciformes, responsáveis pela produção de muco constituído por mucinas altamente glicosiladas, que é a primeira barreira contra a adesão e invasão de parasitos. O muco impede o acesso das bactérias e toxinas ao epitélio e facilita sua remoção pelo fluxo intestinal, ao

mesmo tempo em que permite a colonização por membros da microbiota indígena. Tais mucinas funcionam como alvos da clivagem glicosídica promovida pelos trofozoítos durante a adesão e invasão (Tse; Chadee, 1992; Variyam, 2006). Nosso grupo de pesquisa também verificou que a barreira epitelial da mucosa, com sua espessura e produção de muco em quantidades normais, colaboraram para menores níveis de lesão e parasitismo em camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*. Já os camundongos com deficiência destes elementos, como o C57BL/6 CD1^{-/-}, que em condições normais atuam limitando a agressão da infecção em suas fases iniciais, exibiram com maior frequência úlceras e erosões cecais e, maior número de trofozoítos amebianos (Oliveira *et al*, 2012).

Alguns autores observaram que os neutrófilos são importantes na proteção contra os trofozoítos e no controle da expansão das lesões intestinais em camundongos CBA experimentalmente infectados (Asgharpour *et al*, 2005). Contudo, em camundongos BALB/c previamente tratados com anticorpo monoclonal anti-neutrófilo e inoculados com *E. histolytica* pela via intracecal, a intensidade das lesões foi a mesma quando comparada com os animais controles, demonstrando que os neutrófilos não foram fundamentais na imunidade contra os trofozoítos na amebíase intestinal (Rivero-Nava, 2002). Em contraste ao observado no intestino, foi verificado que os neutrófilos são importantes na patogênese da amebíase hepática, contribuindo tanto para destruir trofozoítos quanto para aumentar a área do AHA em camundongos (Velasquez *et al*, 1998; Pérez-Tamayo *et al*, 2006). Por outro lado, segundo certos autores, neutrófilos, que possuem diâmetro de 12-15 µm, não seriam capazes de fagocitar trofozoítos amebianos, cujo diâmetro varia de 20-40 µm (Campos-Rodríguez *et al*, 2016). Outro estudo mostrou que os neutrófilos não possuem papel benéfico ou protetor no AHA, mas que contribuem para o agravamento da lesão hepática, pois a formação do abscesso é acompanhada pela lise maciça de neutrófilos (Helk *et al*, 2013).

Também já foi demonstrado na resposta inflamatória contra *E. histolytica*, a participação das células Natural Killer T (NK T). Estudo envolvendo camundongos *knockout* para a molécula CD1 e, conseqüentemente com menor número de linfócitos NK T, são mais susceptíveis à infecção amebiana (Oliveira *et al*, 2012). Outro achado importante foi obtido pela identificação imuno-histoquímica e análise quantitativa dos trofozoítos de *E. histolytica*, cujo número no ceco foi significativamente superior nos camundongos com menor número de células NK T, quando comparado com os

camundongos C57BL/6 *wild-type* (Oliveira *et al*, 2012). Estes resultados demonstram que os linfócitos NK T são eficazes na resistência contra os trofozoítos na colite experimental amebiana, assim como são importantes no controle da colonização bacteriana no trato gastrointestinal de camundongos C57BL/6 (Nieuwenhuis *et al*, 2009).

O Sistema Complemento é um importante componente do sistema imunológico inato, envolvido com o desencadeamento da resposta inflamatória e com a destruição e remoção de parasitos (Bohson *et al*, 2007). Um dos mecanismos de escape da *E. histolytica* é a resistência à lise pelo Sistema Complemento, que é mediada também pela lectina Gal/GalNAC específica. Tal lectina amebiana possui um domínio com similaridade antigênica ao CD59, um antígeno leucocitário humano que impede a formação do complexo C5b-9 (Braga *et al*, 1992). Além da lectina específica para Gal/GalNAC, as moléculas glicosilfosfatidilinositol, lipofosfoglicano e proteofosfoglicano revestem os trofozoítos e funcionam como barreira mecânica contra a ativação e ação do sistema complemento (Stanley *et al*, 1992). As CP's degradam rapidamente as anafilatoxinas C3a e C5a do complemento, imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina G (IgG), bem como a pré interleucina 18 (pré IL-18) (Reed *et al*, 1995).

A infecção intestinal com a *E. histolytica* induz a uma resposta imune local com a produção de IgA detectável na mucosa, que é considerada a primeira linha de defesa específica contra a infecção amebiana (Carrero *et al*, 2007). Estudo recente demonstrou que indivíduos assintomáticos infectados com *E. histolytica* e outros portadores de AHA exibiram altos níveis séricos de IgG total e suas subclasses IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, bem como IgA, diferentemente do observado nos indivíduos infectados com *E. dispar*, que exibiram baixos níveis para tais imunoglobulinas (Bernin *et al*, 2014). Neste mesmo estudo também foi observado que mulheres assintomáticas infectadas com a *E. histolytica* exibiram maiores níveis de IgG1 do que homens assintomáticos infectados com *E. histolytica*, sugerindo que a resistência para AHA pode estar associada a mecanismos mediados pelo sistema complemento (Bernin *et al*, 2014).

Não está completamente esclarecido o papel desempenhado pelos leucócitos, citocinas e anticorpos na proteção contra a amebíase e no desenvolvimento das lesões amebianas (Jarillo-luna *et al*, 2002). As células epiteliais respondem à lectina específica para Gal/GalNAC de *E. histolytica* com um aumento na expressão de ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) das seguintes citocinas pró-inflamatórias: IL-2, IL-6, IL-8,

quimiocina ligante 3 (CCL3), quimiocina ligante 2 (CCL2), quimiocina ligante 5 (CCL5), oncogene relacionado ao crescimento (GRO- α) e fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (Sharma *et al*, 2005; Stanley, 2001).

Perfis elevados de citocinas T *helper* tipo 1 (Th1) foram relacionados a mecanismos eficientes de cura dos abscessos hepáticos em gerbils (Campbell; Chadee, 1997). Macrófagos isolados de abscessos hepáticos nas fases iniciais da infecção, quando estimulados com proteínas amebianas, produziram grandes concentrações de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Wang *et al*, 1992). Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos ativados após estimulação via IFN- γ destruíram mais eficazmente os trofozoítos através da produção de óxido nítrico (NO) (Lin; Chadee, 1992; Salata *et al*, 1985). A necessidade de ativação do macrófago sugere uma resposta Th1 secretora de IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Contudo, em estudos de colite amebiana experimental, animais deficientes em IL-12, IFN- γ e NO exibiram a mesma intensidade de parasitismo e inflamação encontrados nos animais *wild type*, demonstrando que a resposta Th1 não foi fundamental na resistência contra a infecção intestinal amebiana (Haupt, 2002).

1.4 *Salmonella enterica* subespécie *Enterica* sorovar Typhimurium

A *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) é uma das causas mais frequentes de gastroenterite em seres humanos. A *S. Typhimurium* é um membro da família de bactérias *Enterobacteriaceae*, um grande grupo de bactérias Gram-negativas, anaeróbicas facultativas, muitas das quais fazem parte da microbiota indígena do intestino dos vertebrados. Embora existam mais de 2.000 sorovar de *S. Typhimurium*, apenas algumas são comumente associados a três entidades diarreias em seres humanos: gastroenterite autolimitante, gastroenterite severa e febre tifóide (Ibarra; Steele-Mortimer, 2009).

Salmonellas são bactérias intracelulares facultativas capazes de infectar células fagocíticas e não fagocíticas *in vivo*. Após a colonização intestinal pela *Salmonella*, ocorre a invasão dos enterócitos, células M e células dendríticas (DCs) do epitélio intestinal. Posteriormente a *Salmonella* atinge a submucosa, podendo ser internalizada por macrófagos residentes e rapidamente disseminar para os linfonodos mesentéricos e o baço (Salcedo *et al*, 2001). A capacidade de a *Salmonella* sobreviver em uma

variedade de células hospedeiras é vital para o seu sucesso como um agente patogênico (Ibarra; Steele-Mortimer, 2009). A estratégia patogênica principal da *S. Typhimurium* é utilizar os seus fatores de virulência que provocam a inflamação intestinal aguda (Tsolis *et al*,1999).

Em modelos animais já foi observado que *S. Typhimurium* utiliza um Sistema de Secreção Tipo III (T3SS-1) que induz a inflamação intestinal (Barthel *et al*, 2003). A função principal do T3SS-1 é a secreção de proteínas efetoras, em células hospedeiras (Zhou *et al*,1999, 1999a). Cinco T3SS-1 efetores, denominados SipA, SopA, SopB, SopD e SopE2 agem em conjunto para provocar alterações na actina dos enterócitos, promovendo assim a invasão e inflamação intestinal epitelial (Friebel *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2002). A *S. Typhimurium* induz a ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) e do fator nuclear potenciador de células B ativadas (NFκ-B), bem como estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias em células cultivadas de um modo dependente de T3SS-1, sugerindo que o acesso citosólico pelo T3SS-1 inicia as respostas das células hospedeiras (Hobbie *et al*, 1997).

Vários mecanismos através dos quais o acesso citosólico pelo T3SS-1 pode induzir respostas inflamatórias têm sido propostos. Tais mecanismos têm em comum que o acesso citosólico pelo T3SS-1 é detectado pelos macrófagos através do reconhecimento citosólico de proteínas bacterianas translocadas, resultando em activação de caspase 1 e consequente activação proteolítica de interleucina-1β (IL-1β) e interleucina-18 (IL-18), duas citocinas pró-inflamatórias (Hoffmann *et al*, 2010).

As doenças diarréicas configuram um dos principais problemas que afetam a qualidade de vida das crianças nos países em desenvolvimento, implicando em uma carga considerável de morbimortalidade e, conseqüentemente, importantes demandas para a rede de serviços de saúde (Bern *et al*, 1993; UNICEF, 2005; Boschi-Pinto *et al*, 2008; WHO, 2008). A diarreia é um grave problema de saúde público, intimamente associado às condições de higiene e da água utilizada (Özkan *et al*, 2007). A transmissão de doenças infecciosas como a diarreia é um processo complexo, com muitos determinantes, ainda assim, sabe-se que 88% das mortes por diarreia são atribuídas à água não potável, saneamento inadequado e higiene precária (Trevett *et al*, 2005; UNICEF, 2009).

Segundo a OMS, a diarreia é a segunda maior causa de óbito na infância, representando em torno de 1,5 milhões de mortes anuais de crianças de até cinco anos

(UNICEF, 2009). Nos países em desenvolvimento, estima-se que 1,5% das mortes de recém-nascidos em 1993 foram causadas por doenças diarreicas e, somente na América Latina e Caribe, foram responsáveis por 7,1% dos óbitos no período de 1998 a 2002 (Teixeira; Pungirum, 2005; Bozkurt *et al*, 2003). Estudo realizado em moradias periurbanas do Brasil, na cidade de Guarulhos, observou maior ocorrência de diarreia em crianças com idade de 10 meses ou maiores. Havendo já nesta idade a introdução de outros alimentos na dieta infantil e, não ocorrendo os devidos cuidados de higiene, aumentam os riscos de infecção e diarreia (Paz *et al*, 2012). Até mesmo nos países desenvolvidos, as diarreias ainda representam um importante componente das estatísticas de morbidade e da demanda de serviços de saúde, como no caso dos Estados Unidos, onde ocorreram 16.700 hospitalizações em doze meses, de crianças menores de cinco anos, devido a complicações produzidas por síndromes diarreicas (Parashar *et al*, 2003).

A diarreia é uma alteração do movimento intestinal normal caracterizada por aumento do volume e do teor de água das fezes, bem como por mudanças na frequência de sua eliminação. O conceito de que diarreia é a diminuição da consistência e o aumento na frequência de evacuações para mais de três vezes/dia têm sido utilizado para investigações epidemiológicas (Guerrant *et al*, 2001). A diarreia intensa pode levar à hospitalização e sequelas graves, tais como a síndrome de Guillain Barre, a síndrome urêmica hemolítica e, em alguns casos, até à morte (Amirlak; Amirlak, 2006; Allos, 2001).

Algumas estratégias de prevenção, tais como o uso de água potável, saneamento básico e, práticas de higiene podem ser implementadas sem a necessidade de conhecimento aprofundado sobre os agentes etiológicos das diarreias. Por outro lado, outras medidas, tais como o desenvolvimento de vacinas, requerem investigação mais acurada destes parasitos e de sua relação com o hospedeiro (Walker *et al*, 2010).

Vários estudos foram realizados em diversos países pelo mundo para pesquisar a presença de um ou mais patógenos em amostras de fezes diarreicas. Embora estes estudos isolados forneçam informações importantes, é difícil obter conclusões em relação à importância de cada agente etiológico, sem considerar a interrelação de mais de um agente simultaneamente (Walker *et al*, 2010). A lista de enteropatógenos que podem causar diarreia é extensa e inclui vírus, bactérias, protozoários e helmintos (Guerrant *et al*, 2001; Pawlowski *et al*, 2009).

Por estas razões, determinar a etiologia da diarreia é importante, a fim de orientar as intervenções globais de saúde pública, planejando ações específicas, tanto nos casos endêmicos quanto nos epidêmicos.

2. JUSTIFICATIVA

Diante das evidências que comprovam que *E. dispar* é capaz de produzir lesões experimentais significativas na presença de bactérias e da elevada frequência de co-infecções intestinais que atingem milhões de pessoas anualmente, acreditamos que os passos mais importantes devem ser direcionados no aprofundamento dos estudos da relação *E. dispar*/bactérias. Além disso, não existem estudos “*in vivo*” sobre a correlação da expressão gênica de fatores de virulência amebianos, com a intensidade da lesão e a expressão de marcadores de inflamação aguda em modelos experimentais de infecção amebiana associada à bacteriana.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da bactéria *Salmonella Enterica* sorovar Typhimurium (S. Typhimurium) sobre a virulência da *Entamoeba dispar* e da *Entamoeba histolytica in vitro* e na colite amebiana experimental induzida no rato.

3.1 Objetivos específicos:

3.1.1 Padronizar o cultivo *in vitro* de *S. Typhimurium* associada à trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica*.

3.1.2 Avaliar a expressão dos genes de amebaporo A, cisteína proteinases 2 e 5, e da lectina específica para resíduos de Gal/GalNAC em trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica*, isolados de culturas não associadas e associadas com *S. Typhimurium*;

3.1.3 Quantificar a expressão dos mesmos genes mencionados acima em trofozoítos de isolados de culturas não associadas e associadas com *S. Typhimurium*.

3.1.4 Avaliar as lesões microscópicas presentes no ceco de ratos infectados com *E. dispar* ou *E. histolytica* e co-infectados ou não com *S. Typhimurium*;

3.1.5 Avaliar a intensidade da inflamação da mucosa cecal nos ratos infectados com *E. dispar* ou *E. histolytica* e co-infectados ou não com *S. Typhimurium*;

3.1.6 Avaliar a expressão de IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC-2 na mucosa cecal de ratos infectados com *E. dispar* ou *E. histolytica* e co-infectados ou não com *S. Typhimurium*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microorganismos

4.1.1 Bactéria *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*

Foi utilizada a cepa *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (ATCC 14028), de origem humana, cedida gentilmente pela Professora Dra Elisabeth Neumann, sendo mantida no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

A cepa foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) cultivada por 18 horas a 37°C em aerobiose e adicionado 0,2 ml de glicerina esterilizada por calor seco. Para os experimentos a cepa foi ativada por duas vezes consecutivas em caldo BHI (aerobiose), a 37°C, durante 18 horas sem agitação. Para avaliação do crescimento da *S. Typhimurium* foram feitas diluições sucessivas das culturas ativadas em salina 0,85% estéril, seguindo-se plaqueamento de 100 μ L das diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ em placas de Agar BHI, para contagem de colônias isoladas, respectivamente pela técnica de *spread plate*. As placas foram incubadas a 37°C por 48h em aerobiose, as colônias foram contadas. Posteriormente foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina 0,85% na concentração de 10⁷ Unidades formadoras de Colônias (UFC).

4.1.2 Cepas de *Entamoeba dispar* e de *Entamoeba histolytica*

Foram utilizadas as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* mantidas em cultivo polixênico de meio Pavlova, isoladas no Laboratório de Amebíase do departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, de pacientes apresentando colite não disintérica com sorologia negativa para *E. histolytica*. A sorologia, zimodema e PCR foram positivos para *E. dispar* (Gomes *et al*, 1999; Martinez *et al*, 1996). Também foram utilizadas as cepas EGG axênica (EGGa) e EGG polixênica (EGGp) de *E. histolytica*, isoladas em 1988 no Laboratório de Amebíase do departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, de paciente apresentando colite disintérica e necrose hepática amebiana. Utilizando os mesmos métodos, zimodema e o PCR, foi verificado que as amostras eram de *E. histolytica* (Gomes *et al*, 1999; Martinez *et al*, 1996). As cepas MCR, ADO, VEJ de *E. dispar* e a cepa EGGp de *E. histolytica* foram cultivadas em meio Pavlova modificado (Silva, 1972), enquanto a cepa EGGa de *E. histolytica* foi cultivada em meio *Yeast Extract-Iron-Serum* (TYI-S-33) (Diamond *et al*, 1978a).

4.2 Padronização da associação *in vitro* de *S. Typhimurium* à cultura de trofozoítos amebianos

Para obtermos a associação de *S. Typhimurium* à cultura amebiana, a princípio foram realizados testes de sobrevivência da *S. Typhimurium* nos meios Pavlova e TYI-S-33. O meio de cultura Pavlova destinado ao crescimento das cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica*, é composto de Na₂HPO₄ (fosfato de sódio dibásico), KH₂PO₄ (fosfato de sódio monobásico), NaCl, Extrado de levedo (auto lisado de células de levedura), soro bovino, H₂O e amido solidificado. Quando associado a *S. Typhimurium* no meio Pavlova, em estufa à 37° C, foi constatado que não ocorreu crescimento ou colonização, devido a *S. Typhimurium* necessitar de glicose para seu desenvolvimento, e a única fonte de glicose no meio Pavlova é o amido solidificado, que é fagocitado e metabolizado pelos trofozoítos amebianos. A *S. Typhimurium* não conseguiu metabolizar e extrair glicose do amido solidificado, o que acarretou na necessidade de adicionar glicose ao meio. Foram realizados testes de adição de glicose ao meio Pavlova nas seguintes concentrações 0,5g/L, 1g/L, 2g/L, 3g/L e 4g/L. A concentração de glicose mais adequada foi igual a 2g de glicose para cada litro de meio

de cultura Pavlova. Esta concentração permitiu que a *S. Typhimurium* se desenvolvesse sem interferir no crescimento dos trofozoítos e das bactérias oriundas da microbiota indígena do paciente a qual foram isoladas as cepas. Já para o crescimento da cepa EGGa de *E. histolytica*, foi utilizado o meio axênico TYI-S-33, que é composto por extrato de levedo, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, glicose, L-Cisteína (aminoácido), ácido ascórbico, citrato de ferro, soro bovino e H₂O. Por ser um meio mais rico em nutrientes e possuir glicose em sua fórmula, *S. Typhimurium* mantida em estufa à 37° C conseguiu colonizar o meio facilmente, não necessitando de nenhuma intervenção.

Paralelamente aos testes de sobrevivência da *S. Typhimurium* aos meios de cultura amebianos foram realizados testes para avaliar a resistência dos trofozoítos das cepas amebianas estudadas, à associação da *S. Typhimurium*. As cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica* foram cultivadas separadamente em meio Pavlova enquanto a cepa EGGa de *E. histolytica* foi cultivada em meio TYI-S-33. Ambas foram cultivadas em garrafas e mantidas em estufa à 37° C, por um período de 48 horas. Passadas às 48 horas de cultivo e sendo constatado o bom crescimento dos trofozoítos, foram associadas às culturas *S. Typhimurium* nas diferentes concentrações 10⁴ UFC, 10⁶ UFC e 10⁸ UFC contidos em 10 µl de solução salina 0,85%, por de 3, 6, 18 e 24 horas. Para estabelecermos a concentração de *S. Typhimurium* e o tempo de associação ideal foram considerados a viabilidade do trofozoítos de todas as cepas amebianas. Foi padronizado como melhor concentração a adição de 10⁶ UFC e o tempo viável para a associação, o período de 18 horas. Na concentração de 10⁶ UFC e tempo de 18 horas foram observados trofozoítos com bom aspecto e em bom número em todas as culturas amebianas das diferentes cepas, sendo as coculturas viáveis para realizarmos os experimentos.

4.3 Cultura *in vitro* de trofozoítos em associação com *S. Typhimurium*

As cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica* foram cultivadas separadamente em meio Pavlova enquanto a cepa EGGa de *E. histolytica* foi cultivada em meio YI-S-33. Ambas as culturas das espécies de amebas foram mantidas separadamente em garrafas e mantidas em estufa à 37° C, por um período de 48 horas e realizado o acompanhamento do crescimento de ambas as espécies de amebas. Constatado o crescimento, em algumas garrafas das diferentes cepas amebianas

cultivadas, foram associadas à bactéria *S. Typhimurium* na concentração de 10^6 UFC em 10 μ l. Esta associação foi mantida por um período de 18 horas em estufa à 37° C. Algumas garrafas de cultivos das amebas foram mantidas sem associação com bactérias. Após as 18 horas, foram coletados os trofozoítos das culturas associadas e não associadas com a bactéria *S. Typhimurium*. Os trofozoítos foram colocados em microtubo contendo eosina, funcionando como marcador de vitalidade, na diluição 1:2 e depois levados à câmara de Neubauer. Para o cálculo de amebas/ml foi realizada a multiplicação do número de trofozoítos contados pela diluição utilizada e pelo fator de correção 2500 (Seydel *et al*, 1997). Após a contagem, as cepas com o crescimento próximo ou superior a 10^6 foram armazenadas separadamente em microtubos de 2 ml contendo 500 μ L de Trizol *Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, USA), estocadas em *freezer* na temperatura -80°C e destinadas a extração de RNAm.

4.4 Determinação da expressão de RNAm dos fatores de virulência em trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, isolados da cultura

4.4.1 Extração do RNA total dos fatores de virulência em trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* isolados da cultura

Após a coleta das culturas amebianas não associadas e associadas à *S. Typhimurium*, estas foram centrifugadas, desprezado o sobrenadante e o *pellet* foi transferido para microtubos de 2 ml estéreis e livres de RNAase contendo 500 μ l de Trizol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidinaisotiocianato de onde o RNA foi extraído. Durante a extração, o Trizol rompe as células mantendo a integridade do RNA. O acréscimo do clorofórmio separa a solução em fase aquosa e orgânica, sendo que o RNA permanece na fase aquosa. Por fim, o RNA presente na fase aquosa foi precipitado com isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Para obtermos o RNA em bom grau de pureza e integridade foi utilizado a água miliQ preparada com dietilpirocarbonato (DEPC). A extração foi realizada em ambiente

asséptico e foram usadas toucas, máscaras e luvas livres de talco. As bancadas e fluxo laminar foram higienizados com etanol a 70%, preparado com água DEPC e todo material utilizado foi estéril.

Com a adição de clorofórmio ocorre à separação em fases, onde foi retirada a fase líquida transparente, contendo o RNA. O produto foi precipitado com isopropanol gelado e posteriormente lavado com etanol, a 70%, em água DEPC. O *pellet* de RNA foi suspenso com 50 a 100 µl de água DEPC. Após a secagem do etanol residual o RNA foi quantificado por espectrometria no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Cientific Inc., Bremen, Germany). Foi constatada e levada em consideração a relação de absorvância (A) em 260/280 nanômetros (nm) e 260/230 nm, que indica o grau de pureza de RNA, que posteriormente foi armazenado a -20°C.

4.4.2 Produção de cDNA a partir do RNA extraído dos fatores de virulência de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, isolados da cultura

Tubos contendo amostras de RNA que apresentaram quantificação acima de 200 ng/µl e relação de A260/A280 entre 1,7 e 2,1 foram retirados do freezer para confecção do DNA complementar (cDNA). Foi calculado o volume necessário para obtenção de 50 µl, em concentração de 200ng/µl e procedeu à diluição. Posteriormente o RNA foi tratado com a enzima Turbo DNAase I da (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA) de acordo com a recomendação do fabricante, objetivando-se eliminar algum DNA residual. Em seguida efetuou-se nova diluição do RNA, adicionando-se 50 µl de água DEPC, que resultou em 100 µl do produto, contendo 100 ng/µl de RNA (Tabela 1).

Quadro 1: Volume dos reagentes usados no tratamento com a Turbo DNase I.

Tratamento com tubo DNase I-AB		
Amostras	1X	100X

RNA	45 µL a 200ng/µL	
Tampão 10X	5 µL	500
Enzima	1 µL	100
30' a 37°C graus		
Depois 2 µL EDTA 375 mM e 75°C/10 minutos		

Todo o RNA tratado foi usado para a reação de transcrição reversa (*Reverse transcription polymeras chain reaction* (RT-PCR) e produção de cDNA com o kit *High Capacity* (Life Technologies, Grand Island, New York, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Foi utilizado 1,0 (µg) de RNA para cada reação de RT-PCR. Em seguida O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20°C (Tabela 2).

Quadro 2: Mistura de reagentes utilizados para confecção do cDNA.

MIX Reação de RT-PCR (High Capacity)		
	1X	100X
Tampão RT 10x	2	200
dNTPS	0,8	80
Random primers	2	200
DDW	4,2	420
RNA (100ng/µL)	10	

4.4.3 Padronização das reações de qRT-PCR com iniciadores para fatores de virulência de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*

A padronização das condições da Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (qPCR) foi realizada levando em consideração a concentração dos iniciadores associados à eficiência das reações.

Para os ensaios de amplificação dos iniciadores, confeccionados para os fatores de virulência dos trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, a padronização foi realizada com o cDNA obtido a partir do RNA extraído das culturas amebianas associadas e não associadas à *S. Typhimurium*. Os parâmetros utilizados foram diferentes concentrações dos iniciadores em temperatura de anelamento de 60°C e diferentes diluições das amostras de cDNA. Os primers foram desenhados usando o programa Primer 3 input version 0.4.0. Suas sequências, bem como as eficiências de reação são demonstradas na Tabela 1.

As reações de qPCR foram efetuadas na plataforma ABI 7900 HT REAL TIME PCR (Life Technologies, Grand Island, New York, USA) pertencente ao Departamento de Biologia Geral-ICB/UFMG, com o Kit SYBR Green PCR Master Mix 2x (Life Technologies, Grand Island, New York, USA), em placas ópticas de 96 poços, com selante adesivo óptico MicroAmp (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA). As curvas de dissociação foram obtidas a partir de diluições seriadas do cDNA (50 ng; 5 ng; 0,5 ng, 0,05 ng e 0,005 ng), para todos os genes dos fatores de virulência e de referência.

Tabela 1: Condições padronizadas de RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica dos fatores de virulência amebianos obtidos em amostras de culturas de trofozoítos de cepas *E. dispar*/*E. histolytica*.

Gene	Sequencia dos primers	Eficiência (%)	Temperatura de anelamento	Tamanho do amplicon	Quantidade
Actin	F 5' AAGCTGCATCAAGCGTGAA3' R 5' ACCAAGGAATGATGGAGA3'	105.82	60°C	119bp	10pmols
GAPDH	F 5' GGAAGTGTGAAGCTGGAGA3' R 5' CCCCATCCAATTTGAGCTGG3'	109.67	60°C	92bp	20pmols
CP-5	F 5' AGAGACCAAGCATCATGTGGA3' R 5' TCTTTGATCCAGCAACCAACA3'	96.45	60°C	93bp	10pmols
CP-2	F 5' GTTTGTGCTGTTGGATATGGTGT3' R 5' CCTTATCCCCATCCTGTCC3'	112.75	60°C	86bp	15pmols
Ap-A	F 5' TCACTGCTACTACCAAGGA3' R 5' CTTTATCAGCTCCCTTAGTGGT3'	108.68	60°C	97bp	15pmols
Lectina/ Gal/GalNAC	F 5' TGCGAAACTGCAACATGTGATC3' R 5' GGTGTGATTGTGGAATTCCTC3'	98.03	60°C	94bp	20pmols

Em todas as reações de amplificação foram usados programas de ciclagem universal contendo um passo inicial de 50° C/2min; 95° C/10min seguido por 40 ciclos, contendo um passo de 95° C/ 15s e outro, de 60° C/1minuto. A curva de dissociação foi obtida por meio de etapas de aquecimento, resfriamento e aquecimento, sucessivas (95°

C/15s, 60° C/15s e 95° C/ 15s) após a reação de amplificação. Para as reações foram utilizadas placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, fechadas com selante MicroAmp® Optical Adhesive Film (Life Technologies, Grand Island, New York, USA).

4.4.4 Quantificação relativa da expressão dos fatores de virulência de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*, isolados da cultura

A quantificação relativa da expressão dos fatores de virulência amebiano de interesse foi realizada mediante amplificação por qPCR do cDNA obtido das amostras de RNA total extraído dos trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica*, isolados das culturas associadas e não associadas à *S. Typhimurium*. As reações foram realizadas a partir de iniciadores, codificados pelos genes da cisteína proteinases 2 e 5, amebaporos A e da lectina específica Gal/GalNAC, (Tabela 3).

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

Após a amplificação foram realizadas as análises para obtenção da quantificação relativa, que resultou da relação entre o gene dos fatores de virulência em estudo e dos genes *housekeeping*, ambos comparados com os resultados obtidos com uma amostra calibradora, não co-cultivada com *S. Typhimurium*. Os resultados foram graficamente demonstrados usando a média e desvio-padrão dos valores do nível relativo de RNAm de cada fator de virulência, normalizado pelo fator de normalização, este último, foi obtido das médias geométricas das quantidades relativas de RNAm de *actin* e GAPDH, para cada grupo experimental.

Para obtenção dos dados de nível relativo de expressão (NRE), foi empregado o método derivado do *relative quantification* (RQ) = $2^{-\Delta\Delta_{cq}}$ (Livak & Schmittgen, 2001) e modificado por Hellemans *et al*, (2007) usando a equação 1:

$$\text{Equação 1: } NRE_x = \frac{[E_x] \Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}] \Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}}$$

NRE_x - Expressão relativa normalizada do gene estudado;
 E_x - Eficiência de amplificação do gene estudado;
 E_{ref} - Eficiência de amplificação do(s) gene(s) de referência;
 ΔCQ_x - Valor de quantificação do ciclo do gene estudado;
 ΔCQ_{ref} - Valor de quantificação do ciclo do(s) gene(s) de referência;
 n - Número de genes de referência utilizado.

4.5 Inoculação

4.5.1 Animais utilizados

Foram utilizados no experimento 8 ratos wistar (*Rattus norvegicus*) por grupo, totalizando 96 ratos (Figura 1), fêmeas, com a idade aproximada entre 25-30 dias. Os ratos foram obtidos no Biotério do ICB/UFMG.

Os ratos foram mantidos em gaiolas coletivas, com temperatura ambiente em torno de 23°C, com exposição à luz durante 12 horas, recebendo água *ad libitum*. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA-UFMG) (protocolo 224/2012).

4.5.2 Inoculação dos trofozoítos

As cepas mantidas à -70° C em nitrogênio líquido, no Laboratório de Amebíase do departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, foram descongeladas em banho-maria à 37°C, por aproximadamente cinco minutos. As cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e, a cepa EGGp de *E. histolytica* foram colocadas em tubos com meio Pavlova. A cepa EGGa de *E. histolytica* foi introduzida em tubos com meio TYI-S-33, e, após o crescimento, todas foram transferidas para garrafas de culturas, mantidas em estufa à 37° C, por aproximadamente 48 horas.

No dia do inóculo, o sobrenadante das garrafas foi desprezado, a fim de selecionar somente trofozoítos viáveis e PBS foi acrescentado. As garrafas foram colocadas em banho de gelo por 15 minutos para soltar os trofozoítos viáveis aderidos na superfície. Os trofozoítos foram transferidos para tubos falcon de 15 ml e

centrifugados por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e cada cepa foi transferida separadamente para um único tubo. Para contagem dos trofozoítos, estes foram colocados em microtubo contendo eosina, funcionando como marcador de vitalidade, na diluição 1:2 e depois levados à câmara de Neubauer. Para o cálculo de trofozoítos/ml foi feita a multiplicação do número de trofozoítos contados pela diluição utilizada para a contagem e pelo fator de correção 2500 (Seydel *et al*, 1997).

Antes do inóculo os ratos foram anestesiados com solução de xilazina 2% (10 mg/Kg) e ketamina 5% (150mg/Kg) para realização de uma laparotomia sagital mediana de aproximadamente 2cm para exposição do ceco. Em seguida, na porção final do ceco foi realizado inóculo de 500000 trofozoítos das respectivas cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e, EGGa e EGGp de *E. histolytica*, contidos em 0,5 ml de meio de cultura.

4.6 Experimento de co-infecção

4.6.1 Intubação intragástrica com bactéria e inóculo intracecal de trofozoítos

Primeiramente 40 ratos foram submetidos a um desafio por intubação intragástrica com 0,5mL de uma suspensão contendo 10^8 UFC da bactéria alvo *S. Typhimurium*, previamente ativada por 2 repiques em meio BHI, onde foi cultivada por 24h a 37°C em aerobiose. Quatorze horas depois, todos os ratos foram inoculados por via intracecal com 5×10^5 trofozoítos amebianos contidos em 0,5 ml de meio de cultura das respectivas cepas de amebas, *E. dispar* cepa MCR (grupo MCR-ST, n=8), *E. dispar* cepa ADO (grupo ADO-ST, n=8), *E. dispar* cepa VEJ (grupo VEJ-ST, n=8), *E. histolytica* cepa EGG polixênica (grupo EGGp-ST, n=8) e *E. histolytica* cepa EGG axênica (grupo EGGa-ST, n=8) conforme explicitado na figura 1.

Como grupos controles, 56 ratos foram inoculados somente com trofozoítos das cepas: *E. dispar* cepa MCR (grupo MCR, n=8), *E. dispar* cepa ADO (grupo ADO, n=8), *E. dispar* cepa VEJ (grupo VEJ, n=8), *E. histolytica* cepa EGG polixênica (grupo EGGp, n=8) e *E. histolytica* cepa EGG axênica (grupo EGGa, n=8) (Figura 1). Oito ratos foram somente submetidos a um desafio por intubação intragástrica com 0,5mL de uma suspensão contendo 10^8 UFC da bactéria *S.Typhimurium* (grupo ST, n=8) (Figura 1). Outros 8 ratos pertencentes ao grupo controle não infectado foram inoculados também pela via intracecal com 0,5ml meio de cultura Pavlova estéril (grupo CTRL, n=8) (Figura 1).

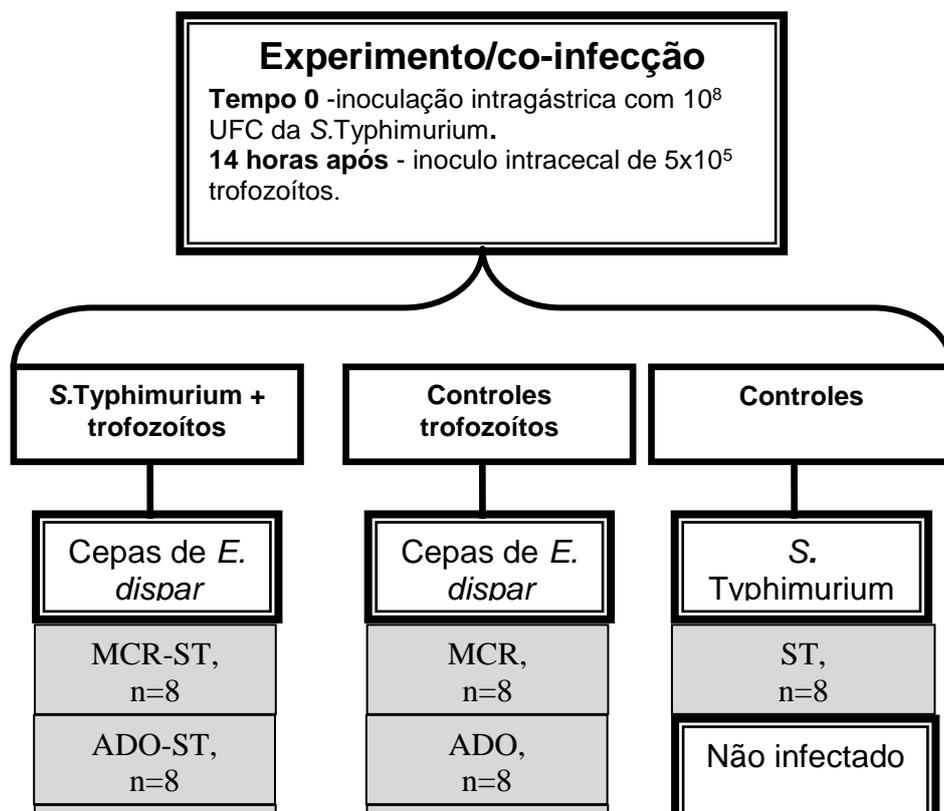


Figura 1. Delineamento experimental.

MCR-ST- Grupo infectado com a cepa MCR e co-infectado com *S. Typhimurium*.

ADO-ST- Grupo infectado com a cepa ADO e co-infectado com *S. Typhimurium*.

VEJ-ST- Grupo infectado com a cepa VEJ e co-infectado com *S. Typhimurium*.

EGGp-ST- Grupo infectado com a cepa EGGp e co-infectado com *S. Typhimurium*.

EGGa-ST- Grupo infectado com a cepa EGGa e co-infectado com *S. Typhimurium*.

MCR - Grupo controle infectado com a cepa MCR.

VEJ - Grupo controle infectado com a cepa VEJ.

ADO - Grupo controle infectado com a cepa ADO.

EGGp - Grupo controle infectado com a cepa EGGp.

EGGa - Grupo controle infectado com a cepa EGGa.

ST - Grupo controle infectado com *S. Typhimurium*.

CTRL - Grupo controle não infectado.

4.7 Necropsia e coleta de material

Os ratos foram eutanasiados 7 dias após a infecção, utilizando overdose de anestésico (solução de xilazina 2% e ketamina 5%) para a coleta do ceco de todos os grupos. Nos grupos de ratos co-infectados com *S. Typhimurium* além do ceco também foram coletados o baço e fígado em condições assépticas. O baço e o fígado foram pesados, triturados, homogeneizados e diluídos separadamente. Posteriormente dez microlitros das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foram plaqueadas, em triplicata, por microgota, em ágar MacConkey (Difco, Sparks, EUA) para enumeração de *Salmonella*. As placas de MacConkey foram incubadas a 37°C por 24 horas em aerobiose. Os resultados foram expressos em Log de UFC/g de órgão. Com isso foi confirmado o

sucesso do inóculo da *S. Typhimurium* nos ratos co-infectados. Os cecos dos ratos foram abertos longitudinalmente, lavados com PBS pH 7,2, colocados em uma superfície plana e enrolados em uma espiral com a mucosa voltada para dentro de modo a formar rolos (*swiss rolls* ou rocambole). Os rolos foram então amarrados com linhas, com leve pressão e imersos em solução fixadora de Bouin com 1,5% de ácido acético para pré-fixação durante 15 minutos. Em seguida foram retirados da solução de Bouin e fixado em formol tamponado 10% pH 7,2 por 5 dias, com adaptações segundo Arantes & Nogueira (1997). Após o período de fixação no formol, foram obtidos de cada ceco, 5 fragmentos que foram desidratados em diluições alcólicas crescentes, diafanizados em xilol, infiltrados e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes com 4 µm de espessura para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e confeccionadas lâminas para análises histopatológicas, descrição das lesões quanto a intensidade, análises morfométricas e para a realização de reações imuno-histoquímicas.

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

4.8 Análise quantitativa da área de necrose cecal (erosões e úlceras) e, da celularidade da lâmina própria

Foram denominadas de erosões amebianas as pequenas lesões destrutivas da mucosa cecal, menos frequentemente observadas atingindo também a submucosa, com presença ou ausência de infiltrado inflamatório misto. Já as úlceras amebianas cecais são lesões amplas e mais profundas, com necrose sempre atingindo a mucosa e submucosa e, às vezes, até a muscular. As lesões foram descritas quanto ao seu tipo, intensidade e localização e o infiltrado inflamatório foi descrito como discreto moderado e intenso.

Para mensuração da área total de erosões e úlceras cecais, foram analisados cortes histológicos corados pela H&E, onde 3 fatias de cada ceco foram escolhidas aleatoriamente e identificadas. Todas as erosões e úlceras foram visualizadas pela objetiva de 10X e digitalizadas através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (*Tokyo, Japan*), e manualmente medidas para obtenção da área da lesão (erosões + úlceras) em μm^2 , por intermédio do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (*Oberkochen, Germany*). Posteriormente os mesmos cortes analisados anteriormente foram visualizados pela objetiva de 2X, digitalizados através da mesma microcâmara e mensurados manualmente o comprimento em milímetros de cada corte por intermédio do mesmo programa, para obtenção da proporção real da superfície cecal analisada de cada animal. Em seguida, os dados da área de lesão de cada animal foram normalizados considerando o menor comprimento de mucosa cecal analisado e obtido o valor da área de lesão de cada animal (Oliveira *et al*, 2015). A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliari (1997).

Para a análise da celularidade da lâmina própria foi utilizada metodologia semelhante à padronizada por Ferreira Junior *et al*, (2015). Cortes histológicos corados pela H&E de cada rato dos mesmos grupos foram visualizados pela objetiva de 20X para a digitalização de 20 imagens aleatórias através da microcâmara Samsung SDC-415. Outra sequência de algoritmos do mesmo programa de morfometria foi elaborada para a segmentação e o processamento das imagens e definição das condições de morfometria. As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células e, através da segmentação, foram selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares presentes na lâmina própria e excluídos aqueles de outras estruturas do corte histológico. Mediante este processo, foi criada uma imagem binária e calculados os núcleos de todos os tipos celulares presentes na lâmina própria. A contagem obtida nos ratos controles foi considerada como o padrão normal de celularidade da lâmina própria, sem infiltrado inflamatório. Já nos ratos dos grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGa-ST, EGGp-ST, MCR, VEJ, ADO, EGGa, EGGp e ST foram contados os núcleos dos tipos celulares normalmente presentes na lâmina própria e os núcleos dos leucócitos recrutados no processo inflamatório, permitindo a avaliação quantitativa do infiltrado inflamatório (Ferreira Junior *et al*, 2015).

4.9 Reações imuno-histoquímicas para IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC-2

Dos fragmentos cecais coletados foram obtidos outros cortes histológicos de todos os grupos de ratos. Estes cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. Posteriormente foi realizado o reaproveitamento antigênico com a solução Dako Retrieval (Dako, Califórnia, USA) a 100°C por vinte minutos. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40vv a 0,2% em 200 ml de PBS por 20 minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando-se os cortes com o reagente ultra V-Block (Thermo Scientific®, Massachussts, USA) por 40 minutos. Em seguida os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-IL-1 α , anti-IL-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) diluídos 1:40, anti-COX-2 diluído 1:60 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) e anti-MUC2 diluído 1:40 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), por 18 horas. Em seguida os cortes foram lavados em PBS e incubados com IgG biotinizada de cabra anti-camundongo, diluída 1:40 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) nas reações imuno-histoquímicas para IL-1 α e IL-4, IgG biotinizada de cabra anti-camundongo, diluída 1:60 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), na reação imuno-histoquímica para COX-2 e IgG biotinizada de cabra anti-coelho diluída 1:60 (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA) na reação imuno-histoquímica para MUC-2. Posteriormente os cortes foram incubados com estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) diluída 1:50 nas reações imuno-histoquímicas para IL-1 α e IL-4 e na diluição 1:100 nas reações Imuno-histoquímicas para COX-2 e MUC-2, todos por 1 hora cada. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv a 0,2%. Como controle negativo, o anticorpo 1° foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

4.9.1 Análise quantitativa da expressão de IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC2

Cortes histológicos do ceco de cada rato dos grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGa-ST, EGGp-ST, MCR, VEJ, ADO, EGGa, EGGp, ST e CTRL com marcação

positiva para IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC2, foram visualizados pela objetiva de 20X para a digitalização de 20 imagens aleatórias através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (JVC, Tokyo, Japan). A área das marcações imuno-histoquímicas foi calculada através de algoritmos construídos no mesmo analisador de imagens. Em cada imagem foram selecionados todos os pixels com tons de marrom das marcações positivas para a criação de uma imagem binária, processamento digital, definição das condições de morfometria e cálculo da área em μm^2 (Caliari, 1997).

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 6 (GraphPad Software Inc. San Diego Califórnia, USA). Os valores obtidos foram avaliados pelo teste de *Shapiro-Wilk* para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Foram obtidas as médias, medianas, desvios-padrão, erro padrão da média, intervalo interquartil e coeficientes de variação para cada conjunto de dados. Em seguida, foram realizados os testes *one-way* ANOVA para dados paramétricos e *Kruskal-Wallis* para os não-paramétricos quando comparado mais de 2 grupos, para verificar se havia diferença entre as variâncias, e o pós-teste de *Tukey* de múltiplas comparações, para verificar quais médias eram significativamente diferentes. Quando avaliado somente dois grupos, foram empregados o *Test t unpaired* para dados paramétricos e o teste *Mann-Whitney* para os não-paramétricos. Os resultados foram expressos como média \pm SEM quando paramétricos e em mediana com intervalo interquartil (25% - 75%) quando não-paramétricos. Foi considerado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da associação *in vitro* da *S. Typhimurium* sobre cepas de *E. dispar* e de *E. histolytica* na expressão de fatores de virulência amebianos

Os resultados dos efeitos da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. dispar* e *E. histolytica* sobre o nível relativo da expressão gênica (nível de mRNA) dos fatores de virulência Cp-5, CP-2, Ap-A e a lectina específica para

resíduos de Gal/GalNAC, foram expressos em quantidades médias relativas de mRNA, de acordo com o método descrito por Hellemans e colaboradores (2007) usando como calibrador os dados de expressão dos grupos controles. O resultado de cada grupo experimental é mostrado como uma quantidade relativa da expressão do grupo calibrador, que tem o nível de expressão definido como 1x. A análise da expressão relativa desses fatores de virulência foi feita em cada uma das culturas pertencentes às cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e das cepas EGGa e EGGp de *E. histolytica*, associadas ou não associadas à enterobactéria *S. Typhimurium*.

Não houve efeito de nenhum dos tratamentos experimentais sobre a expressão relativa dos genes normalizadores (*actin* e GAPDH), pois não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) de expressão relativa entre os grupos experimentais. Portanto, os genes *actin* e GAPDH foram usados com segurança para normalização dos dados de expressão dos fatores de virulência amebianos (Gráfico 1A, B).

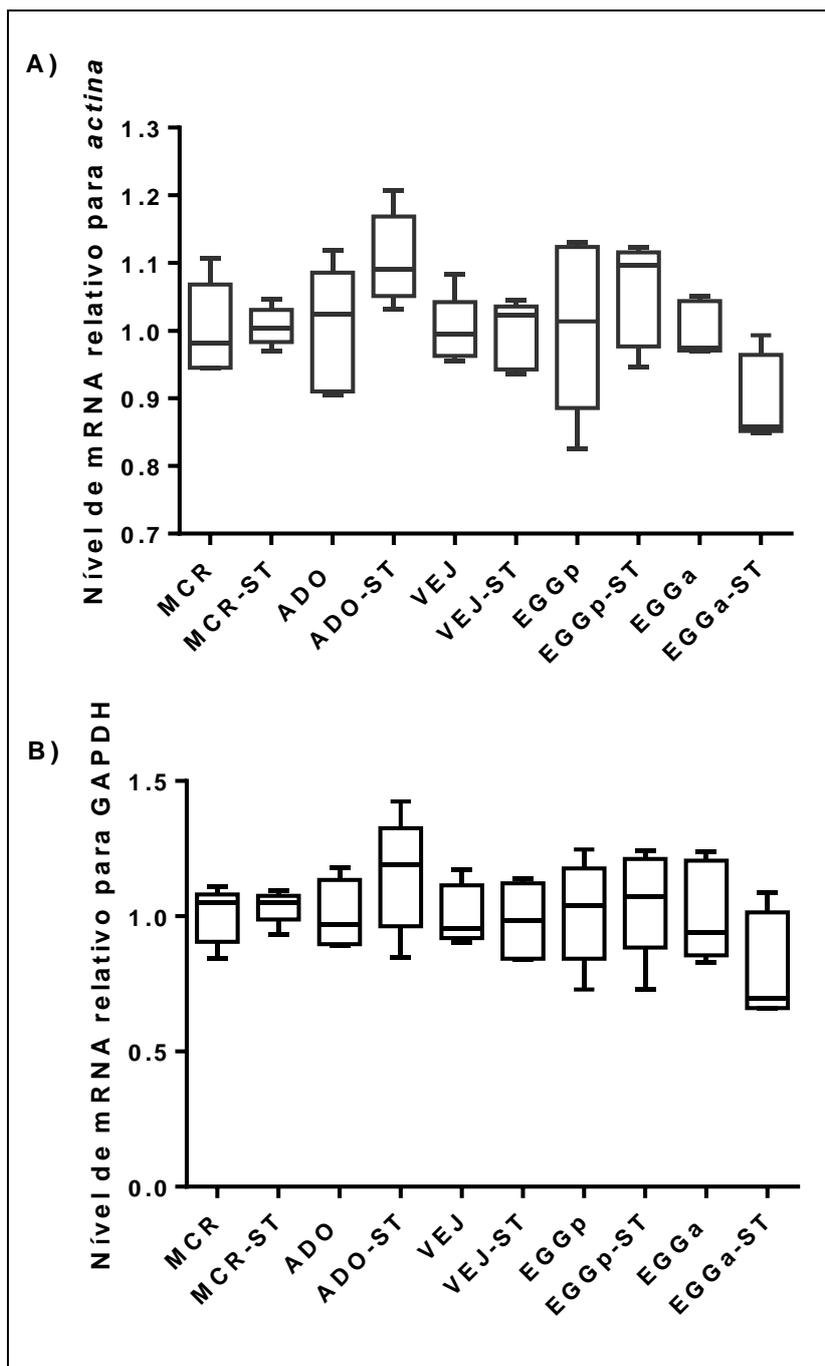


Gráfico 1. Avaliação do efeito dos genes normalizadores (*actin* e *GAPDH*) sobre os grupos experimentais.

(A) (B) MCR: Cultura da cepa MCR não associada à *S. Typhimurium*. MCR-ST: Cultura da cepa MCR associada com *S. Typhimurium*; ADO: Cultura da cepa ADO não associada à *S. Typhimurium*. ADO-ST: Cultura da cepa ADO associada com *S. Typhimurium*. VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à *S. Typhimurium*. VEJ-ST: Cultura da cepa VEJ associada com *S. Typhimurium*. EGGp: Cultura da cepa EGGp não associada à *S. Typhimurium*. EGGp-ST: Cultura da cepa EGGp associada com *S. Typhimurium*. EGGa: Cultura da cepa EGGa não associada à *S. Typhimurium*. EGGa-ST: Cultura da cepa EGGa associada com *S. Typhimurium*. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%), n=5.

Após 18 horas de associação das cepas de *E. dispar* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi observado um aumento significativo do nível relativo da expressão gênica para o fator de virulência Ap-A, onde foi verificado nos grupos MCR-ST (4,993) (3,546 - 7,159) e ADO-ST (1,919) (1,462 - 3,161), um aumento significativo de sua expressão relativa quando comparados com seus respectivos grupos controles MCR (0,8238) (0,6130 - 1,941) ($p=0,0079$) e ADO (1,000) (0,6997 - 1,443) ($p=0,0317$) (Gráficos 2A, B). Entretanto, tal observação não ocorreu no grupo VEJ-ST (1,646) (1,067 - 3,629) de *E. dispar*, que não exibiu diferença significativa em relação ao grupo VEJ (0,8949) (0,5902 - 1,873) (Gráfico 2C).

Também foi constatado uma diferença significativa no grupo EGGp-ST (3,807) (2,413 - 5,987) de *E. histolytica* no qual foi observado um aumento significativo da expressão relativa de Ap-A em relação ao seu grupo controle EGGp (0,8740) (0,6393 - 1,706) ($p=0,0317$) (Gráfico 3A). Ao contrário do que foi observado com o grupo EGGp-ST, o grupo EGGa-ST (0,2423) (0,1938 - 0,3472) apresentou uma redução significativa da expressão relativa de Ap-A, quando comparado com seu grupo controle EGGa (1,006) (0,6006 - 1,821) ($p=0,0159$) (Gráfico 3B).

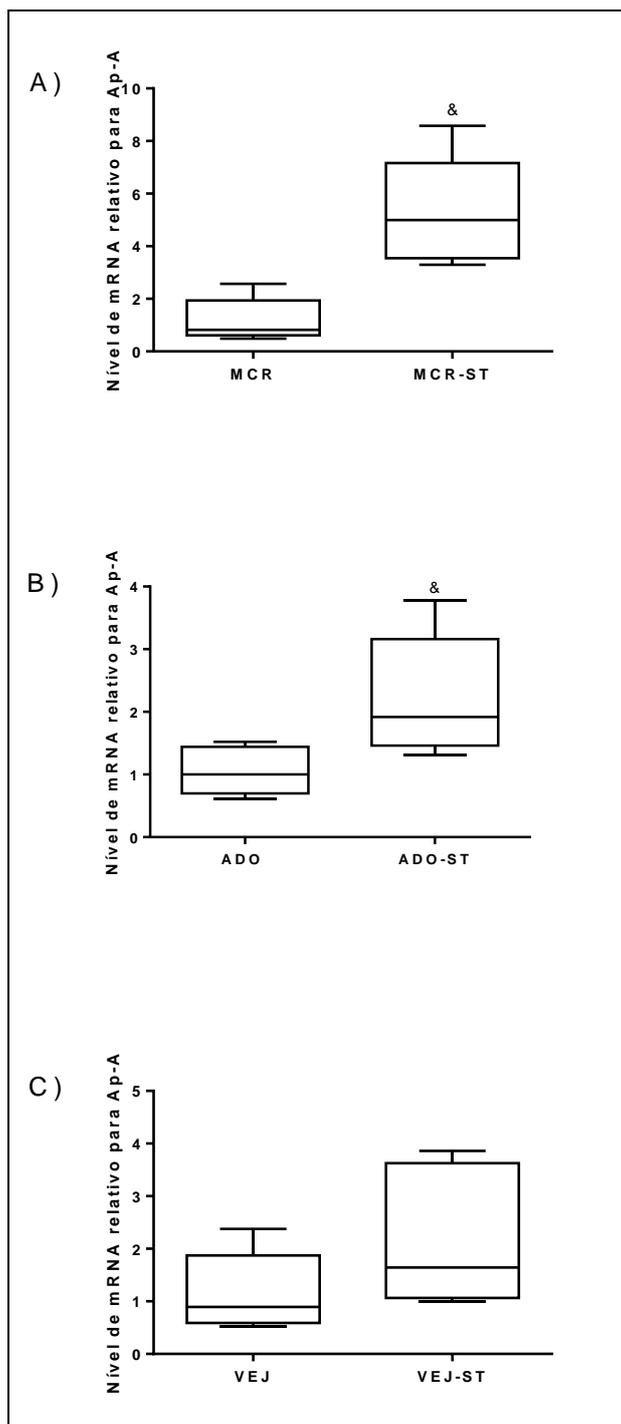


Gráfico 2. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. dispar* pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de amebaporo A (Ap-A).

A): MCR: Cultura da cepa MCR não associada à *S. Typhimurium*. MCR-ST: Cultura da cepa MCR associada com *S. Typhimurium*; $&p=0,0079$. (B) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à *S. Typhimurium*. ADO-ST: Cultura da cepa ADO associada com *S. Typhimurium*; $&p=0,0317$. (C) VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à *S. Typhimurium*. VEJ-ST: Cultura da cepa VEJ associada com *S. Typhimurium*. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

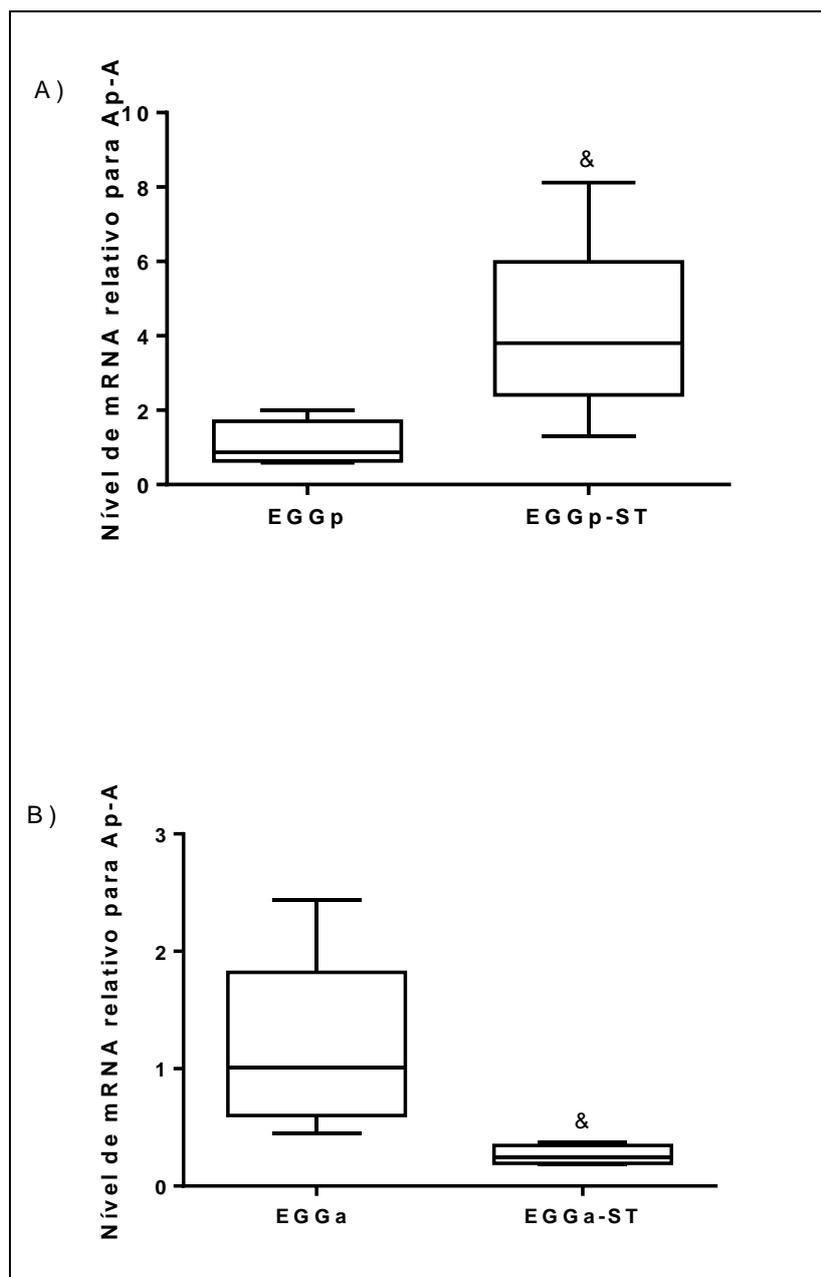


Gráfico 3. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de amebaporo A (Ap-A).

(A) EGGp: Cultura da cepa EGGp não associada à *S. Typhimurium*. EGGp-ST: Cultura da cepa EGGp associada com *S. Typhimurium*; $&p=0,0317$. (B) EGGa: Cultura da cepa EGGa não associada à *S. Typhimurium*. EGGa-ST: Cultura da cepa EGGa associada com *S. Typhimurium*; $&p=0,0159$. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

Nos grupos de *E. dispar* MCR-ST (2,175) (1,536 - 3,132) e ADO-ST (2,291) (0,6639 - 3,783) não foram constatadas diferenças significativas em relação aos seus controles MCR (1,525) (0,3701 - 2,232) e ADO (1,182) (0,6834 - 1,519) (Gráficos 4A, B). A análise quantitativa da expressão gênica para CP-2 em trofozoítos isolados da cultura VEJ-ST (0,3890) (0,1269 - 0,5527) de *E. dispar* apresentou uma redução significativa na expressão de CP-2 quando comparado com o seu grupo controle VEJ (1,064) (0,8375 - 1,158) ($p=0,0079$) (Gráfico 4C).

Foi verificada redução significativa na expressão de CP-2 nos trofozoítos isolados da cultura EGGa-ST (0,1353) (0,1036 - 0,2188) de *E. histolytica* em relação ao seu grupo controle EGGa (1,115) (0,3755 - 2,5880) ($p=0,0159$) (Gráfico 5B). O mesmo não foi observado no grupo EGGp-ST (0,6008) (0,3607 - 1,816) de *E. histolytica* em relação aos seu controle EGGp (1,072) (0,5425 - 1,860) (Gráfico 5A).

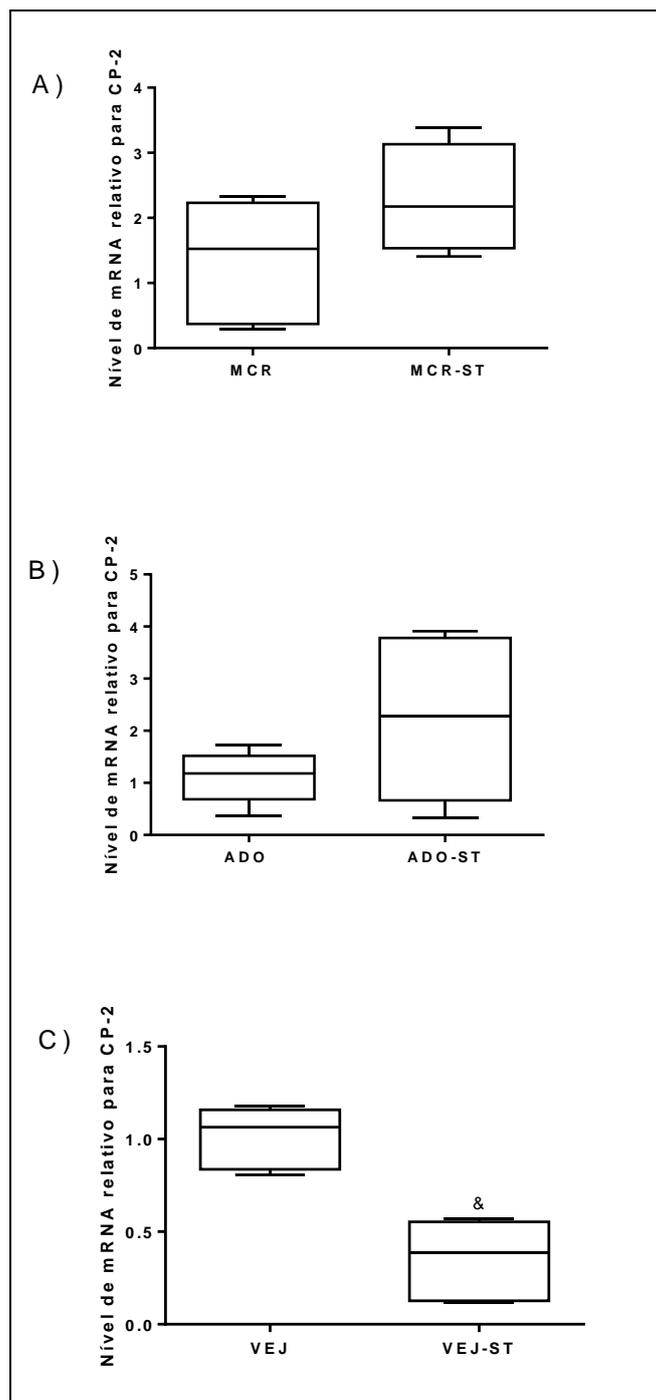


Gráfico 4. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. dispar* pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 2 (CP-2).

(A) MCR: Cultura da cepa MCR não associada à *S. Typhimurium*. MCR-ST: Cultura da cepa MCR associada com *S. Typhimurium*. (B) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à *S. Typhimurium*. ADO-ST: Cultura da cepa ADO associada com *S. Typhimurium*. (C) VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à *S. Typhimurium*. VEJ-ST: Cultura da cepa VEJ associada com *S. Typhimurium*; &p=0,0079. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

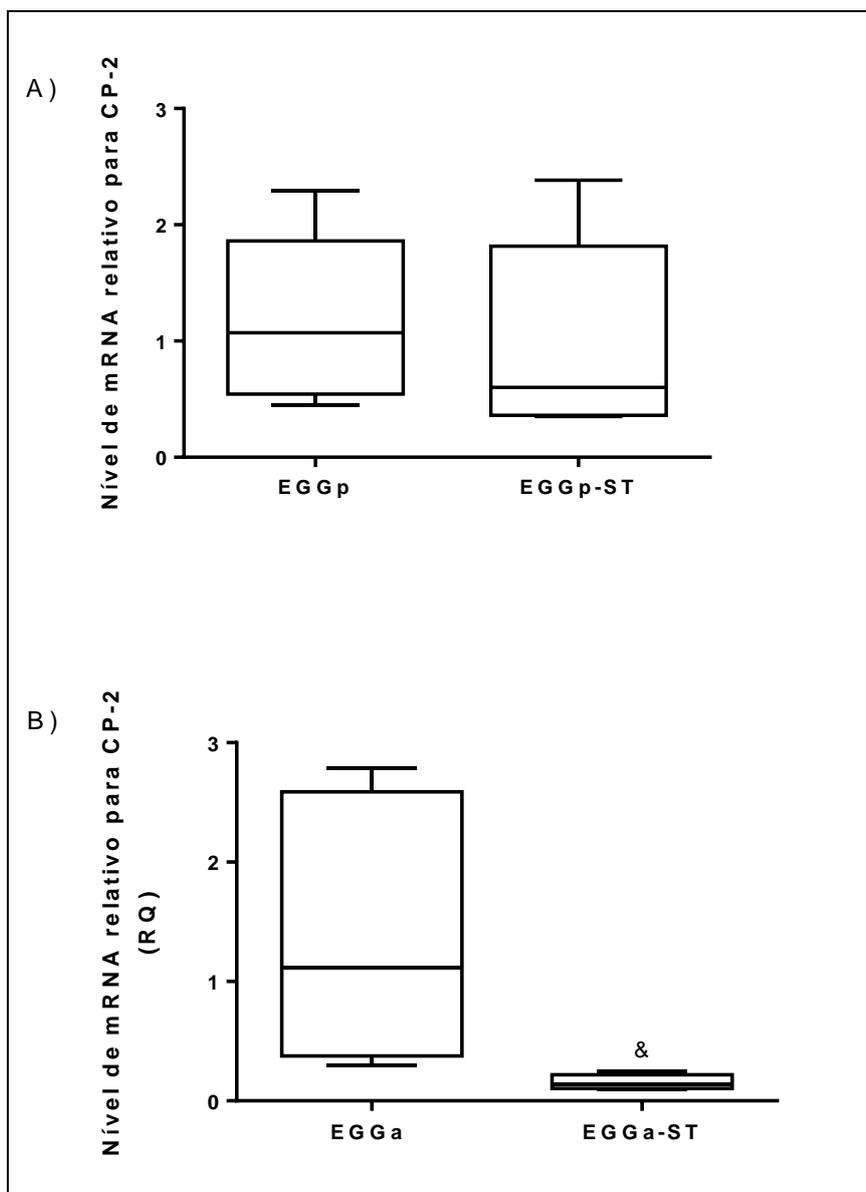


Gráfico 5. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 2 (CP-2).

(A) EGGp: Cultura da cepa EGGp não associada à *S. Typhimurium*. EGGp-ST: Cultura da cepa EGGp associada com *S. Typhimurium*. (B) EGGa: Cultura da cepa EGGa não associada a associada *S. Typhimurium*. EGGa-ST: Cultura da cepa EGGa associada com *S. Typhimurium*; $^{\&}p=0,0159$. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

Em relação à expressão do fator de virulência CP-5, após 18 horas de associação das cepas de *E. dispar* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi observado um aumento significativo do nível relativo da expressão gênica para o fator de virulência CP-5 nos grupos MCR-ST (1,465) (1,358 - 1,721) e VEJ-ST (1,536) (1,293 - 2,540) quando comparados respectivamente com seus grupos controles MCR (1,025) (0,8177 - 1,217) ($p=0,0079$), VEJ (1,031) (0,7814 - 1,265) ($p=0,0317$) (Gráficos 6A, C). Em relação ao grupo ADO-ST (1,493) (1,095 - 1,785) não ocorreu diferença significativa em comparação ao grupo controle ADO (1,034) (0,7232 - 1,384) (Gráfico 6B).

Resultado semelhante ocorreu com os grupos EGGp-ST (0,7065) (0,6068 - 1,047) e EGGa-ST (0,9710) (0,8732 - 1,600) de *E. histolytica* quando comparados aos seus respectivos grupos controles EGGp (0,7686) (0,5846 - 1,051) e EGGa (1,462) (0,4693 - 1,952), onde não foi constatado diferença significativa na expressão de CP-5 (Gráficos 7A, B).

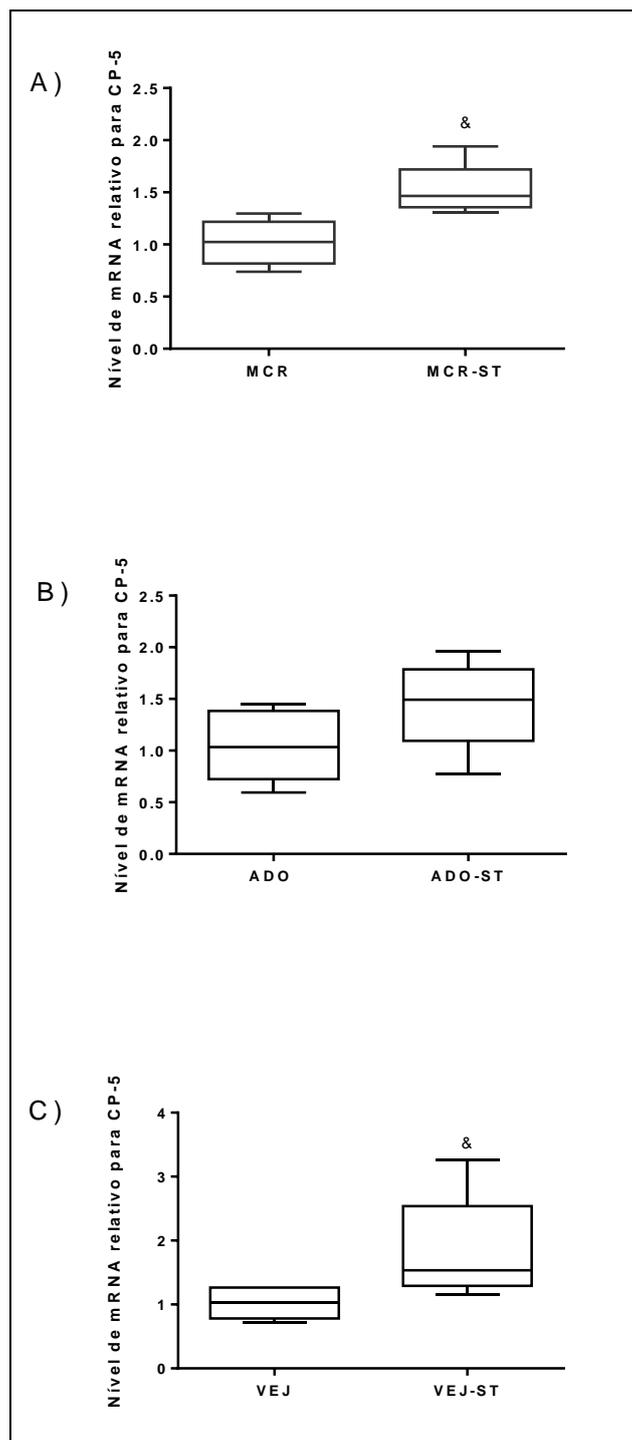


Gráfico 6. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. dispar* pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 5 (CP-5).

(A) MCR: Cultura da cepa MCR não associada à *S. Typhimurium*. MCR-ST: Cultura da cepa MCR associada com *S. Typhimurium*; $^{\&}p=0,0079$. (B) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à *S. Typhimurium*. ADO-ST: Cultura da cepa ADO associada com *S. Typhimurium*. (C) VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à *S. Typhimurium*. VEJ-ST: Cultura da cepa VEJ associada com *S. Typhimurium*; $^{\&}p=0,0317$. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem

dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

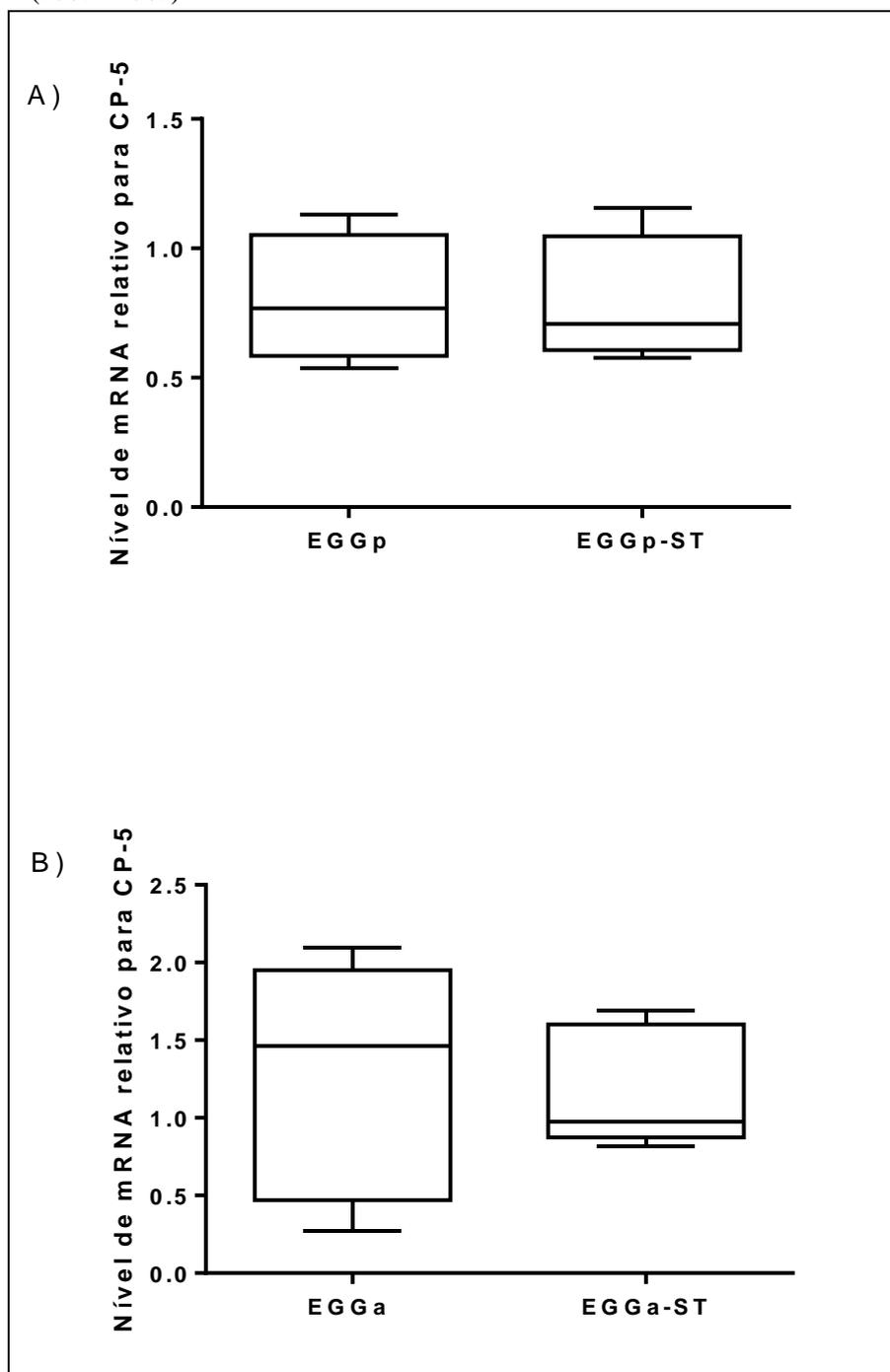


Gráfico 7. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de cisteína proteinase 5 (CP-5).

(A) EGGp: Cultura da cepa EGGp não associada à *S. Typhimurium*. EGGp-ST: Cultura da cepa EGGp associada com *S. Typhimurium*. (B) EGGa: Cultura da cepa EGGa não associada à *S. Typhimurium*. EGGa-ST: Cultura da cepa EGGa associada com *S. Typhimurium*. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

Após o período de associação das cepas de *E. dispar* e de *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi observado um aumento significativo do nível relativo da expressão gênica para o fator de virulência lectina específica para Gal/GalNAC nos grupos ADO-ST (2,408) (1,911 - 3,278) e VEJ-ST (13,94) (10,06 - 17,07) de *E. dispar* quando comparados com seus grupos controles respectivamente ADO (0,9979) (0,6777 - 1,481) ($p=0,0079$) e VEJ (1,113) (0,4542 - 2,530) ($p=0,0079$) (Gráficos 8B, C). Em relação ao grupo MCR-ST (0,4642) (0,3395 - 1,464) não ocorreu diferença significativa em comparação ao grupo controle MCR (0,7045) (0,4770- 2,536) (Gráfico 8A). Resultado ocorreu com o grupo EGGp-ST (0,1570) (0,06675 - 0,7870) de *E. histolytica* quando comparado ao seu grupo controle EGGp (0,9316) (0,6671 - 1,576) não foi constatado diferença significativa na expressão de lectina específica para Gal/GalNAC (Gráfico 9A).

Já o grupo EGGa-ST (0,1646) (0,1511 - 0,5715), apresentou uma redução significativa no nível de expressão gênica relativa de lectina específica para Gal/GalNAC, quando comparado com seu grupo controle EGGa (1,158) (0,5887 - 1,769) ($p=0,0317$) (Gráfico 9B).

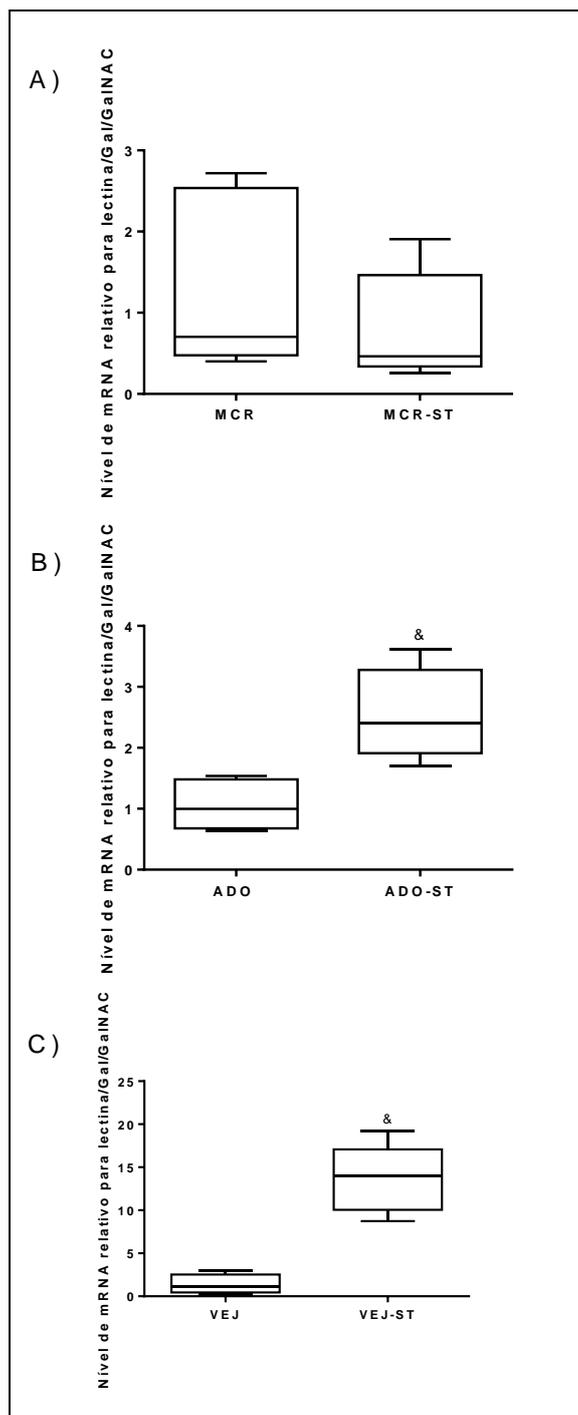


Gráfico 8. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. dispar* pertencentes a cepas MCR, ADO e VEJ na expressão gênica relativa de lectina específica para Gal/GalNAC.

A): MCR: Cultura da cepa MCR não associada à *S. Typhimurium*. MCR-ST: Cultura da cepa MCR associada com *S. Typhimurium*. (B) ADO: Cultura da cepa ADO não associada à *S. Typhimurium*. ADO-ST: Cultura da cepa ADO associada com *S. Typhimurium*; &p=0,0079. (C) VEJ: Cultura da cepa VEJ não associada à *S. Typhimurium*. VEJ-ST: Cultura da cepa VEJ associada com *S. Typhimurium*; &p=0,0079. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

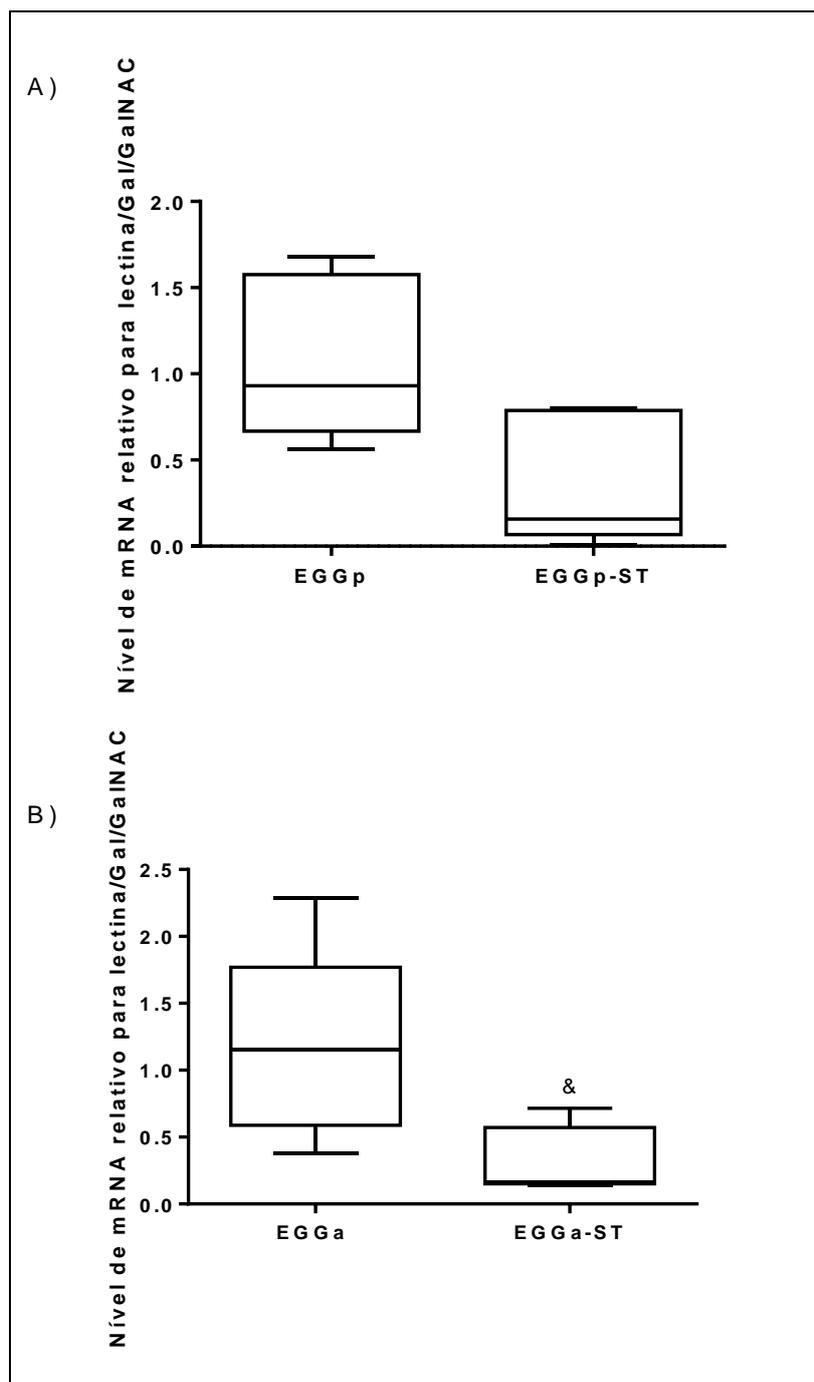


Gráfico 9. Avaliação do efeito da associação de *S. Typhimurium* na cultura *in vitro* de trofozoítos de *E. histolytica* pertencentes a cepas EGGp e EGGa na expressão gênica relativa de lectina específica para Gal/GalNAC.

(A) EGGp: Cultura da cepa EGGp não associada à *S. Typhimurium*. EGGp-ST: Cultura da cepa EGGp associada com *S. Typhimurium*. (B) EGGa: Cultura da cepa EGGa não associada a associada *S. Typhimurium*. EGGa-ST: Cultura da cepa EGGa associada com *S. Typhimurium*; &p=0,0317. Foi utilizado o teste *Mann-Whitney*, por serem dados não-paramétricos. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%).

5.2 Análise histopatológica e quantitativa da área de necrose cecal (erosões e úlceras)

O ceco dos ratos do grupo CTRL apresentou aspecto histológico compatível com a normalidade (Figura 2A, B). Não foram observadas zonas de necrose nos ratos do grupo ST (Figura 2C, D). Após 7 dias de infecção amebiana a análise histopatológica mostrou que os ratos infectados somente com trofozoítos de *E. dispar* dos grupos MCR (Figura 3A, B), ADO (Figura 4A, B), VEJ (Figura 5A, B) e do grupo EGGa de *E. histolytica* (Figura 7A, B) apresentaram lesões intestinais, caracterizadas por pequenas zonas de destruição da mucosa cecal denominadas erosões e inflamação da submucosa com infiltrado inflamatório misto, hiperemia e edema. Às vezes, tal processo inflamatório atingia a muscular e a serosa, com exceção do grupo EGGp de *E. histolytica* (Figura 6A, B) que exibiu lesões extensas, infiltrado inflamatório e edema exuberantes.

Ao observarmos os ratos infectados com trofozoítos e co-infectados com *S. Typhimurium* dos grupos MCR-ST (Figura 3C, D, E), ADO-ST (Figura 4C, D) e VEJ-ST (Figura 5C, D), foram identificados aumento tanto da área de necrose intestinal quanto da intensidade do infiltrado inflamatório misto, da hiperemia e do edema, presentes na mucosa e submucosa. Frequentemente, tais fenômenos inflamatórios também atingiam a muscular e a serosa. Com frequência, foram observados em ratos pertencentes aos grupos MCR-ST (Figura 3C, D) e VEJ-ST (Figura 5C, D), a presença de úlceras amebianas típicas, de grandes extensões e mais profundas, com necrose da camada mucosa à serosa.

Já nos grupos EGGp-ST e EGGa-ST não foram observadas diferenças quanto à intensidade das lesões em relação aos seus respectivos grupos controles EGGp e EGGa (Figura 6A, B, C, D, E), (Figura 7A, B, C, D).

Foi confirmado morfometricamente o desenvolvimento de maiores áreas de lesão da parede cecal nos animais pertencentes aos grupos co-infectados com *S. Typhimurium* grupos MCR- ST ($338906 \mu\text{m}^2$) (248437 - 691126), grupo ADO-ST ($138090 \mu\text{m}^2$) (124557 - 280612) e grupo VEJ-ST ($460183 \mu\text{m}^2 \pm 99890$) quando comparados respectivamente com os seus grupos controles somente infectado com trofozoítos amebianos grupo MCR ($133233 \mu\text{m}^2$) (73638 - 282855) ($p=0,0041$), grupo ADO ($34146 \mu\text{m}^2$) (23696 - 77439) ($p=0,0023$) e grupo VEJ ($64228 \mu\text{m}^2 \pm 9755$)

($p=0,0019$) (Gráficos 10A, B, C). Diferentemente do que ocorreu com os ratos dos grupos EGGp-ST ($495516 \mu\text{m}^2$) ($225677 - 1,595\text{e}+006 \mu\text{m}^2$) e EGGa-ST ($175266 \mu\text{m}^2 \pm 43243$), onde não foi observado diferenças significativa, quando comparados respectivamente com seu grupo controle EGGp ($286236 \mu\text{m}^2$) ($184325 - 891351$) e EGGa ($31845 \mu\text{m}^2 \pm 65171$) (Gráficos 11A, B).

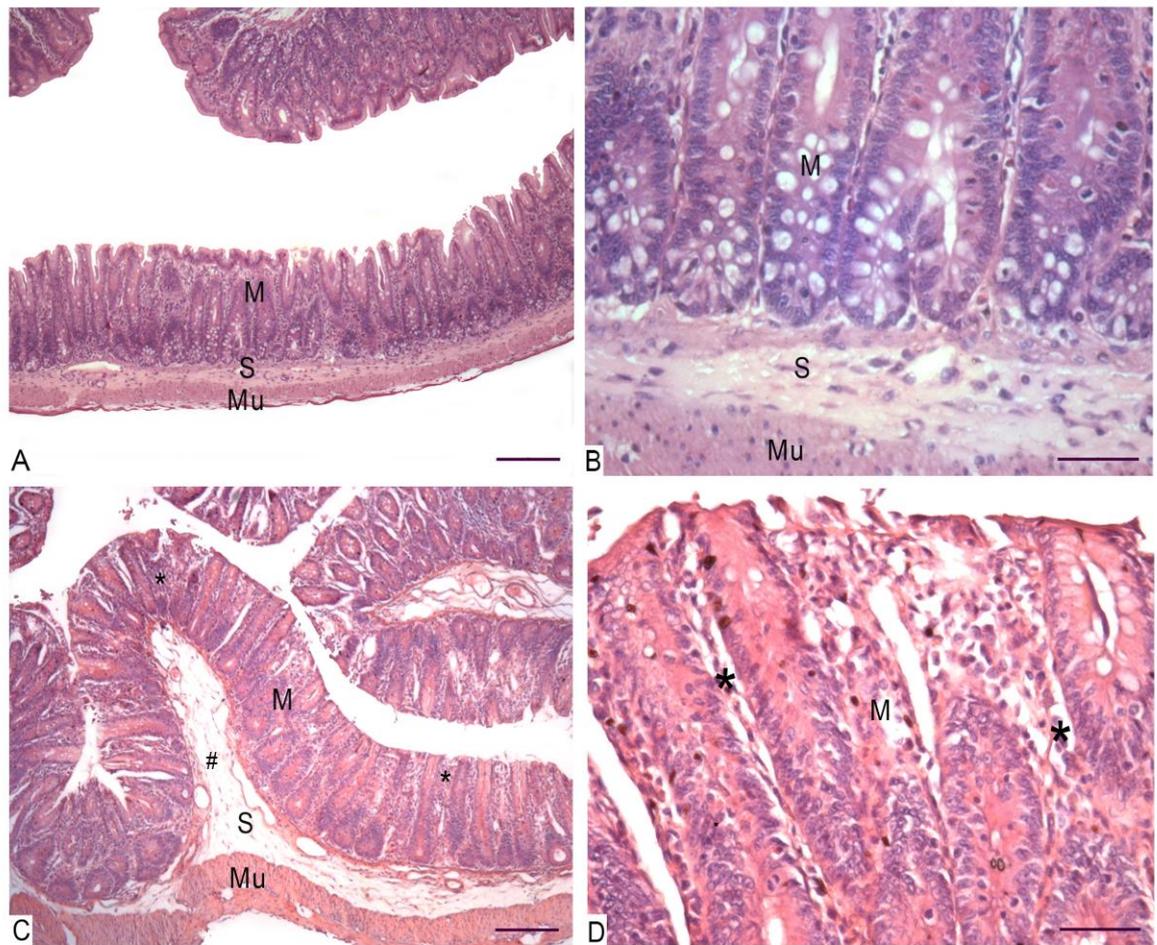


Figura 2. Ceco de ratos não infectados e de ratos infectados com *S. Typhimurium*. A) Grupo CTRL: ceco de aspecto histológico normal, barra = 200 μ m. B) Maior aumento da figura anterior, barra = 50 μ m. C) Grupo ST: discreto infiltrado inflamatório na mucosa (*) e edema de submucosa (#), barra = 200 μ m. D) Grupo ST: maior aumento da imagem anterior mostrando infiltrado inflamatório na lâmina própria (*), barra = 50 μ m. (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se); serosa

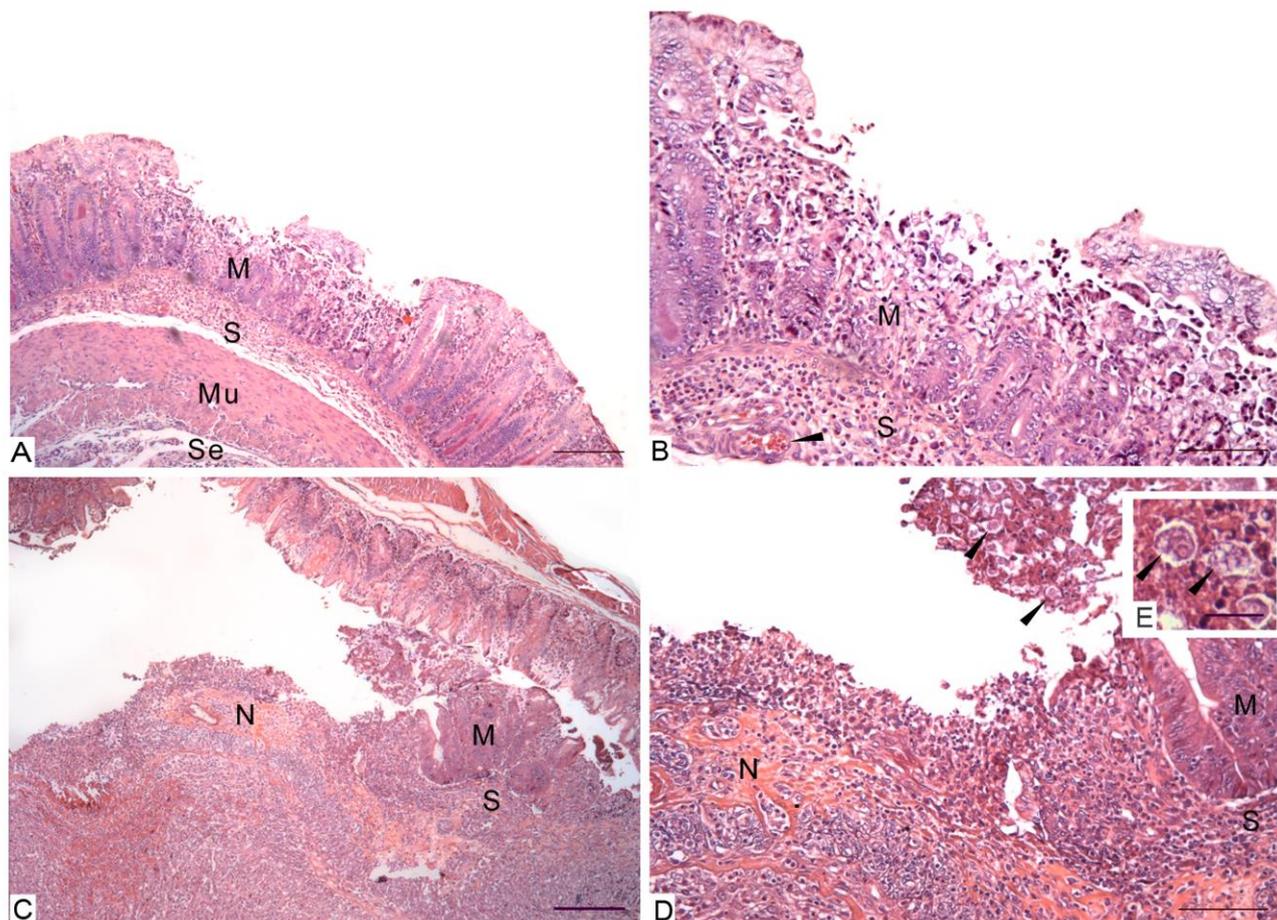


Figura 3. Ceco de ratos infectados com a cepa MCR de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Grupo MCR: zonas de necrose da mucosa cecal, barra= 200 μ m; B) Grupo MCR: maior aumento da imagem anterior, exibindo detalhes das zonas de necrose da mucosa cecal, presença de infiltrado inflamatório na subucosa e hiperemia (cabeça de seta), barra= 100 μ m; C) Grupo MCR-ST: ampla úlcera amebiana típica, necrose (N) permeada por abundante infiltrado inflamatório misto, barra= 200 μ m; D) Grupo MCR-ST: maior aumento da imagem anterior, mostrando úlcera amebiana típica, necrose (N) permeada por abundante infiltrado inflamatório misto. Presença de trofozoítos junto a restos celulares (cabeças de seta), barra=100 μ m. E) Grupo MCR-ST: insert exhibe trofozoítos, barra=20 μ m. (M) mucosa, (S) Submucosa, (Mu) muscular; (Se); serosa.

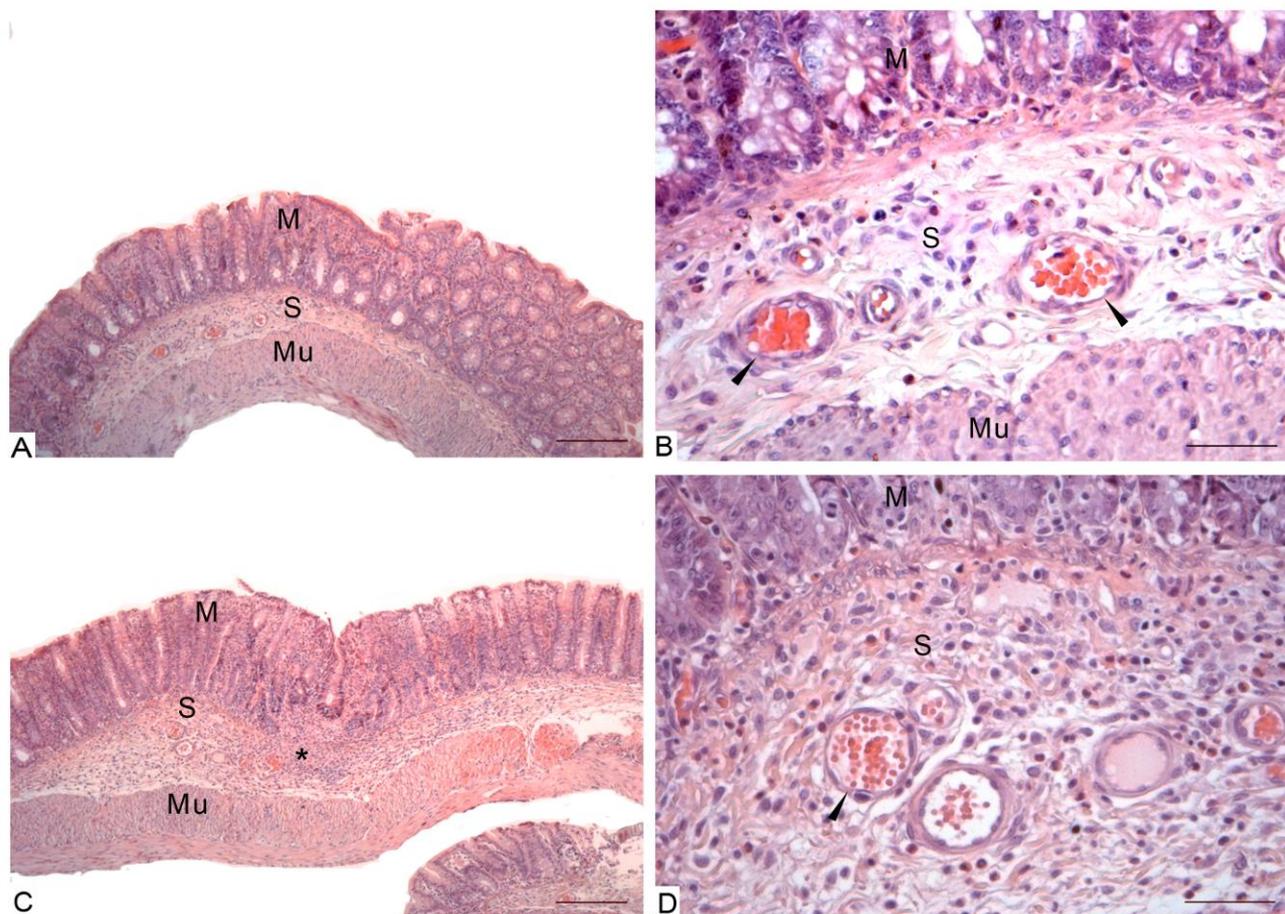


Figura 4. Ceco de ratos infectados com a cepa ADO de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.
 A) Grupo ADO: inflamação da mucosa e submucosa cecal, barra= 200 μ m; B) Grupo ADO: maior aumento da imagem anterior, exibindo detalhes da Inflamação da mucosa e submucosa cecal, presença de infiltrado inflamatório na submucosa e hiperemia (cabeça de seta), barra= 100 μ m; C) Grupo ADO-ST: inflamação da mucosa e intensa inflamação da submucosa (*), barra= 200 μ m; D) Grupo ADO-ST: maior aumento da imagem anterior, mostrando detalhes da Inflamação da mucosa e submucosa cecal, abundante infiltrado inflamatório misto na submucosa hiperemia (cabeça de seta) e edema, barra= 100 μ m. (M) mucosa, (S) Submucosa, (Mu)muscular;(Se);serosa

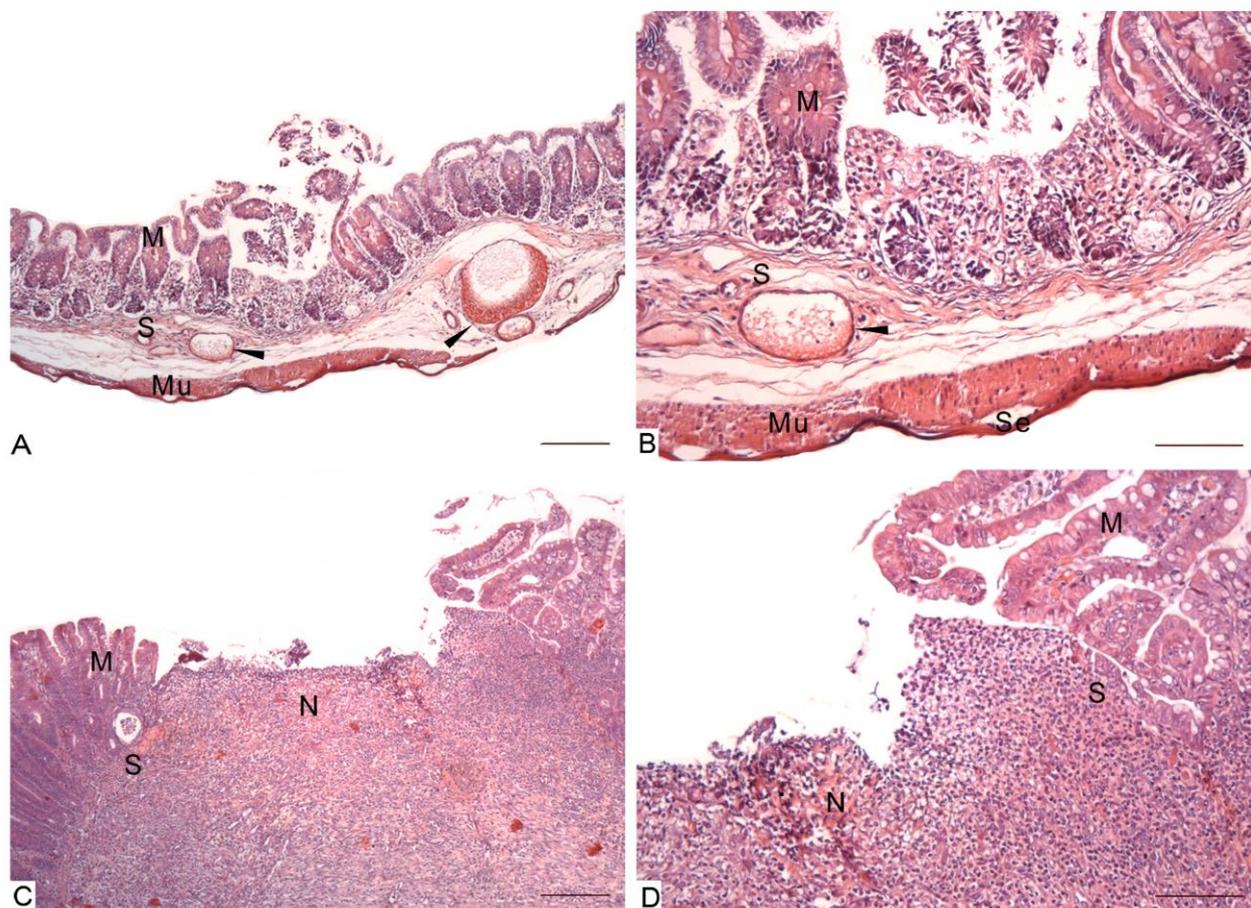


Figura 5. Ceco de ratos infectados com a cepa VEJ de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Grupo VEJ: zonas de necrose da mucosa cecal, presença de vasos hiperêmicos na submucosa (cabeças de seta), barra= 200 μ m; B) Grupo VEJ: maior aumento da imagem anterior, exibindo detalhes das zonas de necrose da mucosa cecal, edema da submucosa e vasos hiperêmicos (cabe de seta), barra= 100 μ m; C) Grupo VEJ-ST: ampla úlcera amebiana típica, necrose extensiva (N) permeada por considerável infiltrado inflamatório misto, barra= 200 μ m; D) Grupo VEJ-ST: detalhe da imagem anterior. Úlcera amebiana típica, necrose (N) permeada por considerável infiltrado inflamatório misto, barra=100 μ m. (M) mucosa, (S) Submucosa, (Mu) muscular; (Se); serosa.

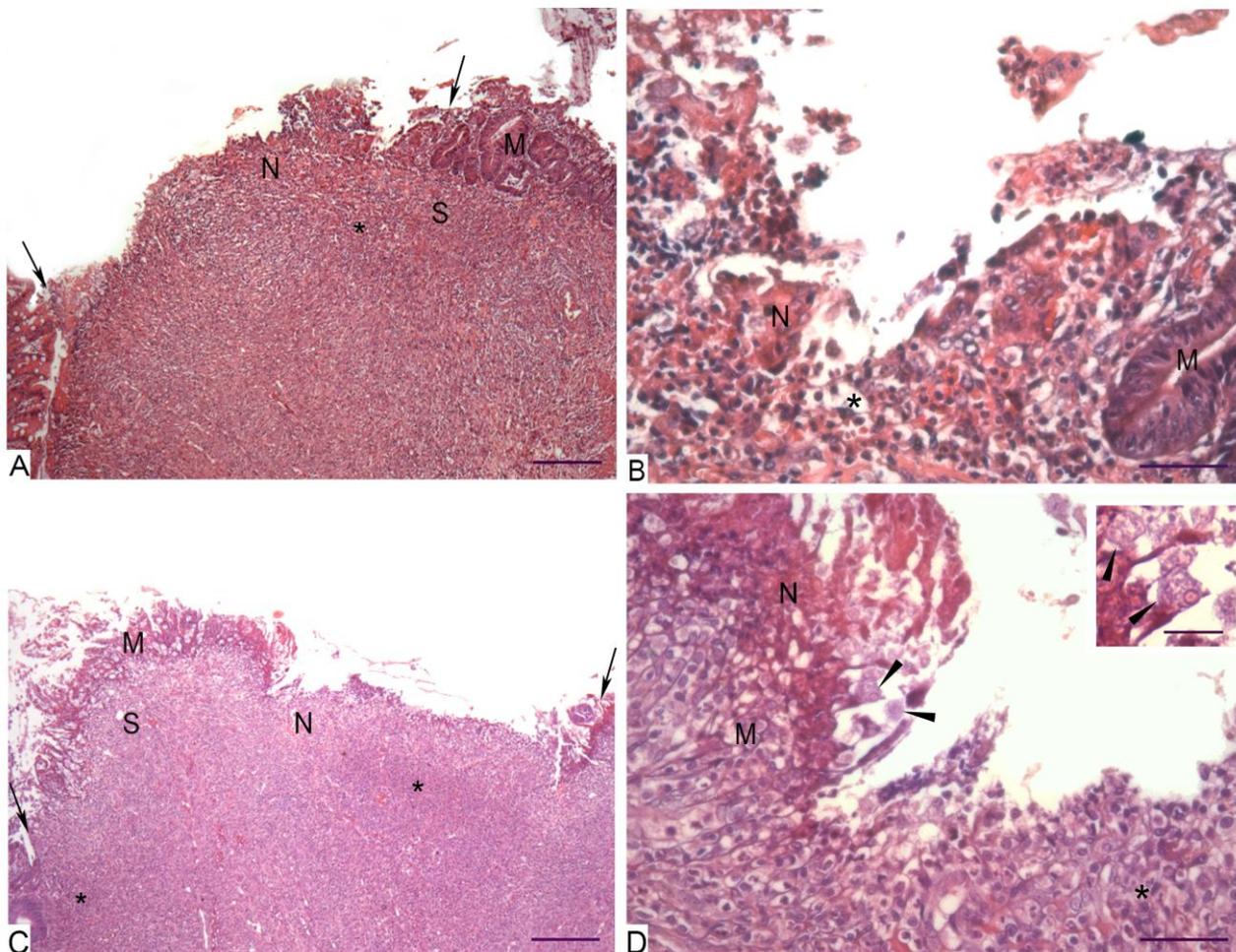


Figura 6. Ceco de ratos infectados com a cepa EGGp de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Grupo EGGp: necrose da mucosa cecal (setas), barra = 200 μ m; B) Grupo EGGp: maior aumento da imagem anterior, exibindo detalhes da necrose da mucosa cecal (setas), infiltrado inflamatório na submucosa (*), barra = 50 μ m; C) Grupo EGGp-ST: ampla úlcera amebiana típica (setas); necrose (N) permeada por abundante infiltrado inflamatório, barra = 200 μ m; D) Grupo EGGp-ST: maior aumento da imagem anterior, mostrando úlcera amebiana típica (setas), necrose (N) permeada por abundante infiltrado inflamatório misto (*). Trofozoítos junto a restos celulares (cabeças de seta), barra = 50 μ m. E) Grupo MCR-ST: Detalhe da figura anterior mostrando trofozoíto (cabeças de seta). (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se); serosa.

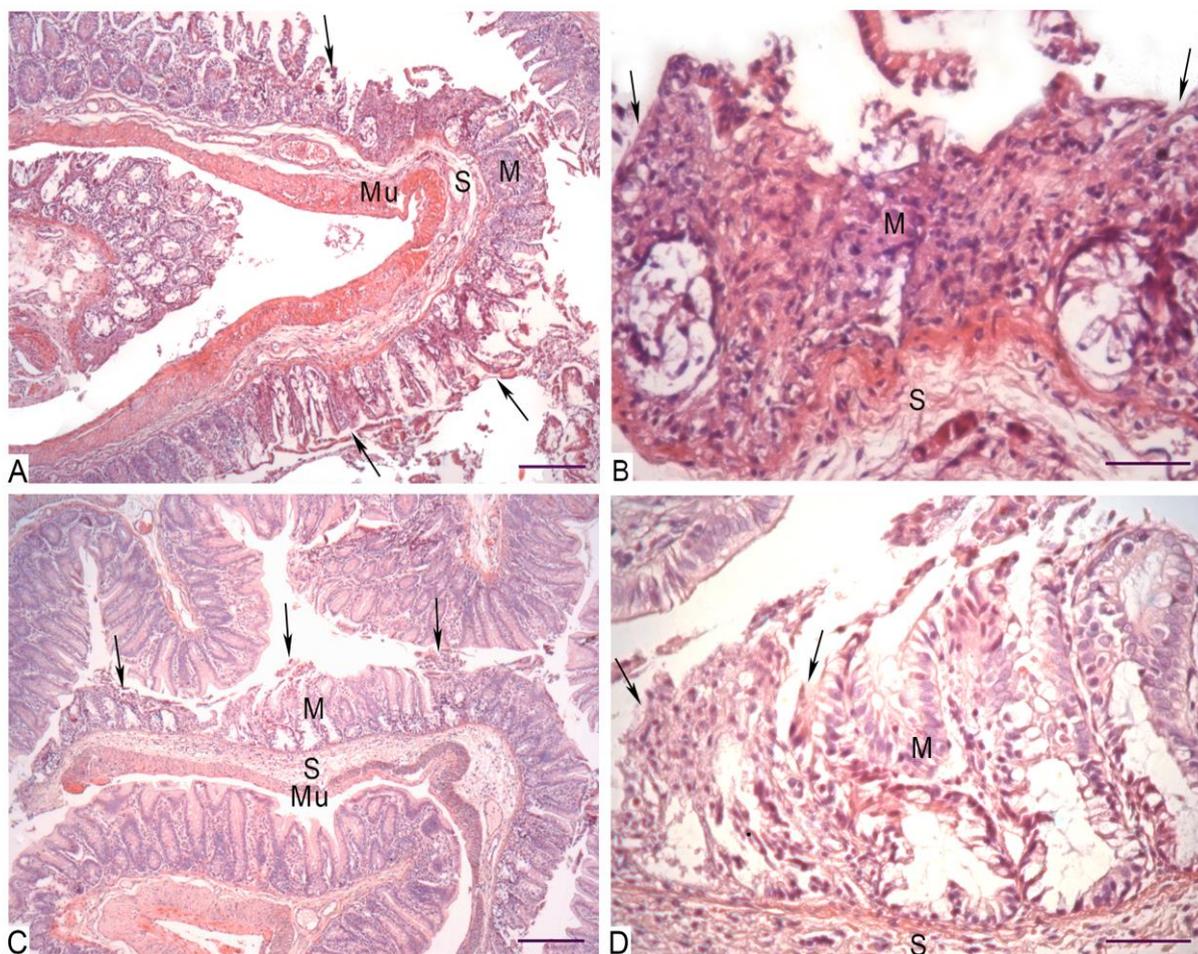


Figura 7. Ceco de ratos infectados com a cepa EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Grupo EGGa: zonas de necrose da mucosa cecal (setas), barra= 200 μ m; B) Grupo EGGa: maior aumento da imagem anterior, exibindo detalhes da zona de necrose da mucosa cecal (setas), barra= 50 μ m; C) Grupo EGGa-ST: zonas de necrose da mucosa cecal (setas), barra= 200 μ m; D) Grupo EGGa-ST: detalhe da imagem anterior, exibindo zona de necrose da mucosa cecal (setas), barra=50 μ m. (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se); serosa.

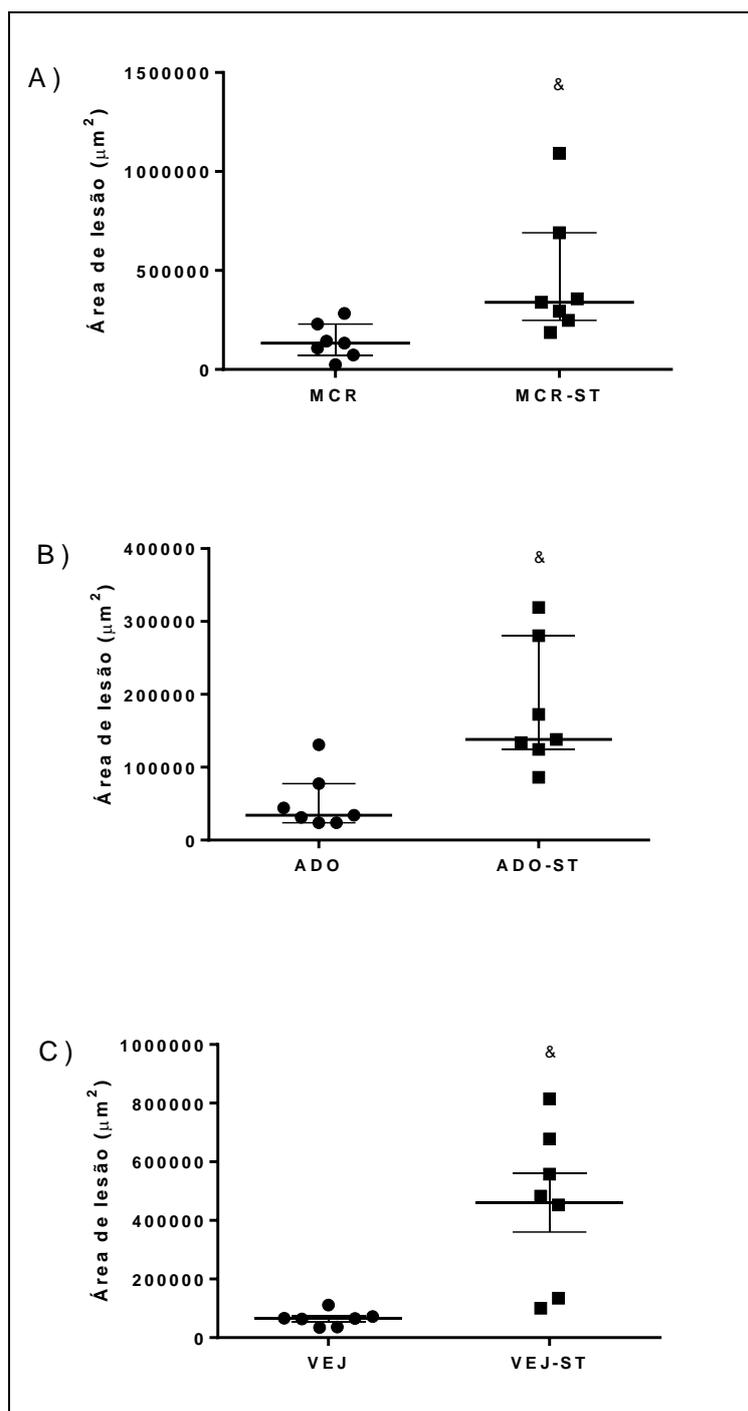


Gráfico 10: Análise quantitativa da área de lesão cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de lesão cecal dos ratos dos grupos MCR e MCR-ST; $\&p=0,0041$, *Mann-Whitney test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%). B) Área de lesão cecal dos ratos dos grupos ADO e ADO-ST; $\&p=0,0023$, *Mann-Whitney test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%). C) Área de lesão cecal dos ratos dos grupos VEJ e VEJ-ST; $\&p=0,0019$, *Unpaired t test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n=8$.

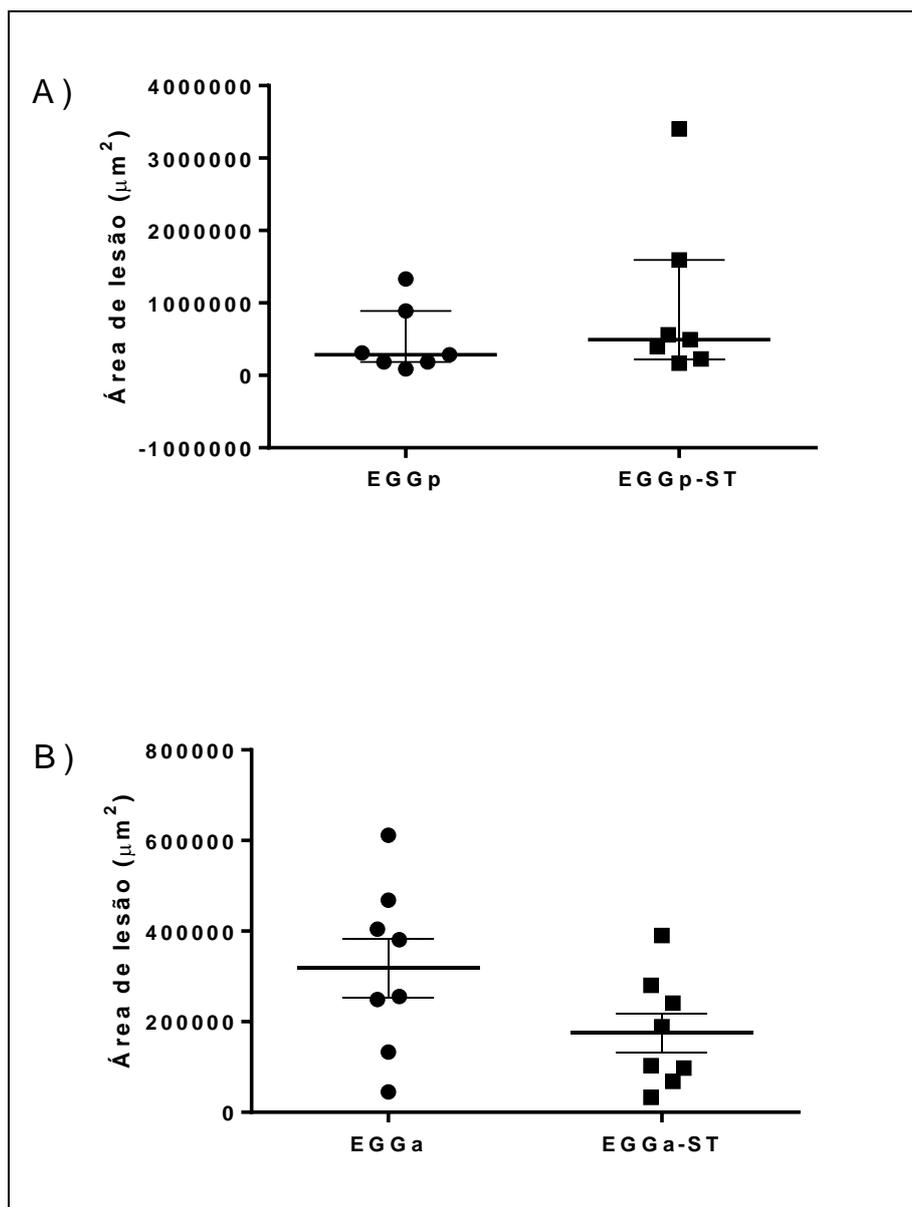


Gráfico 11: Análise quantitativa da área de lesão cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de lesão cecal dos ratos dos grupos EGGp e EGGp-ST, *Mann-Whitney test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%). B) Área de lesão cecal dos ratos dos grupos EGGa e EGGa-ST, *Unpaired t test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), n=8.

5.3 Análise histopatológica e quantitativa do infiltrado inflamatório

A parede cecal dos ratos do grupo CTRL apresentou aspecto histológico aparentemente normal (Figura 8A). Enquanto na parede cecal dos ratos do grupo ST, foi observado discreto infiltrado inflamatório na lâmina própria (Figura 8B). Já nos ratos infectados com *E. dispar* ou *E. histolytica*, infiltrado inflamatório misto composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos foram encontrados na lâmina própria, submucosa e, frequentemente, na muscular e na serosa, principalmente nos cecos de ratos com erosões e úlceras mais exuberantes. Também foi possível observar a presença de hiperemia e edema na submucosa. O ceco dos ratos dos grupos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar*, cepas EGGp, EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram com mais frequência, infiltrado inflamatório mais intenso, bem como mais hiperemia e edema que os ratos dos grupos somente infectados com *E. dispar* ou *E. histolytica* (Figura 8B-M).

Análise morfométrica do infiltrado inflamatório aos 7 dias após a infecção amebiana exibiu aumento significativo no número de células inflamatórias presentes na lâmina própria dos ratos dos grupo MCR-ST ($155,4 \pm 8,461$) quando comparados com os ratos dos grupos MCR ($99,44 \pm 7,137$), ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12A). Tal diferença também foi observada no grupo MCR ($99,44 \pm 7,137$) em relação os grupos controles ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12A).

Ao observarmos o ceco dos ratos infectados com as cepas ADO de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium* ($110,2 \pm 5,230$) foi possível identificar um aumento significativo do número de células inflamatórias presentes na lâmina própria, em relação aos ratos dos grupos ADO ($77,84 \pm 4,224$), ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12B). Também foi demonstrado pela análise quantitativa um aumento significativo do número de células inflamatórias em relação aos grupos controles ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12B).

A análise quantitativa do infiltrado inflamatório no ceco dos ratos pertencentes ao grupo VEJ-ST ($118,6 \pm 4,660$) demonstrou um aumento significativo no número de células presentes na lâmina própria quando comparado com o grupo VEJ ($69,43 \pm 4,844$), ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12C). Já a análise quantitativa do grupo VEJ ($69,43 \pm 4,844$) exibiu aumento significativo do

numero de células inflamatórias em relação ao grupo CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 12C). Tal diferença não foi observada em relação ao grupo ST ($59,84 \pm 4,279$) (Gráfico 12C).

Resultado similar aos grupos MCR-ST, ADO-ST e VEJ-ST ocorreu com o grupo EGGp-ST. Na análise quantitativa do ceco dos ratos pertencentes ao grupo EGGp-ST ($129,3 \pm 9,700$) foi possível identificar aumento significativo no número de células inflamatórias quando comparado com os grupos EGGp ($85,13 \pm 6,723$), ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 13A). Tal diferença também foi observada no grupo EGGp ($85,13 \pm 6,723$) que apresentou aumento significativo do infiltrado inflamatório quando comparado com os grupos ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 13A).

Em relação ao grupo EGGa-ST ($102,4 \pm 3,871$), este também demonstrou um aumento significativo no número de células inflamatórias em relação aos grupos EGGa ($80,30 \pm 7,374$), ST ($59,84 \pm 4,279$), e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 13B). A mesma diferença foi exibida no grupo EGGa ($80,30 \pm 7,374$) em relação aos grupos controles ST ($59,84 \pm 4,279$) e CTRL ($35,20 \pm 3,414$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 13B).

O grupo dos ratos somente infectados com *S. Typhimurium* ($59,84 \pm 4,279$), também apresentou diferença significativa no número de células inflamatórias quando comparados com o grupo CTRL ($35,20 \pm 3,414$) (Gráficos 12A,B,C, 13A, B) confirmando que o inóculo de *S. Typhimurium* utilizado em nossos experimentos não ocasionou um quadro de salmonelose.

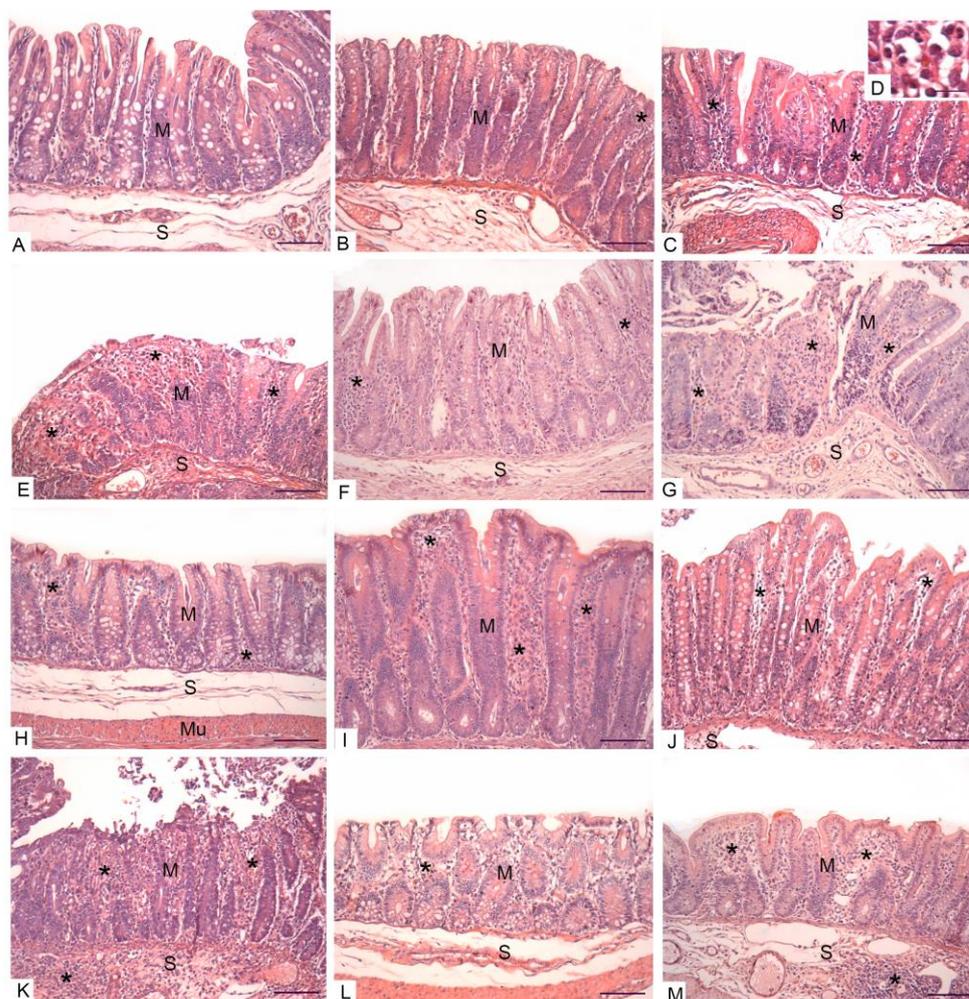


Figura 8. Ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST). A) Grupo CTRL: ceco de aspecto histológico normal; B) Grupo ST: discreto infiltrado inflamatório (*); C) Grupo MCR: aumento moderado do infiltrado inflamatório (*); D) Grupo MCR: detalhe da figura anterior mostrando infiltrado inflamatório misto; E) Grupo MCR-ST: infiltrado inflamatório com grande aumento do número de células (*); F) Grupo ADO: aumento moderado do número de células do infiltrado inflamatório (*); G) Grupo ADO-ST: infiltrado inflamatório com grande aumento do número de células (*); H) Grupo VEJ: aumento moderado do infiltrado inflamatório (*); I) Grupo VEJ-ST: intenso infiltrado inflamatório (*); J) Grupo EGGp: aumento moderado do infiltrado inflamatório (*); K) Grupo EGGp-ST: aumento intenso do número de células do infiltrado inflamatório (*); L) Grupo EGGa: infiltrado inflamatório com discreto aumento do número de células (*); M) EGGa-ST: aumento intenso do número de células do infiltrado inflamatório (*). (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se) serosa; barra=100µm.

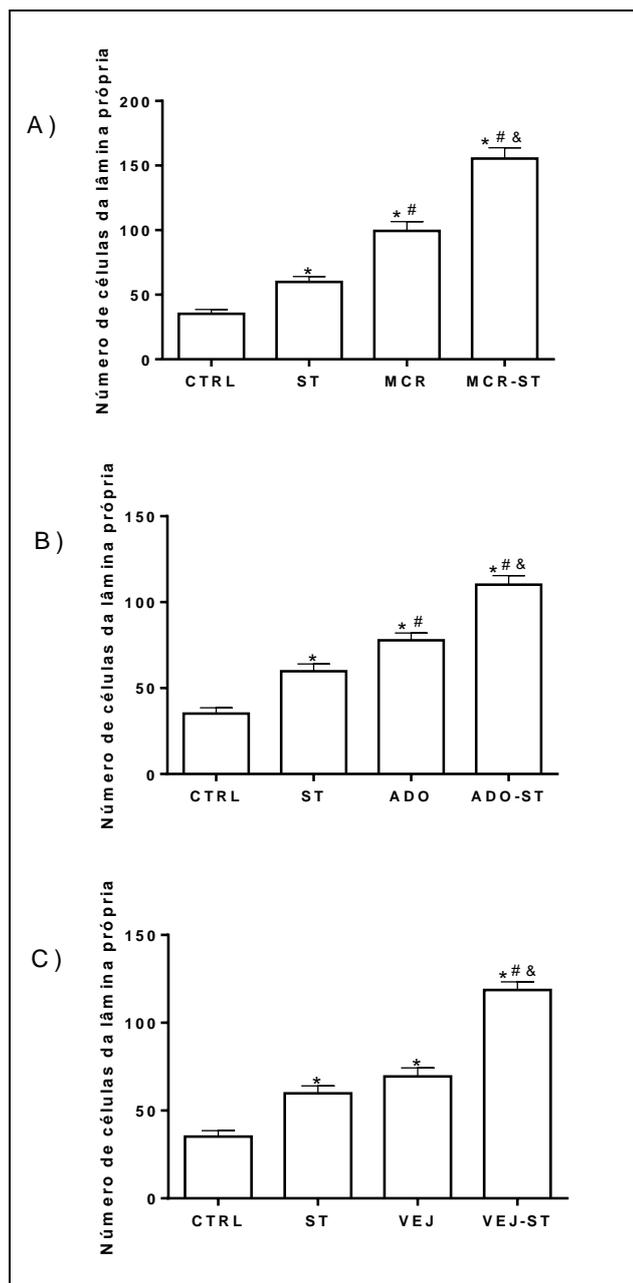


Gráfico 12: Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos dos grupos CTRL, ST, MCR e MCR-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs MCR, *one-way ANOVA test*. B) Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos dos grupos CTRL, ST, ADO e ADO-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs ADO, *one-way ANOVA test*. C) Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos dos grupos CTRL, ST, VEJ e VEJ-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs VEJ, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n=8$.

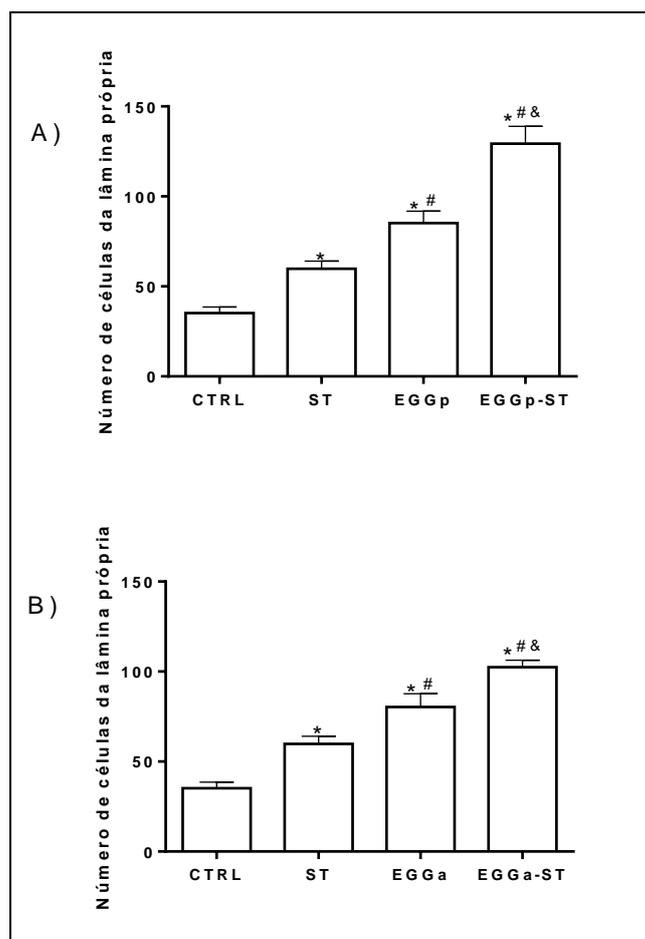


Gráfico 13: Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos dos grupos CTRL, ST, EGGp e EGGp-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs EGGp, *one-way ANOVA test*. B) Número de células inflamatórias da lâmina própria da mucosa cecal de ratos dos grupos CTRL, ST, EGGa e EGGa-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs EGGa, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n=8$.

5.4 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de IL-1 α

As áreas de marcações para IL-1 α foram identificadas através da presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática e intersticial (Figura 10), resultante da ligação do anticorpo monoclonal anti-IL-1 α de camundongo e da precipitação de diaminobenzidina. A remoção do anticorpo primário produziu reação negativa contra IL-1 α (Figura 9). Foram quantificadas as áreas positivas para IL-1 α

presentes nas células e no interstício da lâmina própria (Figura 10). Frequentemente foi possível visualizar que os ratos dos grupos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ, de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram com mais frequência na mucosa cecal, área positiva para IL-1 α maior do que os ratos dos grupos somente infectados com as cepas de *E. dispar* e dos ratos dos grupos ST e CTRL (Figura 10). Já os ratos infectados com as cepas EGGp e EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*, na maioria das vezes, não foi possível identificar aumento da área de marcação para IL-1 α (Figura 10). Somente o grupo EGGa-ST exibiu aumento da área de marcação em relação ao grupo CTRL (Figura 10).

A análise quantitativa da área de marcação para IL-1 α mostrou que os cecos dos ratos pertencentes ao grupo MCR-ST ($782,5 \mu\text{m}^2 \pm 76,49$) exibiram área de marcação positiva significativamente maior quando comparado com os ratos de todos os seus grupos controles MCR ($379,5 \mu\text{m}^2 \pm 29,49$), ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) ($177,9$ - $361,0$) e CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 14A). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos MCR ($379,5 \mu\text{m}^2 \pm 29,49$), CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) e ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) (Gráfico 14A).

Já o grupo ADO-ST ($523,5 \mu\text{m}^2 \pm 76,13$), apresentou área de marcação positiva para IL-1 α significativamente maior em relação aos grupos controles ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) e CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) ($p=0,0212$) (Gráfico 14B). Não ocorreu diferença significativa no grupo ADO-ST ($523,5 \mu\text{m}^2 \pm 76,13$) em relação ao seu controle ADO ($336,9 \mu\text{m}^2 \pm 39,75$). Também não ocorreram diferenças significativas entre os grupos ADO ($336,9 \mu\text{m}^2 \pm 39,75$), CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) e ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) (Gráfico 14B).

Resultado similar ao grupo MCR-ST ocorreu com o grupo VEJ-ST ($604,3 \mu\text{m}^2 \pm 79,76$) que também apresentou área de marcação para IL-1 α significativamente maior quando comparado com os seus grupos controles VEJ ($258,3 \mu\text{m}^2 \pm 31,71$), ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) e CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 14C). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos VEJ ($258,3 \mu\text{m}^2 \pm 31,71$), CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) e ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) (Gráfico 14A).

Já os ratos do grupo EGGp-ST ($381,5 \mu\text{m}^2$) ($329,5$ - $424,4$), EGGp ($222,5 \mu\text{m}^2$) ($148,1$ - $293,5$), ST ($243,1 \mu\text{m}^2$) ($177,9$ - $361,0$) e CTRL ($260,1 \mu\text{m}^2$) ($107,8$ - $357,8$), não exibiram entre eles diferenças significativas para marcação de IL-1 α (Gráfico 15A).

O grupo EGGa-ST ($443,9 \mu\text{m}^2 \pm 54,22$) exibiu aumento significativo da área de marcação positiva para IL-1 α em relação ao grupo CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) ($p=0,0234$) (Gráfico 15B). Entretanto, em relação aos grupos EGGa ($318,1 \mu\text{m}^2 \pm 43,99$) e ST ($273,8\mu\text{m}^2 \pm 42,81$), não foram observadas diferenças (Gráfico 15B). Do mesmo modo não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos EGGa ($318,1 \mu\text{m}^2 \pm 43,99$), CTRL ($240,3 \mu\text{m}^2 \pm 43,61$) e ST ($273,8 \mu\text{m}^2 \pm 42,81$) (Gráfico 15B).

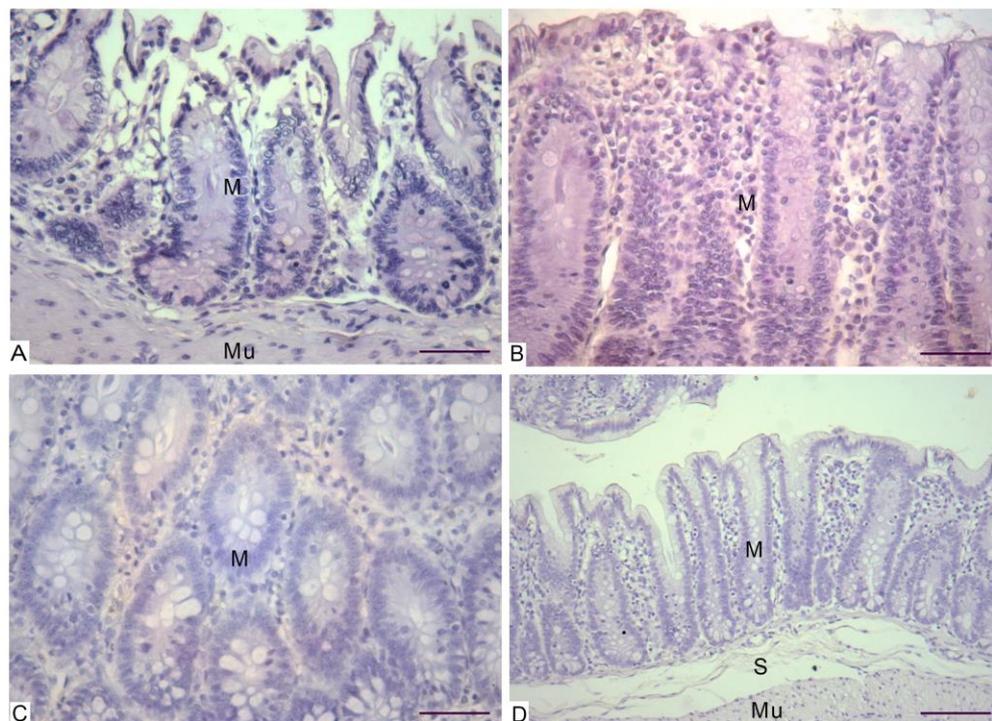


Figura 9. Ceco de rato infectado com a cepa ADO de *E. dispar*. Controles negativos das reações imuno-histoquímicas para IL-1 α , IL-4, COX-2 e MUC-2. A) Reação negativa negativo para IL-1 α , barra = 50 μ m; B) Reação negativa negativo para IL-4, barra = 50 μ m; C) Reação negativa negativo para COX-2, barra = 50 μ m; C) Reação negativa negativo para MUC-2, barra = 100 μ m. (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se) serosa. Contracoloração com Hematoxilina de Harris.

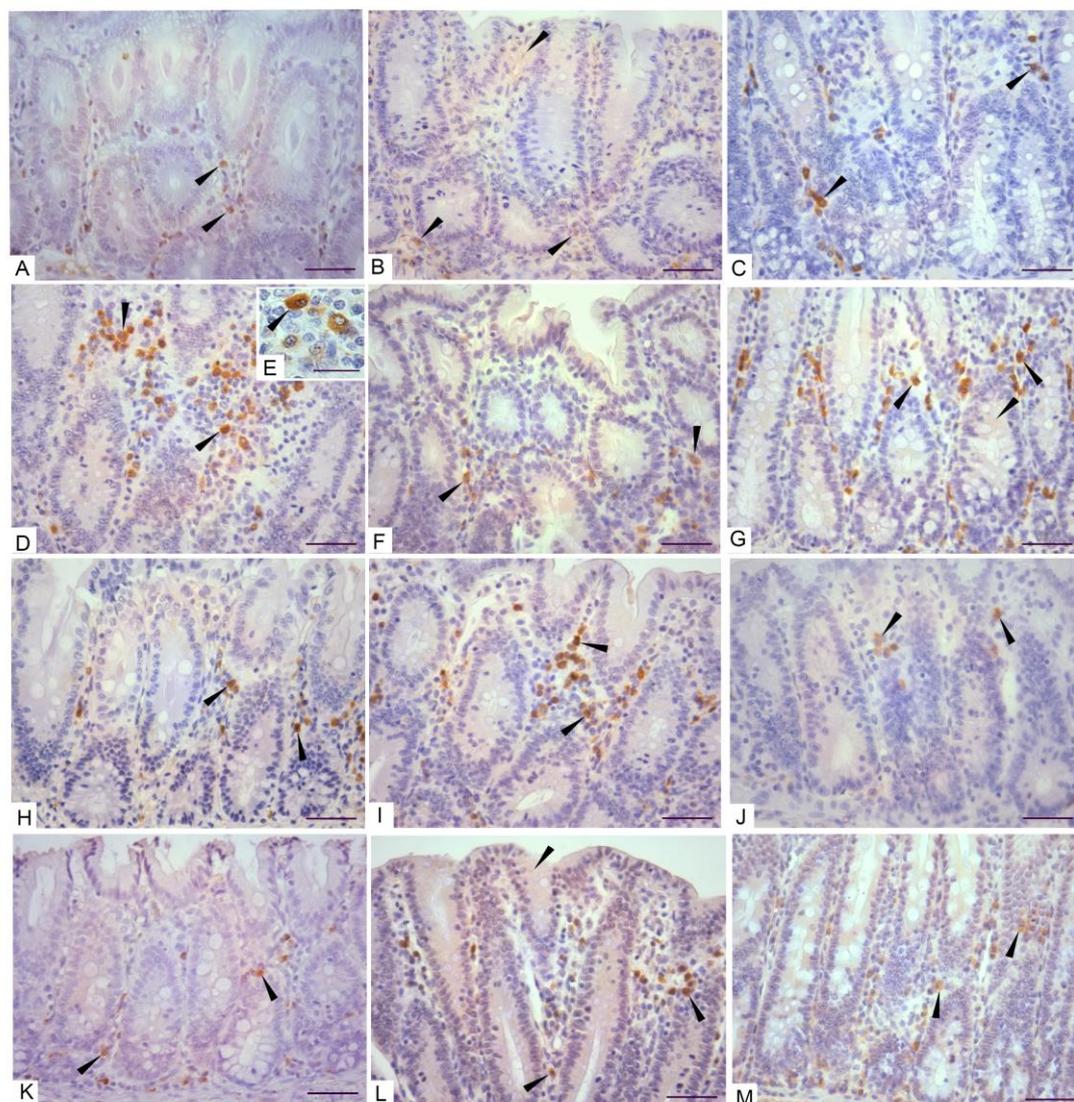


Figura 10. Reação imuno-histoquímica para IL-1 α no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST). Áreas positivas para IL-1 α (IL-1 α +) foram identificadas em localização citoplasmática e intersticial. A) Grupo CTRL: reação IL-1 α (cabeças de seta); B) Grupo ST: área de marcação para IL-1 α semelhante ao demonstrado na figura anterior (cabeças de seta); C) Grupo MCR: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura anterior; D) Grupo MCR-ST: aumento da área de marcação IL-1 α (cabeças de seta); E) Grupo MCR-ST: detalhe da figura anterior mostrando marcação IL-1 α citoplasmática (cabeça de seta); F) Grupo ADO: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); G) Grupo ADO-ST: aumento da área de marcação IL-1 α (cabeças de seta); H) Grupo VEJ: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); I) Grupo VEJ-ST: aumento da área de marcação IL-1 α (cabeças de seta); J) Grupo EGGp: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); K) Grupo EGGp-ST: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); L) Grupo EGGa: área de marcação IL-1 α semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); M) EGGa-ST: aumento da área de marcação IL-1 α (cabeças de seta). Contracoloração com Hematoxilina de Harris, barra = 100 μ m.

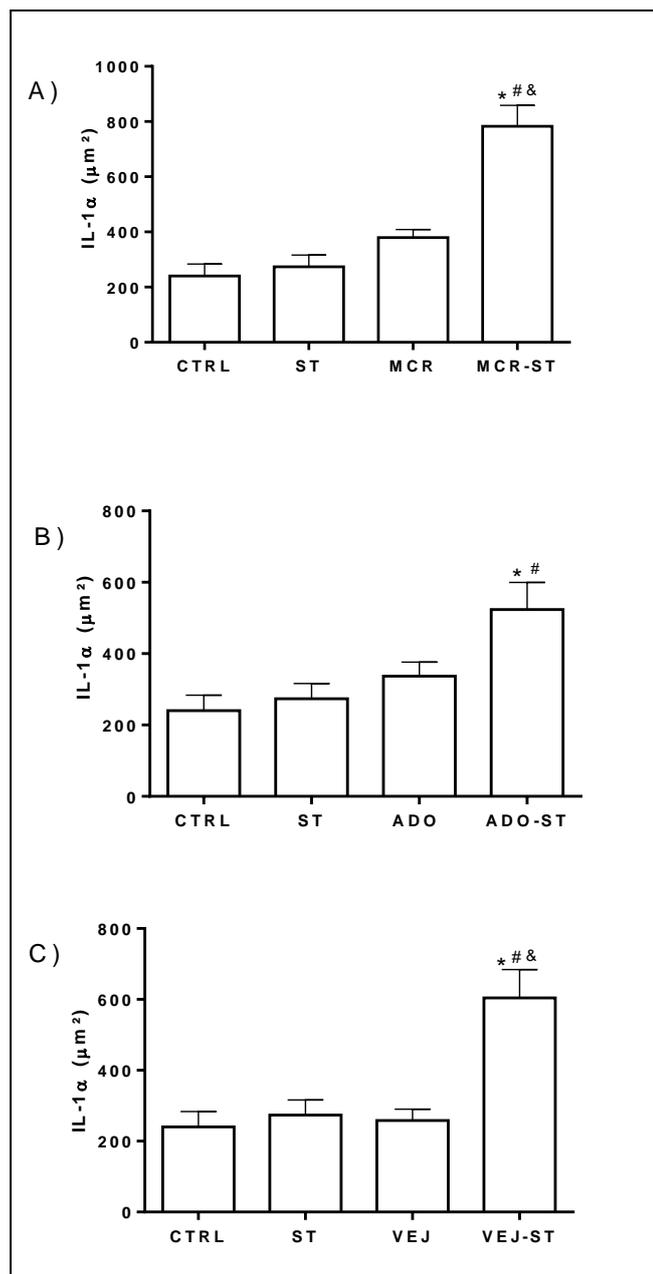


Gráfico 14: Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, MCR e MCR-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs MCR, *one-way ANOVA test*. B) Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, ADO e ADO-ST; * $p = 0,0212$ vs CTRL; # $p = 0,0212$ vs ST, *one-way ANOVA test*. C) Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, VEJ e VEJ-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs VEJ, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n = 8$.

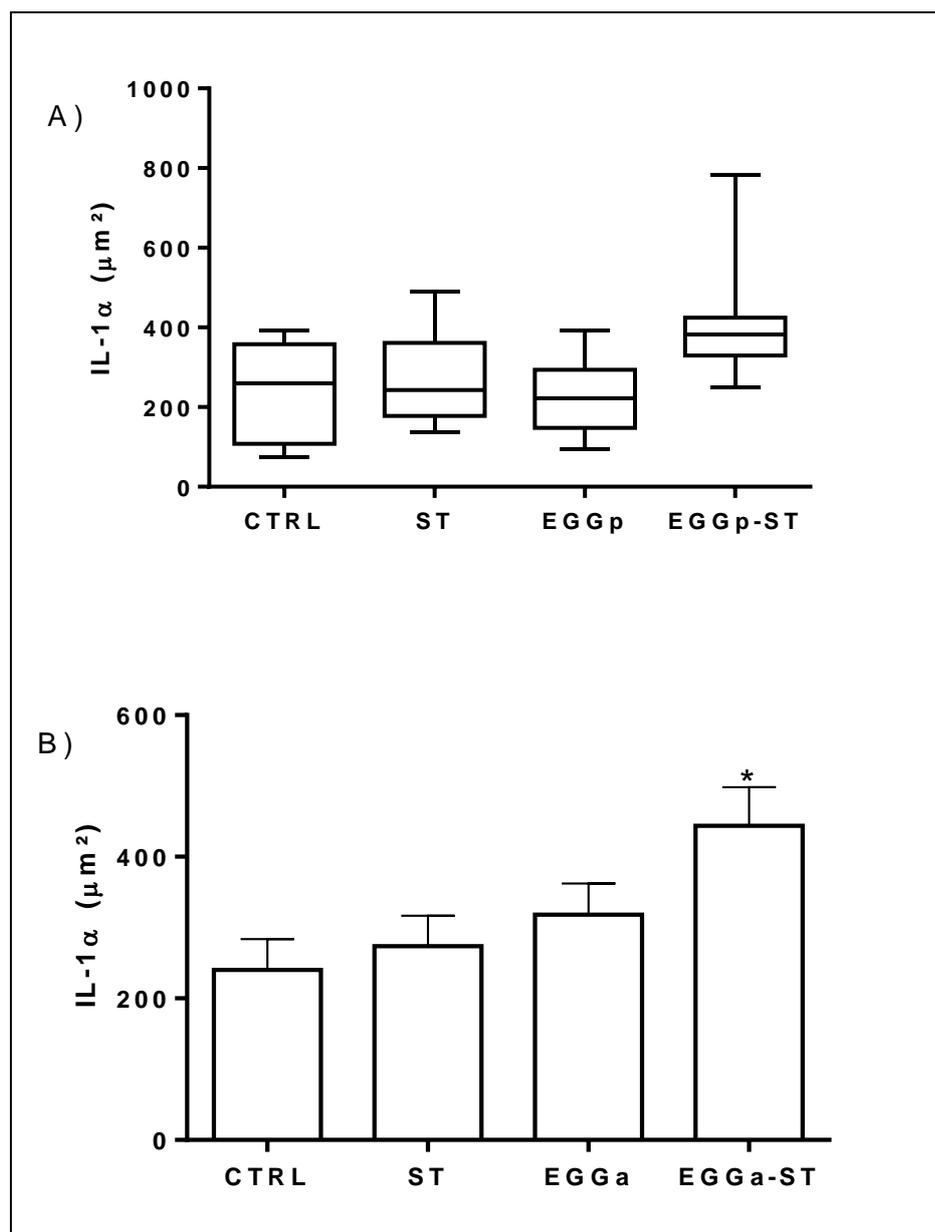


Gráfico 15: Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGp e EGGp-ST, *Kruskal-Wallis test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%). B) Área de marcação positiva para IL-1 α na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGa e EGGa-ST; * $p=0,0234$ vs CTRL, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n=8$.

5.5 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de IL-4

Áreas de marcações positivas para IL-4 foram identificadas pela presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática e intersticial (Figura 11), resultante da reação do anticorpo monoclonal anti-IL-4 de camundongo e da precipitação de diaminobenzidina. A remoção do anticorpo primário produziu reação negativa contra IL-4 (Figura 9). Foram quantificadas todas as áreas positivas para IL-4 presentes nas células e no interstício da lâmina própria (Figura 11). Foi possível visualizar que os grupos infectados com as cepas ADO e VEJ de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram na mucosa cecal, menor imunomarcagem para IL-4 em relação aos grupos infectados somente com as cepas de *E. dispar* (Figura 11). Tal redução não ocorreu com os ratos dos grupos infectados com as cepas ADO e VEJ de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium* em relação aos ratos dos grupos controles ST e CTRL, onde não foi possível observar nenhuma diferença na marcação (Figura 11).

Também foi possível observar aumento da marcação de IL-4 no ceco de ratos dos grupos infectados somente com trofozoítos amebianos das cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* em relação ao grupo controle ST (Figura 11). Tal resultado não ocorreu em relação ao grupo CTRL.

Ao observarmos o ceco dos ratos infectados com as cepas EGGp e EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium* foi possível identificar redução da área de marcação para IL-4 em relação aos ratos dos grupos somente infectados com as cepas EGGp e EGGa de *E. histolytica* (Figura 11). Já os ratos infectados somente com a cepa EGGp de *E. histolytica* exibiram na mucosa cecal maior marcação positiva para IL-4 em relação aos ratos dos grupos CTRL e ST (Figura 11). O mesmo não ocorreu com os ratos infectados com a cepa EGGa de *E. histolytica*, onde não foi possível identificar diferenças na marcação positiva para IL-4 em relação aos grupos controles CTRL e ST (Figura 11).

A análise quantitativa da área de marcação para IL-4 corroborou com o observado na análise qualitativa, permitindo verificar que os cecos do grupo MCR ($377,5 \mu\text{m}^2 \pm 64,92$) exibiram aumento significativo da área de marcação positiva para IL-4, quando comparado com o grupo controle ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) ($p=0,0050$) (Gráfico 16A). Já em relação aos grupos CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$) e MCR-ST ($212,5$

$\mu\text{m}^2 \pm 52,70$) não ocorreram diferenças significativas (Gráfico 16A). Também não ocorreram diferenças significativas na área de marcação para IL-4 entre os grupos controles CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$), ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) e MCR-ST ($212,5 \mu\text{m}^2 \pm 52,70$) (Gráfico 16A).

Quando avaliado quantitativamente o grupo ADO-ST ($53,36 \mu\text{m}^2 \pm 13,46$) foi possível identificar a ocorrência de uma redução significativa na área de marcação para IL-4 em relação ao grupo ADO ($324,4 \mu\text{m}^2 \pm 60,80$) ($p=0,0003$) (Gráfico 16B). Já a análise quantitativa do grupo ADO ($324,4 \mu\text{m}^2 \pm 60,80$) exibiu um aumento significativo da área de marcação para IL-4 quando comparado com o grupo controle ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) ($p=0,0003$) (Gráfico 16B). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos ADO-ST ($53,36 \mu\text{m}^2 \pm 13,46$), CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$) e ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) (Gráfico 16B).

Resultado similar ocorreu com o grupo VEJ-ST ($63,48 \mu\text{m}^2 \pm 7,139$) onde ocorreu redução significativa na área de marcação para IL-4 em relação ao grupo VEJ ($376,6 \mu\text{m}^2 \pm 91,62$) ($p=0,0010$) (Gráfico 16C). Já a análise quantitativa do grupo VEJ ($376,6 \mu\text{m}^2 \pm 91,62$) apresentou aumento significativo da área de marcação para IL-4 em relação ao grupo controle ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) (Gráfico 16B). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos VEJ-ST ($63,48 \mu\text{m}^2 \pm 7,139$), CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$) e ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) (Gráfico 16B).

Também foi constatada diferença significativa no grupo EGGp-ST ($240,2 \mu\text{m}^2 \pm 21,09$), que apresentou redução da área de marcação positiva para IL-4 em relação ao grupo EGGp ($556,1 \mu\text{m}^2 \pm 120,7$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 17A). Entretanto, em relação aos grupos CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$) e ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$), não foram observadas diferenças (Gráfico 17A). Além disso, ocorreu aumento significativo na marcação de IL-4 no grupo EGGp ($556,1 \mu\text{m}^2 \pm 120,7$) em relação aos grupos controles CTRL ($205,5 \mu\text{m}^2 \pm 39,51$) e ST ($113,7 \mu\text{m}^2 \pm 22,50$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 17A).

Já os ratos do grupo EGGa-ST ($63,92 \mu\text{m}^2$) (21,13 - 151,3) exibiram redução significativa da área de marcação para IL-4 quando comparados ao grupo EGGa ($287,2 \mu\text{m}^2$) (158,0 - 536,0) ($p=0,0153$) (Gráfico 17B). Entretanto, em relação aos grupos CTRL ($204,8 \mu\text{m}^2$) (108,8 - 299,9) e ST ($107,4 \mu\text{m}^2$) (70,18 - 166,6), não foram observadas diferenças (Gráfico 17B). Também não ocorreu diferença significativa entre os grupos EGGa ($287,2 \mu\text{m}^2$) (158,0 - 536,0), CTRL ($204,8 \mu\text{m}^2$) (108,8 - 299,9) e ST

(107,4 μm^2) (70,18 - 166,6), em relação à área de marcação positiva para IL-4 (Gráfico 17B).

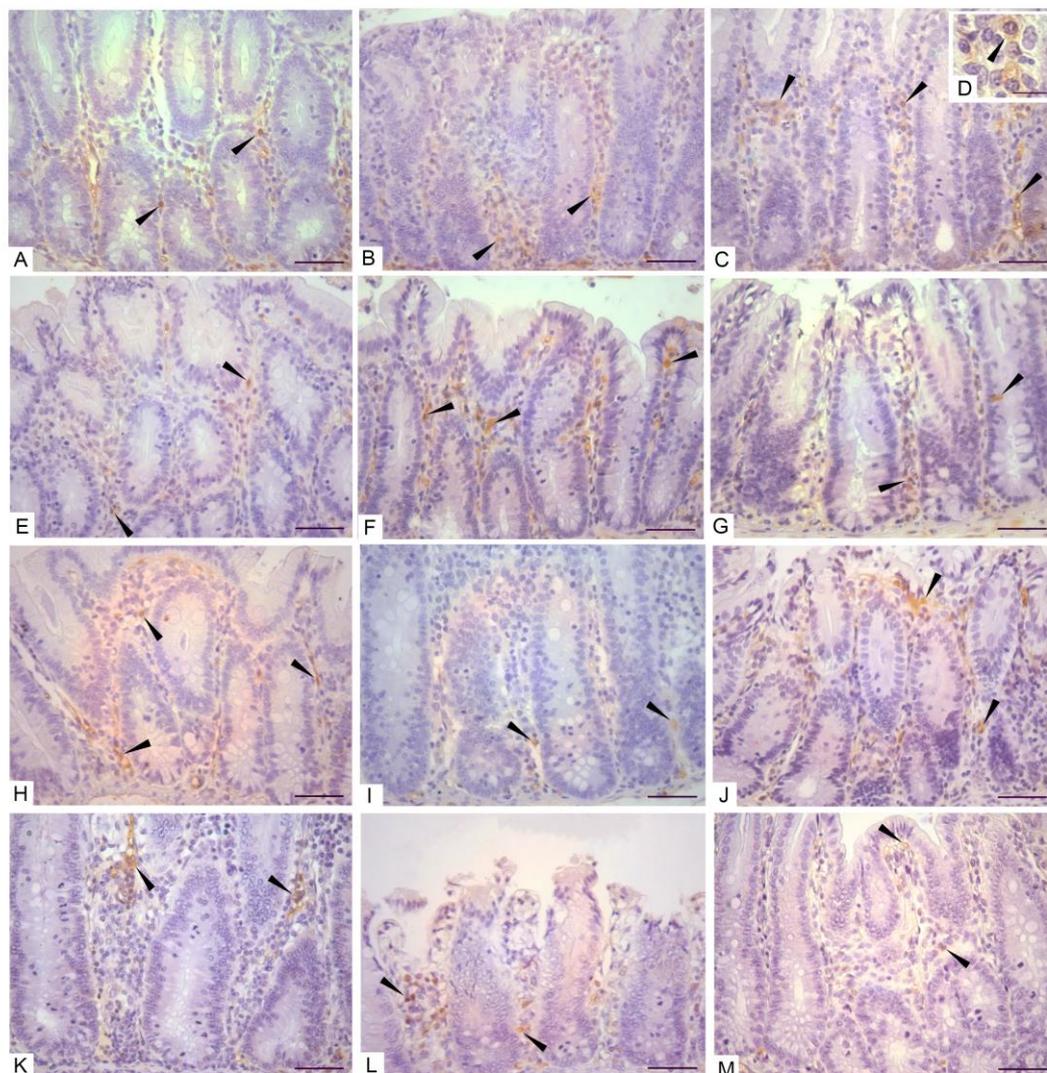


Figura 11. Reação imuno-histoquímica para IL-4 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST). Áreas positivas para IL-4 (IL-4+) foram identificadas pela presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática e intersticial. A) Grupo CTRL: reação IL-4+ (cabeças de seta); B) Grupo ST: área de marcação IL-4+ semelhante ao demonstrado na figura anterior (cabeças de seta); C) Grupo MCR: aumento da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); D) Grupo MCR: detalhe da figura anterior mostrando marcação IL-4+ citoplasmática (cabeça de seta); E) Grupo MCR-ST: área de marcação IL-4+ semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); F) Grupo ADO: aumento da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); G) Grupo ADO-ST: redução da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); H) Grupo VEJ: aumento da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); I) Grupo VEJ-ST: redução da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); J) Grupo EGGp: aumento da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); K) Grupo EGGp-ST: redução da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta); L) Grupo EGGa: área de marcação IL-4+ semelhante à demonstrada na figura B (cabeças de seta); M) EGGa-ST: redução da área de marcação IL-4+ (cabeças de seta). Contracoloração com Hematoxilina de Harris, barra = 100 μ m.

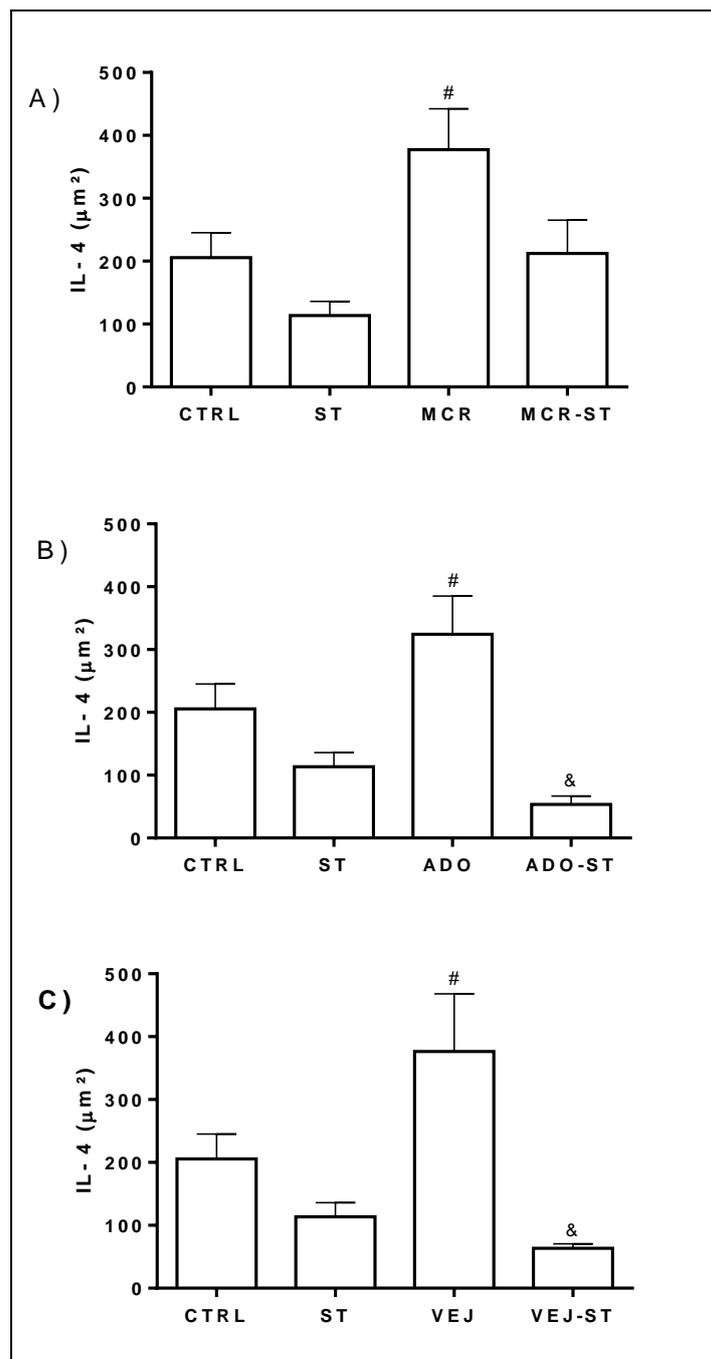


Gráfico 16: Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, MCR e MCR-ST; # $p=0,0050$ vs ST, *one-way ANOVA test*. B) Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, ADO e ADO-ST; # $p=0,0003$ vs ST; & $p=0,0003$ vs ADO, *one-way ANOVA test*. C) Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, VEJ e VEJ-ST; # $p=0,0010$ vs ST; & $p=0,0010$ vs VEJ, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n=8$.

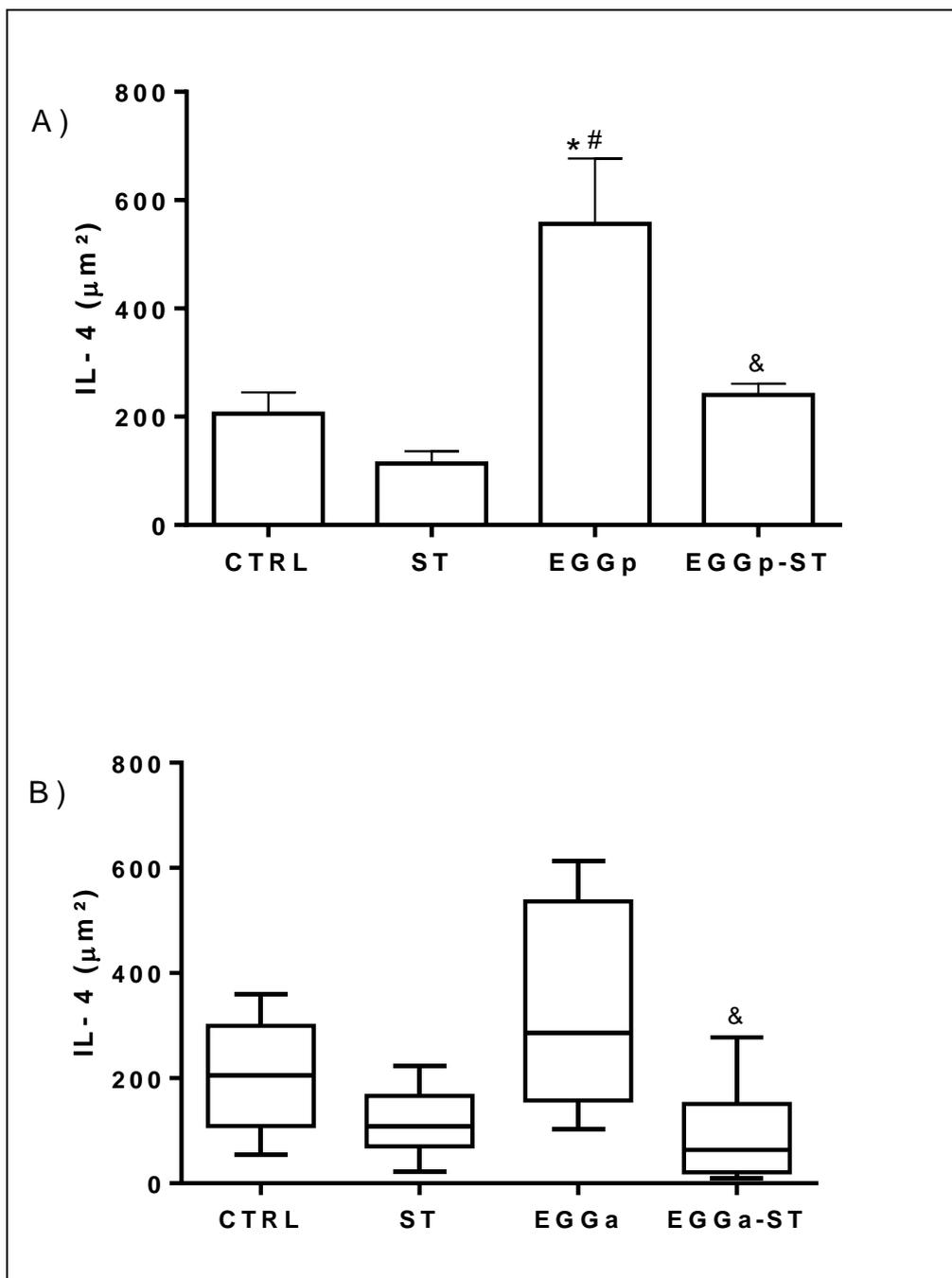


Gráfico 17: Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGp e EGGp-ST; *p < 0,0001 vs CTRL; #p < 0,0001 vs ST; &p < 0,0001 VS EGGp, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média ± SEM). B) Área de marcação positiva para IL-4 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGa e EGGa-ST; &p = 0,0153 vs EGGa, *Kruskal-Wallis test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%), n=8.

5.6 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de COX-2

As áreas com marcações positivas para COX-2 apresentaram coloração marrom escura, de localização citoplasmática e intersticial (Figura 12), proveniente da reação do anticorpo monoclonal anti-COX-2 de camundongo e pela precipitação de diaminobenzidina. A remoção do anticorpo primário produziu reação negativa contra COX-2 (Figura 9). Foram quantificadas todas as áreas positivas para COX-2 presentes nas células e no interstício da lâmina própria (Figura 12).

Foi possível visualizar que os ratos dos grupos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica* ambos co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram na mucosa cecal, área positiva maior para COX-2, quando comparados com os grupos controles CTRL e ST (Figura 12). Além disso, os ratos do grupo infectados com a cepa ADO e co-infectados com *S. Typhimurium* também exibiram maior área de marcação para COX-2 em relação aos ratos do grupo infectados somente com a cepa ADO de *E. dispar* (Figura 12). Não foram verificadas diferenças na área de marcação positiva para COX-2 entre os grupos infectados somente com as cepas de *E. dispar* ou com cepas de *E. histolytica* quando comparados com os grupos controles CTRL e ST.

A análise quantitativa da área de marcação para COX-2 corroborou com o observado na análise qualitativa, permitindo observar que os cecos dos ratos pertencentes ao grupo MCR-ST ($1171 \mu\text{m}^2$) (149,6 - 5104) demonstraram um aumento significativo da área de marcação positiva para COX-2, quando comparado com os grupos controles CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38), ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) ($p=0,0002$) (Gráfico 18A). Tal diferença não ocorreu quando comparado com o grupo MCR ($68,61 \mu\text{m}^2$) (51,83 - 136,7) (Gráfico 18A). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos MCR ($68,61 \mu\text{m}^2$) (51,83 - 136,7), CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) (Gráfico 18A).

No grupo ADO-ST ($540,1 \mu\text{m}^2$) (289,8 - 936,4) também ocorreu aumento significativo na área de marcação para COX-2 em relação ao grupo ADO ($8,067 \mu\text{m}^2$) (4,383 - 11,91) e aos grupos controles CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38), ST ($0,0 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) ($p=0,0041$) (Gráfico 18B). Não foram demonstradas diferenças significativas entre os grupos ADO ($8,067 \mu\text{m}^2$) (4,383 - 11,91), CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) (Gráfico 18B).

Análise quantitativa do grupo VEJ-ST ($18016 \mu\text{m}^2$) (1816 - 20641) também exibiu um aumento significativo da área de marcação para COX-2 quando comparado com os grupos controles CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) ($p=0,0002$) (Gráfico 18C). Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos VEJ ($93,10 \mu\text{m}^2$) (7,727 - 166,5), CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($0,0 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) (Gráfico 18C).

O grupo EGGp-ST ($1111 \mu\text{m}^2$) (380,8 - 2597) apresentou aumento significativo da área de marcação positiva para COX-2 em relação aos grupos controles CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80) ($p=0,0006$) (Gráfico 19A). Quando avaliados quantitativamente os grupos EGGp ($61,69 \mu\text{m}^2$) (31,65 - 212,5), CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($9,375 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80), não foram observadas diferenças significativas entre eles (Gráfico 19A).

Os grupos EGGa-ST ($24,87 \mu\text{m}^2$) (1,652 - 55,92), EGGa ($40,17 \mu\text{m}^2$) (21,31 - 120,1), CTRL ($3,521 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 62,38) e ST ($0,0 \mu\text{m}^2$) (0,0 - 42,80), também não exibiram diferenças significativas entre eles (Gráfico 19B).

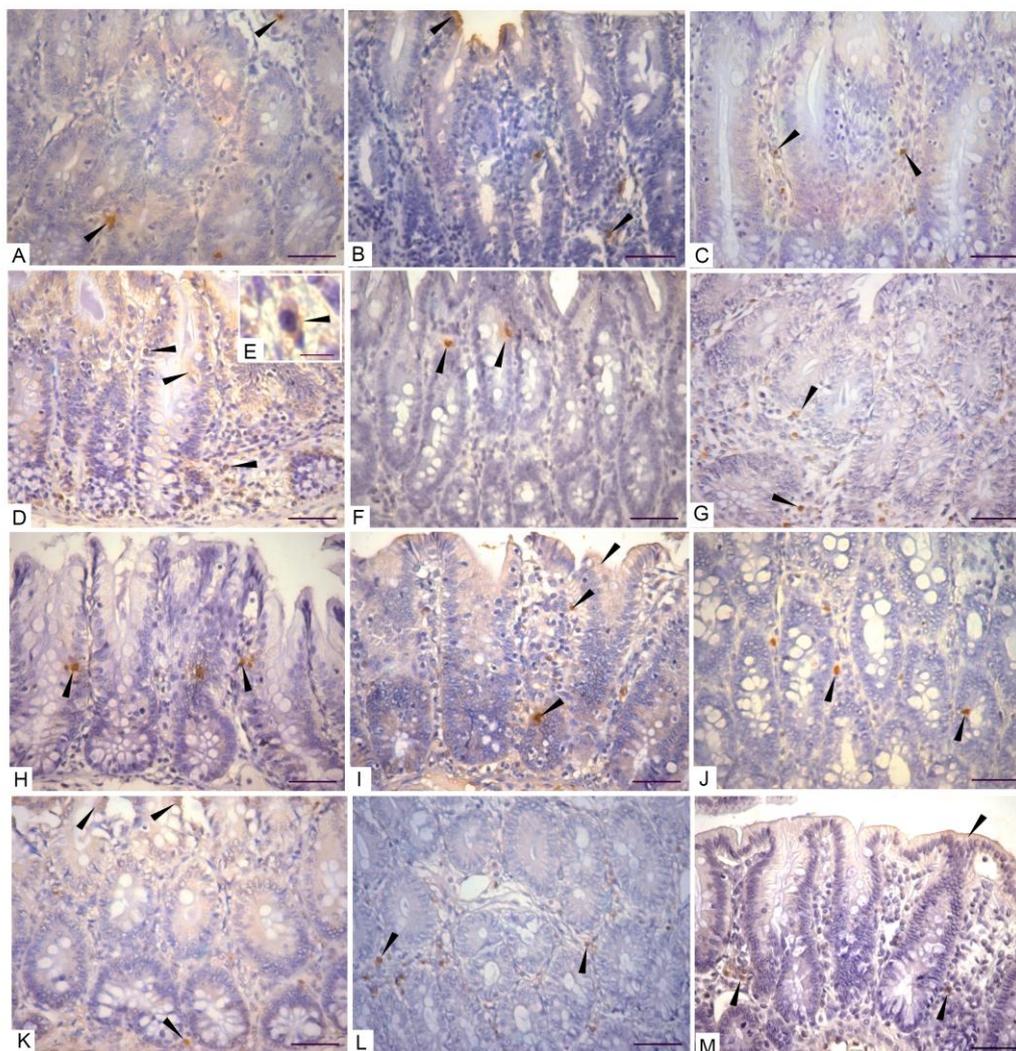


Figura 12. Reação imuno-histoquímica para COX-2 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST). Áreas positivas para COX-2 (COX-2+) foram identificadas pela presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática e intersticial. A) Grupo CTRL: reação COX-2+ (cabeças de seta); B) Grupo ST: área de marcação para COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura anterior (cabeças de seta); C) Grupo MCR: área de marcação COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta); D) Grupo MCR-ST: aumento da área de marcação COX-2+ (cabeças de seta); E) Grupo MCR-ST: detalhe da figura anterior mostrando marcação COX-2+ citoplasmática (cabeça de seta); F) Grupo ADO: área de marcação para COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta); G) Grupo ADO-ST: aumento da área de marcação COX-2+ (cabeças de seta); H) Grupo VEJ: área de marcação COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta); I) Grupo VEJ-ST: aumento da área de marcação COX-2+ (cabeças de seta); J) Grupo EGGp: área de marcação para COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta); K) Grupo EGGp-ST: aumento da área de marcação para COX-2+ (cabeças de seta); L) Grupo EGGa: área de marcação COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta); M) EGGa-ST: área de marcação COX-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de seta). Contracoloração com Hematoxilina de Harris, barra = 100 µm.

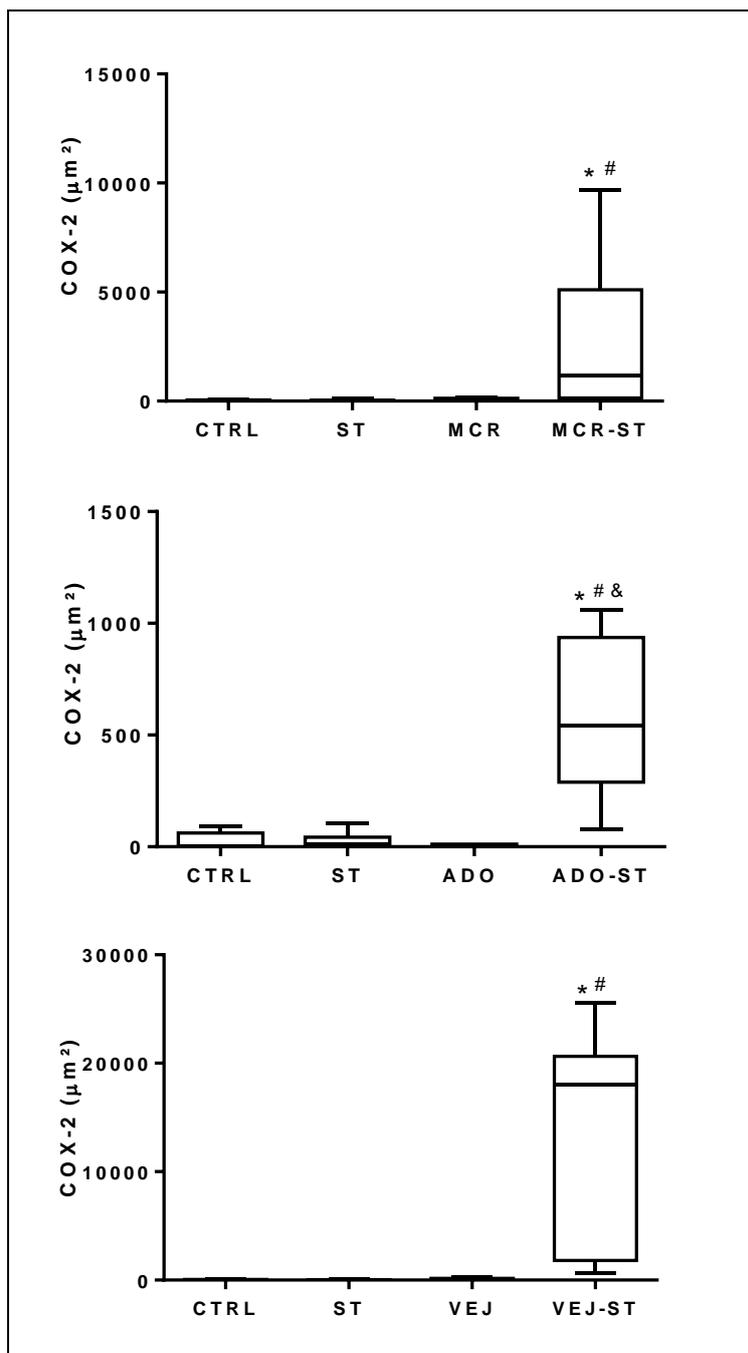


Gráfico 18: Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, MCR e MCR-ST; * $p=0,0002$ vs CTRL; # $p=0,0002$ vs ST, *Kruskal-Wallis test*. B) Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, ADO e ADO-ST; * $p=0,0041$ vs CTRL; # $p=0,0041$ vs ST; & $p=0,0041$ vs ADO, *Kruskal-Wallis test*. C) Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, VEJ e VEJ-ST; * $p=0,0002$ vs CTRL; # $p=0,0002$ vs ST, *Kruskal-Wallis test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%), $n=8$.

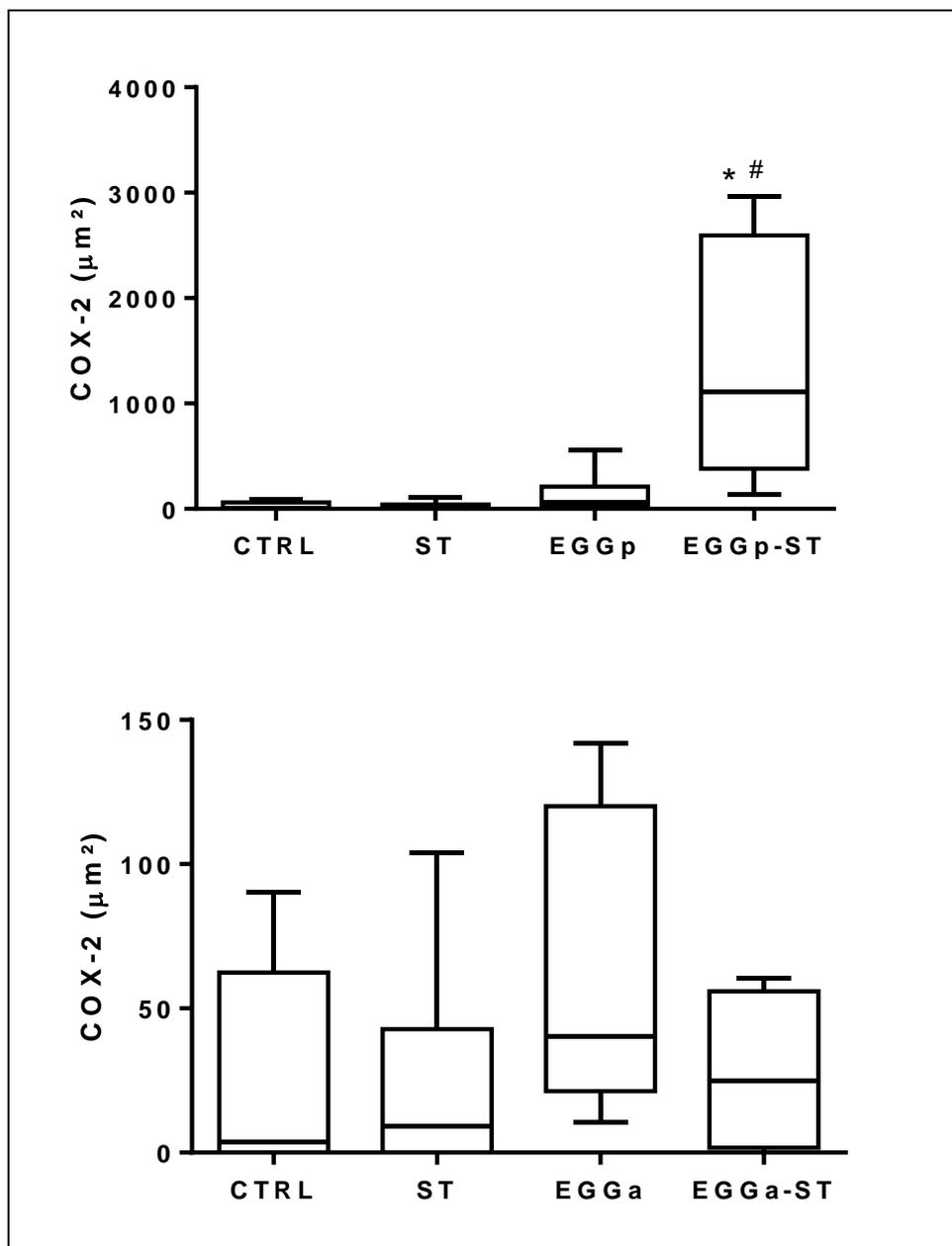


Gráfico 19: Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGp e EGGp-ST; * $p=0,0006$ vs CTRL; # $p=0,0006$ vs ST, *Kruskal-Wallis test*. B) Área de marcação positiva para COX-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGa e EGGa-ST, *Kruskal-Wallis test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%), $n=8$.

5.7 Análise qualitativa e quantitativa da expressão de MUC-2

As áreas de marcações positivas para MUC-2 foram identificadas através da presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática em células caliciformes, no lúmen das criptas e na superfície do epitélio de revestimento (Figura 13). A marcação positiva para MUC-2 foi resultante da ligação do anticorpo monoclonal anti-MUC2 de coelho e da precipitação de diaminobenzidina. A remoção do anticorpo primário produziu reação negativa contra MUC-2 (Figura 9). Foram quantificadas todas as áreas positivas para MUC-2 presentes nas células caliciformes, no lúmen das criptas e na superfície do epitélio de revestimento.

Foi possível visualizar que os grupos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica* co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram de modo geral, maior área positiva para MUC-2 na mucosa cecal, quando comparados com os ratos dos grupos controles CTRL, ST e seus respectivos controles somente infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica* (Figura 13). O mesmo não ocorreu quando foram comparados os ratos do grupo infectado com a cepa EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium* e, o ratos pertencentes ao grupo somente infectado com a cepa EGGa de *E. histolytica* e grupos controles CTRL e ST (Figura 13).

Ao realizarmos a análise quantitativa da área de marcação de MUC-2 no ceco dos ratos pertencentes ao grupo MCR-ST ($4488 \mu\text{m}^2 \pm 610,6$) foi possível identificar área de marcação positiva para MUC-2 significativamente maior quando comparado com os ratos de todos os seus grupos controles MCR ($2071 \mu\text{m}^2 \pm 477,7$), ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) e CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) ($p < 0,0001$) (Gráfico 20A). Não ocorreram diferenças significativas entre os grupos MCR ($2071 \mu\text{m}^2 \pm 477,7$), ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) e CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) (Gráfico 20A).

Já o grupo ADO-ST ($2677 \mu\text{m}^2 \pm 263,5$) apresentou área de marcação positiva para MUC-2 significativamente maior em relação aos grupos ADO ($1414 \mu\text{m}^2 \pm 466,6$) e CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) ($p = 0,0019$) (Gráfico 20B). Não ocorreu diferença significativa no grupo ADO-ST ($2677 \mu\text{m}^2 \pm 263,5$) em relação ao grupo controle ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) (Gráfico 20B). A análise quantitativa não identificou diferenças

significativas entre os grupos ADO ($1414 \mu\text{m}^2 \pm 466,6$), ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) e CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) (Gráfico 20B).

Também foi constatado aumento significativo da marcação de MUC-2 no grupo VEJ-ST ($3328 \mu\text{m}^2 \pm 607,5$), em relação aos grupos controles CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) e ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) ($p=0,0276$) (Gráfico 20C). Não foi observada diferença significativa no grupo VEJ-ST ($3328 \mu\text{m}^2 \pm 607,5$) quando comparado com o grupo VEJ ($1947 \mu\text{m}^2 \pm 450,5$) (Gráfico 20C). Resultado similar ocorreu com os grupos VEJ ($1947 \mu\text{m}^2 \pm 450,5$), ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) e CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) onde não foram exibidas diferenças significativas entre eles (Gráfico 20C).

A análise estatística da área de marcação de MUC-2 no ceco dos ratos pertencentes ao grupo EGGp-ST ($4301 \mu\text{m}^2 \pm 533,6$) demonstrou aumento significativo da área de marcação positiva para MUC-2 em relação ao grupo EGGp ($1754 \mu\text{m}^2 \pm 537,5$), CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) e ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) ($p=0,0497$) (Gráfico 21A). A análise quantitativa não identificou diferenças significativas entre os grupos EGGp ($1754 \mu\text{m}^2 \pm 537,5$), CTRL ($797,5 \mu\text{m}^2 \pm 79,09$) e ST ($1655 \mu\text{m}^2 \pm 266,2$) (Gráfico 21A).

Em relação aos grupos EGGa-ST ($4018 \mu\text{m}^2$) (3272 - 5596), EGGa ($1702 \mu\text{m}^2$) (306,0 - 2525), CTRL ($768,7 \mu\text{m}^2$) (709,2 - 848,7) e ST ($1630 \mu\text{m}^2$) (1124 - 2094), não foram observadas diferenças significativa entre eles quanto à área de marcação positiva para MUC-2 (Gráfico 21B).

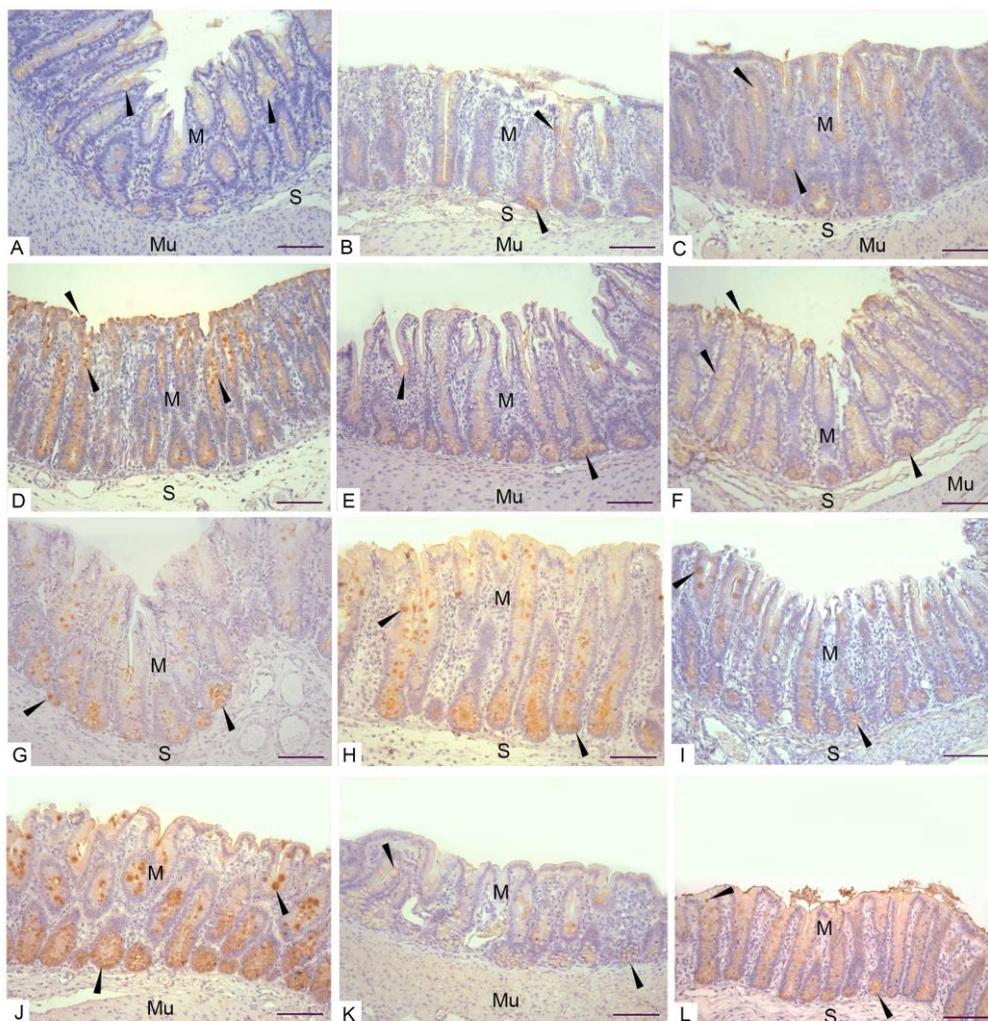


Figura 13. Reação imuno-histoquímica para MUC-2 no ceco de ratos não infectados (CTRL), infectados com *S. Typhimurium* (ST), *E. dispar* (MCR, ADO, VEJ) ou *E. histolytica* (EGGp, EGGa) e co-infectados com *S. Typhimurium* (MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST, EGGp-ST, EGGa-ST). Áreas positivas para MUC-2 (MUC-2+) estão presentes nas células caliciformes, no lúmen das criptas e na superfície do epitélio de revestimento. A) Grupo CTRL: reação MUC-2+ (cabeças de setas); B) Grupo ST: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura anterior (cabeças de setas); C) Grupo MCR: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas); D) Grupo MCR-ST: aumento da área de marcação MUC-2+ (cabeças de setas); E) Grupo ADO: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas); F) Grupo ADO-ST: aumento da área de marcação MUC-2+ (cabeças de setas); G) Grupo VEJ: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas); H) Grupo VEJ-ST: aumento da área de marcação MUC-2+ (cabeças de setas); I) Grupo EGGp: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas); J) Grupo EGGp-ST: aumento da área de marcação MUC-2+ (cabeças de setas); K) Grupo EGGa: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas); L) EGGa-ST: área de marcação MUC-2+ semelhante ao demonstrado na figura B (cabeças de setas). (M) mucosa, (S) submucosa, (Mu) muscular; (Se) serosa; Contracoloração com Hematoxilina de Harris, barra = 100 μm.

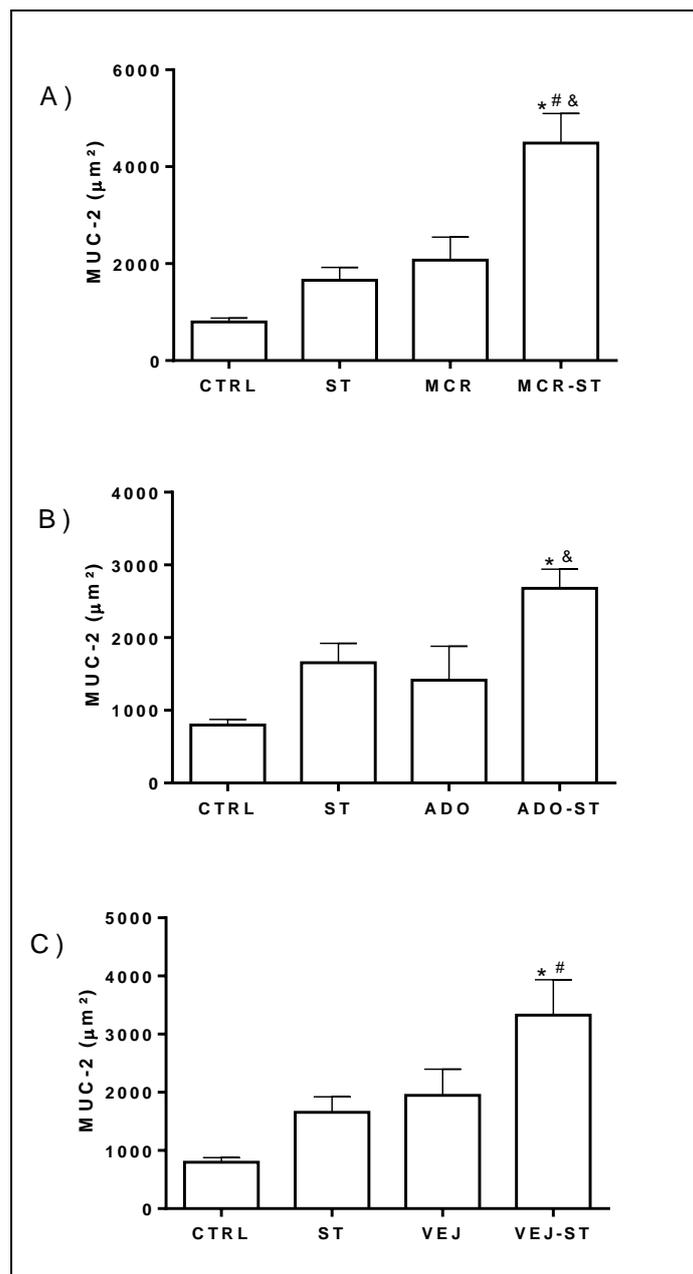


Gráfico 20: Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*.

A) Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, MCR e MCR-ST; * $p < 0,0001$ vs CTRL; # $p < 0,0001$ vs ST; & $p < 0,0001$ vs MCR, *one-way ANOVA test*. B) Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, ADO e ADO-ST; * $p = 0,0019$ vs CTRL; & $p = 0,0019$ vs ADO, *one-way ANOVA test*. C) Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, VEJ e VEJ-ST; * $p = 0,0276$ vs CTRL; # $p = 0,0276$ vs ST, *one-way ANOVA test*. Os dados são exibidos nos gráficos com (média \pm SEM), $n = 8$.

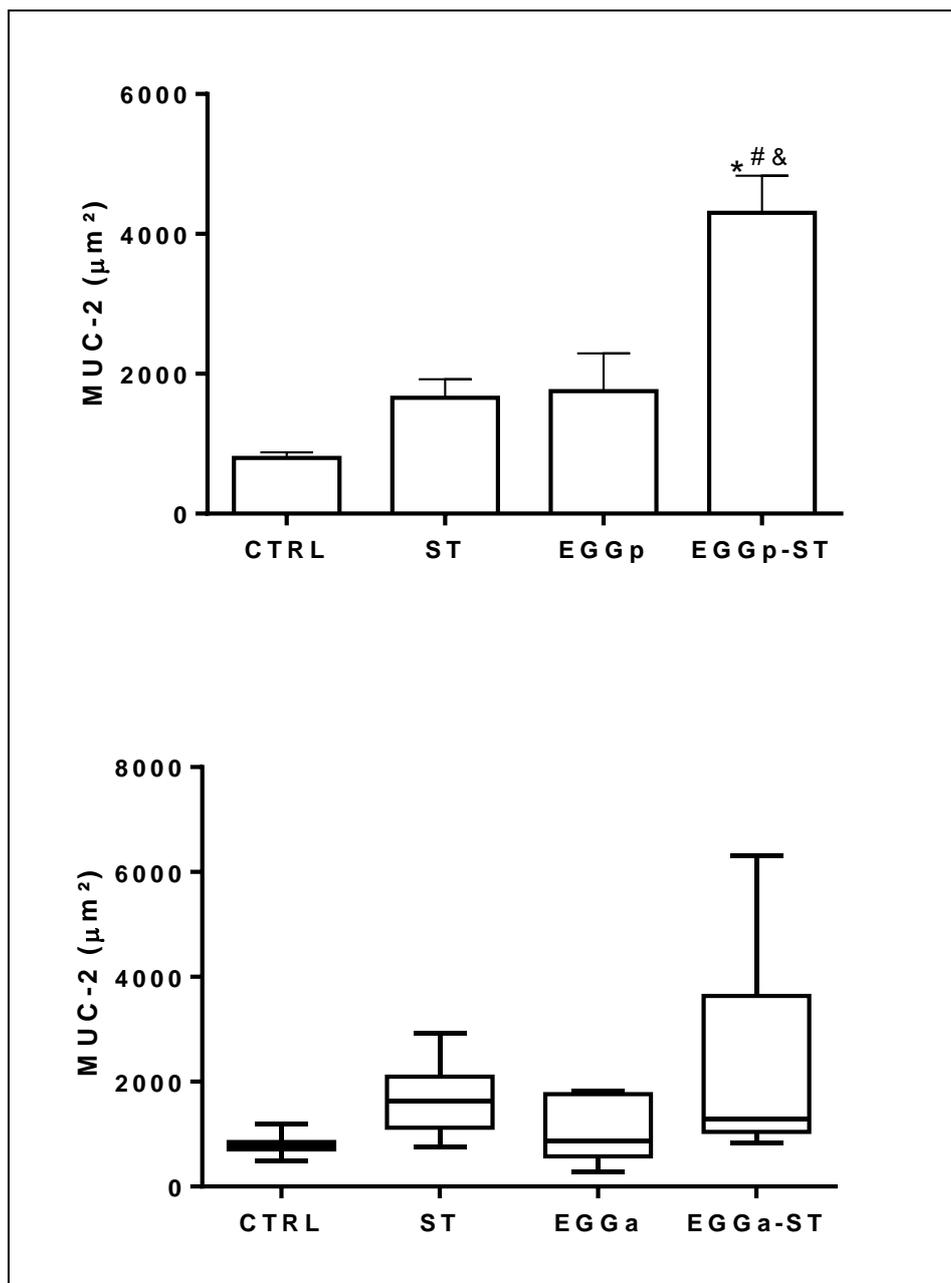


Gráfico 21: Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal de ratos inoculados com cepas de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*. A) Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGp e EGGp-ST; * $p=0,0497$ vs CTRL; # $p=0,0497$ vs ST; & $p=0,0497$ vs EGGp, *one-way ANOVA test*. B) Área de marcação positiva para MUC-2 na mucosa cecal dos ratos dos grupos CTRL, ST, EGGa e EGGa-ST, *Kruskal-Wallis test*. Os dados são exibidos nos gráficos com mediana e intervalo interquartil (25% - 75%). $n=8$.

6. DISCUSSÃO

O modelo experimental deste estudo permitiu analisar e quantificar a expressão gênica por RT-qPCR dos fatores de virulência amebianos, amebaporos A, cisteína proteinases 2, 5, e a lectina Gal/GalNAC produzidos por cepas de *E. histolytica* e *E. dispar in vitro* associadas com *S. Typhimurium*. Os resultados foram comparados com dados obtidos com cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* que não sofreram interação com a bactéria *S. Typhimurium*. É importante ressaltar que até o momento, este foi o único trabalho que observou e quantificou o aumento da expressão gênica de alguns dos principais fatores de virulência de *E. dispar* e da *E. histolytica* após a interação com a *S. Typhimurium*. Nossos experimentos contribuíram para reforçar a hipótese de indução da virulência nestas espécies de amebas após a interação com bactérias enteropatogênicas (Galvan-Moroyoqui *et al*, 2008; Bhattacharya *et al*, 1992; Shibayama *et al*, 2007). Além disso, também demonstramos que a associação *in vivo* com *S. Typhimurium* também foi capaz de aumentar a patogenicidade de três diferentes cepas de *E. dispar* em um modelo experimental de colite amebiana no rato.

Um dos principais fatores de virulência amebianos, que inicia sua ação logo após a aderência dos trofozoítos nas células do hospedeiro, são os amebaporos, primeiros responsáveis pelo efeito citotóxico causado às células do hospedeiro. De fato, trofozoítos de *E. histolytica* pertencentes a cepa HM1:IMSS, submetidos à inibição da síntese de Ap-A, apresentaram *in vitro* uma redução na capacidade de lesar células renais de hamsters, ressaltando a importância do Ap-A como fator de virulência (Bracha *et al*, 1999). Nossos resultados demonstraram que a interação por um período de 18 horas das cepas EGGp, MCR e ADO com a *S. Typhimurium* foi capaz de induzir aumento da expressão gênica do Ap-A, contribuindo assim para um possível aumento da capacidade de agressão destas cepas. De fato, recentemente observamos em estudo anterior, que ratos co-infectados com *S. Typhimurium* e trofozoítos pertencentes à cepa MCR de *E. dispar*, aumentaram a sua capacidade de causar danos à mucosa intestinal, levando ao surgimento de zonas de destruição da mucosa cecal significativamente superiores e ao aumento da resposta inflamatória quando comparados com ratos infectados somente com trofozoítos (Oliveira *et al*; 2015). Neste trabalho, também verificamos aumento na área de necrose nos animais inoculados com a cepa ADO de *E.*

dispar em associação com a *S. Typhimurium*. Isso significa que, além de outros fatores de virulência, o Ap-A provavelmente esteve envolvido no desenvolvimento destas lesões cecais.

Até o presente momento há escassez de estudos detalhando a expressão gênica de CP-2 em *E. histolytica* e *E. dispar* e, principalmente, nas condições por nós estudadas. Ao compararmos a expressão gênica de CP-2 na cepa VEJ de *E. dispar* e na cepa EGGa de *E. histolytica*, foi observada uma redução da expressão de CP-2 nestas cepas quando cultivadas em associação com *S. Typhimurium*. Já em relação às cepas MCR, ADO e EGGp não observamos diferenças na expressão de CP-2 quando estavam associadas a *S. Typhimurium*. Tal observação em nosso experimento, em relação à CP-2, pode ser devido ao fato das cepas serem distintas, com níveis distintos de virulência e, conseqüentemente, com heterogêneos níveis de expressão dos seus diferentes fatores de virulência. As CPs contribuem na patogênese da amebíase facilitando a degradação da membrana celular e de componentes da matriz extracelular, incluindo fibronectina e colágeno, bem como imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento (Keene *et al*, 1990; Schulte; Scholze, 1989; Tran *et al*, 1998). É descrito na literatura que a CP-2 está presente tanto em *E. histolytica* quanto em *E. dispar* e é responsável pela degradação da mucina MUC-2 do muco colônico, contribuindo para o desenvolvimento de danos ao hospedeiro (Bruchhaus *et al*, 2003; Lidell *et al*, 2006).

Ao analisarmos a expressão gênica da CP-5 presente nas cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar*, deparamos com um fenômeno interessante. Ao contrário do observado em nosso estudo, pesquisadores verificaram a ausência da expressão gênica de CP-5 ao utilizarem outras cepas de *E. dispar*, como a SAW 760 moxênica mantida em cultura com *Crithidia fasciculata* e as cepas xênicas ERI1007 e a SAW 142 mantidas em cultura com a microbiota indígena intestinal dos pacientes da qual foram isoladas (Bruchhaus *et al*, 1996; Willhoeft *et al*, 1999). Em nossa análise, a CP-5 além de ter sido expressa nas cepas MCR, ADO e VEJ também apresentou aumento da expressão gênica nas culturas MCR e VEJ associadas a *S. Typhimurium* em relação às culturas não associadas. A CP-5 é um importante fator de virulência e, a sua expressão gênica, bem como o aumento de sua expressão nas cepas por nós estudadas em associação com *S. Typhimurium*, está relacionado ao aumento da patogenicidade amebiana. À respeito da relação da expressão da CP-5 com a capacidade dos trofozoítos em produzir danos, tal cisteína proteinase tem sido responsabilizada por ser capaz de

degradar um amplo espectro de componentes como a elastina, fibrinogênio, colágeno, favorecendo a destruição de boa parte da barreira física, facilitando a locomoção e a invasão dos trofozoítos (Freitas *et al*, 2009). A presença do fator de virulência CP-5, além da expressão aumentada de Ap-A e talvez de outros fatores de virulência, provavelmente esteve envolvida no desenvolvimento de lesões amebianas provocadas pela cepa ADO em diferentes estudos (Costa *et al*, 2006; Shibayama *et al*, 2007). Da mesma maneira, também verificamos aumento da área de necrose quando a cepa ADO foi associada com a *S. Typhimurium*.

A lectina Gal/GalNAC é outro fator de virulência amebiano por nós investigada, sendo descrita como o mais importante dos fatores de virulência, em estudos *in vitro* e *in vivo*, cuja função é a adesão dos trofozoítos às células do hospedeiro para dar início aos seus efeitos citotóxicos (López-Vancell *et al*, 200; Blazquez *et al*, 2007; Vines *et al*, 1998). A associação com a *S. Typhimurium* também foi capaz de aumentar a expressão gênica deste fator de virulência nas cepas ADO e VEJ. Corroborando com os nossos resultados, foi observado que trofozoítos pertencentes à cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*, após terem sido cultivados e fagocitados as bactérias *E. coli* 086:H18 comensal, *E. coli* enteropatogênica B171-0111:NM e a *Shigella dysenteriae*, exibiram *in vitro* o aumento da adesão dos trofozoítos à células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) devido aos altos níveis da lectina Gal/GalNAC (Galvan-Moroyoqui *et al*, 2008). Os autores também observaram aumento dos danos nas células MDCK, que foi relacionado ao aumento da atividade de cisteína proteinases. Ao contrário do observado no estudo acima e confrontando com os nossos resultados, quando os mesmos pesquisadores analisaram a cepa SAW 760 de *E. dispar* nas mesmas condições de co-cultura, não observaram adesão e danos celulares às células MDCK (Galvan-Moroyoqui *et al*, 2008).

Ao contrário do observado com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e EGGp de *E. histolytica*, que exibiram na maioria das vezes, aumento da expressão dos fatores de virulência quando associadas à enterobactéria *S. Typhimurium*, a cepa EGGa de *E. histolytica* demonstrou redução da expressão gênica dos fatores de virulência Ap-A, CP-2 e lectina Gal/GalNAC. É possível que, pelo fato da cepa EGGa ser cultivada em meio axênico por longos anos, ela possa ter perdido a capacidade de sobreviver em equilíbrio com outros microorganismos, bem como de sofrer algum tipo de influência estimuladora de virulência, resultando em redução da expressão dos fatores de

virulência amebianos. Tal redução não afetou sua capacidade de produzir aumento da resposta inflamatória quando em associação com a *S. Typhimurium*, mas foi incapaz de provocar um aumento da necrose da parede cecal. De fato, a co-infecção de ratos com a cepa EGGa de *E. histolytica* e *S. Typhimurium* não produziu aumento da área de erosões e úlceras, mas sim, parece ter ocorrido uma tendência à redução da área de necrose da parede cecal.

E. dispar já foi isolada de pacientes com sintomas de colite não-disentérica (Martinez *et al*, 1996; Gomes *et al*, 1997), de paciente com colite disenterica (Graffeo *et al*, 2014) e, sequências de DNA de *E. dispar* foram detectadas e genotipadas em amostras obtidas de pacientes com abscesso hepático amebiano, sugerindo que *E. dispar* pode também estar envolvida no desenvolvimento de lesões no intestino grosso e fígado de seres humanos (Ximénez *et al*, 2010). Corroborando com estes estudos, nossos resultados demonstraram que os cecos de ratos infectados com diferentes cepas de *E. dispar*, e co-infectados com *S. Typhimurium*, apresentaram após 7 dias de infecção amebiana, lesões mais exuberantes com aumento da área de necrose e aumento da intensidade do infiltrado inflamatório, quando comparados com os animais somente infectados com as cepas de *E. dispar*. Em alguns ratos dos grupos co-infectados também foi observada a presença de úlcera amebiana clássica, com necrose da mucosa, submucosa, muscular e serosa, comprovando que a interação da *E. dispar* com a *S. Typhimurium* favorece o surgimento de lesões cecais amebianas em ratos. Posteriormente realizamos análise morfométrica nos cecos dos ratos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* que também demonstraram quantitativamente aumento significativo da área de necrose cecal quando co-infectados com *S. Typhimurium*, confirmando os resultados obtidos na análise histopatológica. A infecção dos animais somente com *S. Typhimurium* não foi capaz de provocar destruição da mucosa colônica, tal como observada na infecção por *E. dispar* e *E. histolytica*, sendo verificada apenas a presença de zonas de descamação epitelial. Tais zonas de dano do epitélio de revestimento poderiam favorecer a adesão de trofozoítos e a sua invasão. Contudo, o aumento da expressão de fatores de virulência *in vitro* sugere que a interação *in vivo* com *S. Typhimurium* também pode ter provocado incremento de fatores de virulência nos trofozoítos inoculados no lúmen cecal, levando ao desenvolvimento de lesões significativamente mais intensas em alguns grupos de ratos.

Existem evidências que *E. dispar* é capaz de produzir lesões experimentais significativas na presença de bactérias. A observação de que lesões hepáticas foram obtidas somente após a associação de bactérias com a *E. dispar* sugere que as bactérias podem estar produzindo lesões prévias que favoreçam a proliferação de trofozoítos e sua invasão tecidual, aumentando a expressão de fatores de virulência e/ou incorporando genes (Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010a). De fato a simbiose, entre bactérias, *E. histolytica* e *E. dispar* pode modular modificações fenotípicas e propriedades de virulência das amebas (Bhattacharya *et al.*, 1992; Costa *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2010a). A resposta para explicar a aquisição de virulência e patogenicidade destas cepas de *E. dispar* poderia estar na interação com bactérias.

O perfil das lesões cecais produzidas com a infecção pela *E. dispar* ou pela *E. histolytica* quando em associação com a *S. Typhimurium*, alterou-se somente em relação à intensidade, mantendo as mesmas características de uma colite amebiana ulcerativa. O infiltrado inflamatório estava presente na lâmina própria, na camada, submucosa e, frequentemente, também atingia a camada muscular e a serosa, principalmente no ceco de ratos com áreas mais extensas de necrose. O infiltrado inflamatório era misto, composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Nossos resultados corroboram com estudo anterior, onde pesquisadores identificaram por imunomarcção a presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos em amostras de colite amebiana (Ventura-Juárez *et al.*, 2007). Neutrófilos e macrófagos parecem ser as células efetoras mais importantes na resposta imune do hospedeiro contra a infecção pela *E. histolytica* (Espinosa-Cantellano; Martínez-Palomo, 200; Seydel *et al.*, 1997). Nos estágios iniciais da invasão amebiana, os trofozoítos encontram-se cercados principalmente por neutrófilos e outras células da resposta imune inata do hospedeiro. Quando ativadas apropriadamente, estas células são capazes de eliminar os trofozoítos por mecanismos oxidativos ou não oxidativos, através da liberação de enzimas lisossômicas e da geração de radicais livres (Campos-Rodríguez *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, verificamos que os ratos infectados com as cepas de *E. dispar* ou de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium*, exibiram com mais frequência no ceco, maior número de células inflamatórias, em relação aos ratos do grupo somente infectados com as cepas *E. dispar*, ou de *E. histolytica*, e de ratos somente infectados com a *S. Typhimurium*. Esta observação foi confirmada pela análise quantitativa, onde a mucosa cecal dos ratos infectados com as cepas MCR, ADO, VEJ

de *E. dispar* e cepas EGGp e EGGa de *E. histolytica* e co-infectados com *S. Typhimurium* exibiram um maior número de células inflamatórias em relação ao ratos infectados somente com a cepas amebianas. Ao contrário da maioria dos estudos sobre amebíase intestinal, que focam principalmente nas erosões e úlceras desenvolvidas, nosso estudo parece ser o primeiro que realizou análise morfométrica do infiltrado inflamatório na lâmina própria da colite amebiana.

Nossos resultados sugerem que a associação das cepas amebianas com a *S. Typhimurium* possa ter estimulado a patogenicidade dos trofozoítos e estes passaram a agredir com mais intensidade a mucosa cecal, que responderam com produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios, culminando com uma maior intensidade dos fenômenos vasculares e exsudativos da inflamação. Também acreditamos que o inóculo de *S. Typhimurium* utilizado nosso modelo experimental, mesmo que não tenha causado um quadro de salmonelose, contribuiu para aumentar o número de células da lâmina própria, visto que ocorreu aumento discreto do infiltrado inflamatório do grupo ST em relação ao grupo CTRL. Apesar do baixo inóculo de *S. Typhimurium* foi capaz de iniciar uma resposta inflamatória ocorrendo migração significativa de células do sistema imune. Portanto, pareceu-nos que o aumento significativo do número de células na lâmina própria dos ratos infectados com as cepas amebianas e co-infectados com *S. Typhimurium* foi decorrente do aumento da patogenicidade dos trofozoítos e da ação do sistema imune frente à *S. Typhimurium*. Temos que destacar que os ratos infectados com as cepas MCR, ADO e VEJ de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium*, além de terem exibido maior número de células inflamatórias, também apresentaram maior área de necrose cecal. É possível que, além de terem participado da tentativa de destruição dos trofozoítos, as células inflamatórias também possam ter colaborado na ampliação das áreas de necrose da mucosa cecal. De fato, outros autores sugerem que nas fases mais tardias da doença, as células inflamatórias podem contribuir para o dano tecidual, tanto na colite como no abscesso hepático amebiano (Tsutsumi *et al*, 1990; Stanley; Reed, 2001; Rivero *et al*, 2002; Ventura *et al*, 2007; Campos-Rodríguez *et al*, 2016).

Conforme comentamos anteriormente, o contato dos trofozoítos com a mucosa cecal, bem como a liberação de substâncias tóxicas amebianas, é capaz de desencadear a liberação de mediadores químicos inflamatórios. Dentre tais mediadores destaca-se a IL-1 α , citocina pertencente à família IL-1, predominantemente produzida por

macrófagos, monócitos, fibroblastos e células dendríticas, mas também por linfócitos e células epiteliais (Arai *et al*, 1998; Moldoveanu *et al*, 2015). Trofozoítos de *E. histolytica* cultivados com diferentes linhagens celulares, incluindo células do epitélio intestinal, aumentaram a expressão de RNAm para citocinas pro-inflamatórias como IL-1 α , IL-8, IL-6 e GM-CSF (Eckmann *et al*, 1995; Kim *et al*, 1997). Nossos resultados demonstraram que os ratos dos grupos MCR-ST e VEJ-ST exibiram área de marcação positiva para IL-1 α maior do que os ratos dos grupos somente infectados com as cepas MCR e VEJ de *E. dispar* e também em relação aos ratos infectados com *S. Typhimurium* e aos ratos do grupo controle não infectados. Os ratos infectados com a cepa ADO de *E. dispar* e co-infectados com *S. Typhimurium* também exibiram maior área positiva para IL-1 α em relação aos ratos infectados com *S. Typhimurium* e aos ratos do grupo controle não infectados. A maior expressão de IL-1 α pode ter sido decorrente de um provável aumento de virulência destas cepas que foram associadas com a *S. Typhimurium*. Tal aumento da expressão de IL-1 α pode ter contribuído para o maior recrutamento de leucócitos, como neutrófilos e macrófagos, para a parede cecal, também contribuindo para a expansão da necrose produzida pelos produtos amebianos (Eckmann *et al*, 1995).

Dentre as funções da IL-1 α , destaca-se a sua capacidade de estimular a expressão gênica para COX-2, descoberta inicialmente em cultura *in vitro* de células estromais do endométrio de ratos (Jacobs *et al*, 1994). A enzima cicloxigenase (COX) constitui o elemento inicial para a produção de prostaglandinas. Existem 2 tipos principais da enzima cicloxigenase: COX-1, a qual é expressa constitutivamente em órgãos tais como o estômago, rins e intestinos e, COX-2, também encontrada em baixos níveis no intestino normal e em concentrações elevadas nos processos inflamatórios intestinais (Eckmann *et al*, 1997; Singer *et al*, 1998; Riehl *et al*, 2000). Em nosso estudo foi possível realizar análise quantitativa da área de marcação positiva para COX-2 presente na mucosa cecal, o que permitiu verificarmos que os ratos dos grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST e EGGp-ST exibiram maior área de marcação para COX-2 quando comparados com os grupos CTRL e ST. Além disso, os ratos do grupo ADO-ST também exibiram aumento significativo na área de marcação positiva para COX-2 em relação ao seu grupo controle ADO. Apesar de não ter sido observada diferença significativa dos grupos co-infectados MCR-ST, VEJ-ST e EGGp-ST em relação aos seus respectivos controles MCR, VEJ e EGGp, verificamos uma tendência ao aumento

da expressão de COX-2. Como a IL-1 α aumenta a expressão de COX-2 (Jacobs *et al*, 1994; Bany, Kennedy; 1999), nossos resultados corroboram com o observado por outros autores, ao verificarmos que os ratos dos grupos MCR-ST, ADO-ST e VEJ-ST, que exibiram maior área de marcação positiva para IL-1 α , também apresentaram maior área de marcação positiva para COX-2, confirmando a participação de IL-1 α na indução da síntese de COX-2.

Foi demonstrado que o aumento da expressão de COX-2 e de prostaglandina E2 (PGE2) contribui para o aumento da permeabilidade epitelial, facilitando a exsudação de macrófagos e neutrófilos na colite amebiana (Stenson *et al*, 2001; Sánchez-Ramírez *et al*, 2004). Nossos resultados estão de acordo com tal raciocínio, pois os ratos dos grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST e EGGp-ST, as quais exibiram maior expressão para COX-2, também apresentaram aumento significativo na celularidade na lâmina própria. Acreditamos que o aumento da permeabilidade epitelial, ocorrido indiretamente devido ao aumento de COX-2, possa facilitar a exsudação de leucócitos tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos para a mucosa intestinal, também contribuindo para a expansão das lesões amebianas, tal como sugerimos anteriormente com relação ao aumento da expressão de IL-1 α .

Além disso, é possível que esse aumento significativo da área de marcação para COX-2 nos grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST e EGGp-ST possa estar também associado à infecção pela *S. Typhimurium*. Ainda que o inóculo da *S. Typhimurium* utilizado em nosso experimento não tenha causado lesão significativa no epitélio intestinal, como demonstrado na análise histopatológica do grupo ST, é possível que o contato da bactéria com a mucosa intestinal tenha auxiliado na ação dos trofozoítos amebianos contra as células epiteliais, acionando mecanismos que culminaram com sínteses adicionais de COX-2. Corroborando com esta hipótese, pesquisadores demonstraram semelhanças na expressão de IL-1 e COX-2 em células epiteliais frente à infecção com *E. histolytica*, *Samonella* ou outras bactérias invasivas (Eckmann *et al*, 1993; Kagnoff; Eckmann, 1997).

O perfil de citocinas produzidas na resposta inflamatória contra a amebíase pode ser tanto do tipo T helper 1 (Th1), mediado pelas citocinas IL-2, TNF- α e IFN- γ , quanto do tipo T helper 2 (Th2), mediado pelas citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-9, sugerindo que os diferentes epítomos dos trofozoítos de *E.histolytica* podem direcionar a resposta imune tanto para Th1 como para Th2 (Mann *et al*, 1997; Campbell; Chadee, 1997).

Segundo alguns autores, níveis elevados de IL-4 relacionaram-se às lesões amebianas intestinais mais intensas em camundongos (Haupt *et al*, 2002). Ao contrário do observado por Haupt e colaboradores (2002), nossos resultados demonstraram que ratos dos grupos ADO-ST e VEJ-ST, além de exibirem maior área de lesão amebiana, apresentaram menor área de marcação positiva para IL-4 quando comparados com os ratos somente infectados com as cepas amebianas ADO e VEJ. Também ocorreu uma redução significativa na área de marcação positiva para IL-4 nos grupos EGGp-ST e EGGa-ST quando comparados respectivamente com seus grupos controles EGGp e EGGa. Apesar de ainda não termos avaliado alguma citocina típica de resposta Th1, é possível que a co-infecção tenha favorecido uma redução da resposta inflamatória Th2. A inoculação somente de *S. Typhimurium* não provocou redução de IL-4, indicando que foi a infecção dos trofozoítos em associação com a enterobactéria, a responsável pela redução da expressão de IL-4.

Alguns autores sugerem que perfis elevados de citocinas Th2 favorecem a permanência do parasito no hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento de lesões amebianas (Haupt *et al*, 2002, Bansal *et al*, 2005; Carrero *et al*, 2007; Bernin *et al*, 2014). Em relação ao agravamento das lesões amebianas, nossos resultados divergem do observado por estes pesquisadores, pois verificamos que as maiores áreas de lesões amebianas foram encontradas nos grupos de ratos que também exibiram menor expressão de IL-4. Nesse sentido, novos estudos com modelos de co-infecção com *S. Typhimurium* devem ser realizados na tentativa de avaliar um provável direcionamento da resposta imune para um perfil Th1.

Sabe-se que a imunidade inata, como a constituída pelas barreiras epiteliais das mucosas, é a primeira reação do organismo do hospedeiro frente a um patógeno e que atua limitando a agressão durante o início da exposição do hospedeiro aos microorganismos. A imunidade natural aos patógenos contribui para formação das respostas imunológicas adquiridas, podendo influenciar o seu caráter, tornando-as mais eficazes contra diferentes tipos de microorganismos. As propriedades protetoras das barreiras epiteliais mucosas são principalmente devido às mucinas, componentes importantes de uma resposta inflamatória no intestino para expulsão de patógenos, sendo os principais produtos secretores das células caliciformes (Thornton; Sheehan, 2004; Artis *et al*, 2004; Hasnain *et al*, 2010). A principal mucina expressa pelo epitélio

colônico é a mucina MUC-2, a qual é armazenada em grandes quantidades nos grânulos volumosos das células caliciformes (Van Ser Sluis *et al*, 2006).

Nos ratos dos grupos MCR-ST, ADO-ST e EGGp-ST foram demonstradas maiores áreas de marcação positiva para a mucina MUC-2 na mucosa cecal em relação aos grupos controles MCR, ADO e EGGp. Além disso, os grupos MCR-ST, EGGp-ST e VEJ-ST exibiram área de marcação maior para MUC-2, quando comparados com o grupo dos ratos somente infectados com *S. Typhimurium*. Com exceção do grupo EGGa-ST que não exibiu nenhuma diferença na área de marcação positiva MUC-2 em todas as possíveis comparações, os outros grupos experimentais exibiram aumento significativo na área de marcação para MUC-2, quando comparados ao grupo controle não infectado. É possível que o aumento da mucina MUC-2 nos grupos dos ratos infectados com as cepas MCR, VEJ, ADO de *E. dispar* e com a cepa EGGp de *E. histolytica*, co-infectados com *S. Typhimurium*, tenha ocorrido devido às ações da resposta imune do organismo na tentativa de conter os trofozoítos amebianos mais virulentos. Tal resultado corrobora com trabalho anterior, onde foi demonstrado que camundongos deficientes para citocina IL-10 e, conseqüentemente, com menor expressão de MUC-2, foram susceptíveis à infecção amebiana, enquanto os camundongos *wild-type*, com expressão normal de MUC-2 foram mais resistentes a infecção amebiana, mostrando a importância desta mucina na resistência à amebíase (Hamano *et al*, 2006).

Como comentamos anteriormente os grupos MCR-ST, ADO-ST, VEJ-ST e EGGp-ST exibiram áreas de necrose mais exuberantes, infiltrado inflamatório mais intenso, maior expressão de IL-1 α e COX-2 e, menor expressão de IL-4, sugerindo predominância da resposta inflamatória Th1. As células imunes das respostas Th1 também são fontes importantes de IL-10, que atua através de um *feedback* negativo, promovendo inibição das células dendríticas e macrófagos e, reduzindo os fenômenos pro-inflamatórios típicos da resposta Th1 (Abbas *et al*, 2011). Além disso, é conhecido que COX-2 pode favorecer a produção de prostaglandinas estimuladoras da produção de mucinas (Jacobs; Carson, 1993; Ma *et al*, 2000). Baseado nestas observações, é provável que o aumento da expressão de MUC-2 em nossos grupos experimentais possa estar relacionado com o aumento da expressão de IL-1 α e COX-2 e/ou com um provável aumento de IL-10.

Acreditamos que estes importantes achados de nosso trabalho contribuíram para elucidar alguns dos mecanismos de virulência que levaram ao desenvolvimento dos danos intestinais e hepáticos produzidos por diferentes cepas de *E. dispar* em modelos experimentais (Furst *et al*, 2002; Costa *et al*, 2006; Shibayama *et al*, 2007; Costa *et al* 2007; Costa *et al*, 2010a; Costa *et al*, 2010b; Costa *et al*, 2011; Guzmán-Silva, 2013), bem como casos clínicos já documentados em humanos (Ximénez *et al*, 2010; Graffeo *et al*, 2014).

7. CONCLUSÕES

- Três diferentes cepas de *E. dispar* foram capazes de expressar o fator de virulência cisteína proteinase-5;
- A co-cultura de *E. dispar* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão dos fatores de virulência amebianos amebaporo A, cisteína proteinase-5 e a lectina ligante de Galactose e N-Acetilgalactosamina;
- A co-cultura de *E. histolytica* com a enterobactéria *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão do fator de virulência amebiano amebaporo A;
- Na maioria dos grupos analisados, a associação *in vivo* da *E. dispar* ou da *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a intensidade da colite amebiana ulcerativa, também acompanhada pelo aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios.
- Na maioria dos grupos analisados, a associação *in vivo* da *E. dispar* ou da *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi capaz de induzir resposta inflamatória com aumento da expressão de IL-1 α e COX-2 e, redução da expressão de IL-4;
- Na maioria dos grupos analisados, a associação *in vivo* da *E. dispar* ou da *E. histolytica* com a *S. Typhimurium* foi capaz de aumentar a expressão da mucina MUC-2.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S.; Cellular and Molecular Immunology. 7th ed. Traduction ROBAINA, T.F.; ET AL.; Rio de Janeiro. Elsevier, 2011, 592p.

ABD- ALLÁ, M.D.; RAVDIN, J.L.; Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. Trop Med Int Health. 7:365-370, 2002.

ACUÑA-SOTO, R.; SAMUELSON, J.; DE GIROLAMI, P.; ZARATE, M.; MOLLAN-VELASCO, F.; SCHOONICK, G.; ET AL.; Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg. 48:58-70.1993.

ACUÑA-SOTO, R.; MAGUIRE, J.H.; WIRTH, D.F.; Gender distribution in asymptomatic and invasive amebiasis. Am. J. Gastroenterol. 95:1277-1283, 2000.

ALLASON-JONES, E.; MINDEL, P.A.; SARGEAUNT.; WILLIAMS, P.; *Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men. N. Engl. J. Med. 315:353-356, 1986.

ALI, I.K.; ZAKI, M.; CLARK, C.G.; Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Micro. biol. 43(12):5842-5847, 2005.

ALLOS, B.M.; Campylobacter jejuni Infections: update on emerging issues and trends. Clin Infect Dis. 32:1201-1206, 2001.

AMIRLAK, I.; AMIRLAK, B.; Haemolytic uraemic syndrome: an overview. Nephrology (Carlton). 11:213-218, 2006.

ANKRI, S.; STOLARSKY, T.; BRACHA, R.; PADILLA-VACA, F.; MIRELMAN, D.; Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. Infect. Immun. 67:42-422, 1999.

ARANTES, RM.; NOGUEIRA AM.; Distribution of enteroglucagon- and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. Cell Tissue Res. 290(1):61-69, 1997.

ASGHARPOUR, A.; GILCHRIST, C.; BABA, D.; HAMANO, S.; HOUP, E.; Resistance to Intestinal *Entamoeba histolytica* Infection is conferred by Innate Immunity and Gr-1⁺ Cells. Infection and Immunity. 4522-4529, 2005.

ARTIS, D.; WANGG, M.L.; KEILBAUGH, S.A.; et al.; RELMbeta/FIZZ2 is goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. Proc Acad Sci USA. 101:13596-13600, 2004.

AYEH KUMI, P.F.; PETRI JR, W.A.; Diagnosis and management of amebiasis. Infect. Med. 19(8):375-382, 2002.

BANY, B.M.; KENNEDY, T.G.; Role of interleukin 1 in the regulation of cyclooxygenase gene expression in rat endometrial stromal cells. *Biology of Reproduction*. 115:121-131, 1999.

BARTHEL, M.; ET AL.; Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun*. 71:2838-2858, 2003.

BEKKER-MENDEZ, V.C.; PÉREZ-CASTILLO, V.L.; RICO-ROSILLO, M.G.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, M.; ARELLANO-BLANCO, J.; KRETSCHMER-SCHIMID, P.R.; TALAMÁS-RHANA, P.; Downregulation of selected cytokines in amebiasis. *Ach. Med. Res*. 37:556-558, 2006.

BENETTON, M.L.F.N.; GONÇALVES, A.V.; MENEGHINI, M.E.F.; SILVA, E.F.; CARNEIRO, M.; Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica* /E. dispar complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 99(7):532-540, 2005.

BERN, C.; MARTINEZ, J.; ZOYSA, I.; GLASS, R.I.; Magnitude del problema global de las enfermedades diarreicas:actualizacion decenal. *Bol Ofic Sanit Panam*. 115:523-35, 1993.

BERNIN, H.; MARGGRAFF, C.; JACOBS, T.; BRATTIG, N.; AN, L.V.; BLESSMANN, JÖRG.; LOTTER, H.; Immune markers characteristic for asymptotically infected and diseased *Entamoeba histolytica* individuals and their relation to sex. *Infectious Diseases*. 14:621, 2014.

BHATTACHARYA, A.; GHILDYAL, R.; PRASAD, J.; BHATTACHARYA, S.; DIAMOND, S.L.; Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. *Infect Immun*. 60:270-5, 1992.

BHATTACHARYA, A.; ARYA, R.; CLARK, C.G.; ACKERS, J.P. Absence of lipophosphoglycan-like glycoconjugates in *Entamoeba dispar*. *Parasitol.* 120:31-35, 2000.

BLAZQUEZ, S.; ROGOTHIER, M.C.; HUERRE, M.; GUILLEN, N.; Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. *Int. J. Parasitol.* 37:425-43, 2007.

BOHLSON, S.S.; FRASER, D.A.; TENNER, A.J.; Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. *Mol Immunol.* 44:33-43, 2007.

BOSCHI-PINTO, C.; VELEBIT, L.; SHIBUYA, K.; Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries. *Bull World Health Organ.* 86:710–717, 2008.

BOZKURT, A.I.; OZGÜR, S.; OZÇIRPICI, B.; Association between household conditions and diarrheal diseases among children in Turkey: a cohort study. *Pediatr Int.* 45(4):443-51, 2003.

BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; LEIPPE, M.; MIRELMAN, D.; Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 34:463-472, 1999.

BRACHA, R.; NUCHAMOWITZ, Y.; MIRELMAN, D.; Transcriptional silencing of an amoebapore gene in *Entamoeba histolytica*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. *Eukaryot. Cell.* 2:295-305, 2003.

BRAGA, L.L.; NINOMIYA, H.; McCOY, J.J.; EACKER, S.; WIEDMER, T.; PHAM, S.; WOOD, S.; SIMS, T.P.J.; PETRI, W.A.Jr.; Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 90:113-1137, 1992.

BRAGA, L.L.; GOMES, M.L.; DA SILVA, M.W.; FAÇANHA, F.E.Jr.; FIUZA, L.; MANN, B.J.; Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 65(4):268-271, 2001.

BRUMPT, E.; Étudie sommaire de l' *Entamoeba dispar* n. sp., amibe a Kyates quadrinuclées, parasite de l' Homme. *Bull. Acad. Méd.* 44:943,1925.

BURCHARD, G. D.; BILKE, R.; Adherence of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* strains to neutrophils. *Parasitol. Res.* 78:146-153,1992.

BURCHARD, G.D.; MOSLEIN, C.; BRATTIG, N.W.; Adherence between *Entamoeba histolytica* trophozoites and undifferentiated or DMSO-induced HL-60 cells. *Parasitol. Res.* 78:336-340,1992a.

BURCHARD, G.D.; PRANGE, G.; MIERELMAN.; Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and a human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. *Parasitol. Res.* 79:140-145, 1993.

BRUCHHAUS, I.; JACOBS, T.; LEIPPE, M.; TANNICH, E.; *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol Microbiol.* 22:255–263, 1996.

BRUCHHAUS, I.; LOFTUS, B.J.; HALL, N.; TANNICH, E.; The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell.* 2: 501–509, 2003.

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

CAMPBELL, D.; CHADEE, K.; Interleukin (IL)-2, IL-4, and tumor necrosis factor- α responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. *J. Infect. Dis. Chicago.*175:1176-1183, 1997.

CAMPOS-RODRIGUEZ, R.; JARILLO-LUNA, A.; The pathogenicity of *Entamoeba histolytica* is related to the capacity of evading innate immunity. *Parasite Immunol.*, Oxford. 27:1-8, 2005.

CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; GUTIÉRREZ-MEZA, M.; JARILLO-LUNA, R.A.; DRAGO-SERRANO, M.E.; ABARCA-ROJANO, E.; VENTURA-JUÁREZ, J.; CÁRDENAS-JARAMILLO, L.M.; PACHECO-YEPEZ, J.; A review of the proposed role of neutrophils in rodent amebic liver abscess models. *Parasite*. 23(6):1-14, 2016.

CARRERO, J.C.; CERVANTES-REBOLLEDO, C.; AGUILAR-DÍAZ, H.; DÍAZ-GALLARDO, M.Y.; LACLETTE, J.P.; MORALES-MONTOR, J.; The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica* *Parasite Immunology*. 29:331-338, 2007.

CIESLAK, P. R.; VIRGIN, I.V.H.W.; STANLEY, S.L.; A severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med*. 176:1605-1609, 1992.

CHADEE, K.; MEEROVITCH, E.; The pathogenesis of experimentally induced amebic liver abscess in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Am. J. Pathol.*, Bethesda. 117:71-80, 1984.

CHADEE, K.; MEEROVITCH, E.; The pathology of experimentally induced cecal amebiasis in gerbils (*Meriones unguiculatus*). Liver changes and amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.* 119:485-94, 1985.

CHADEE, K.; SMITH, J.M.; MEEROVITCH, E.; *Entamoeba histolytica*: electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Am J Trop Med Hyg.* 34(5):870-878, 1985.

CLARK, C.G.; DIAMOND, L.S.; The Laredo strain and other “*Entamoeba histolytica*-like” amoebae are *Entamoeba moshkoviskii*. Mol. Biochem. Parasitol. 46:11-18,1991.

CLARK, C.G.; Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at Manson House, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Trans R Soc Trop Med Hyg. 92(4):361-364, 1998.

COSTA, A.O.; VIANA, J.C. ASSIS, D.; ROCHA, O.A.; SILVA, E.F.; Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. Arch Med Res. 31Suppl 4:S247-248, 2000.

COSTA, O.A.; GOMES, A.M.; ROCHA, A.O.; SILVA, F.E.; Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxigenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. Rev. Inst. Med. Trop. 48:245-250, 2006.

COSTA, C.A.X.; BRITO, K.N.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V.; Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. Parasite. 14:329-34, 2007.

COSTA, C.A.X.; BRITO, K.N.O.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V.; Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. Eur J Histochem. 54:170-174, 2010a.

COSTA, C.A.X.; NUNES, A.C.; FERREIRA, A.J.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V.; *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: *in vivo* binding of antibodies and complement. Parasit Vectors. 3:1-10, 2010b.

COSTA, C.A.X.; FONSECA, T.H.S.; OLIVEIRA, F.M.S.; SANTOS, J.F.G.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V.; Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: immunohistochemical and morphometric study. Parasites & Vectors. 4:1-7, 2011.

CUNHA, A.S.; CASTRO, L.; ROCHA, P.; Amebíase. In: Rocha PRS, Cunha AS, organizadores. Tópicos em gastroenterologia 2: gastroenterologia tropical. Rio de Janeiro: Editora Medsi. 287-316,1991.

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

DIAMOND, L.S.; TANIMOTO-WEKI, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; Production of cecal lesiond in newborn guinea pigs with axenically cultivated *Entamoeba histolytica*. Arch Invest Med (Mex). 9: 223-228, 1978.

DIAMOND, L.S.; CLARK, C.G.; A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol. 40(3):340-344,1993.

DODSON, J.M.; CLARK, C.G.; LOCKHART, L.A.; LEO, B.M.; SCHROEDER, J.W.; MANN. B.J.; Comparison of adherente, citotoxicity, and Gal/GalNAC lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Int.* Amsterdam. 46: 225-235, 1997.

DOLABELLA, S.S.; SERRANO-LUNA, J.; NAVARRO-GARCÍA, F.; CERRITOS, R.; XIMÉNEZ, C.; GALVÁN-MOROYOQUI, J.M.; ET AL.; Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol*, 11:107-17, 2012.

ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F.; FIERER, J.; Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 61:4569-4574, 1993.

ECKMANN, L.; REED, S.L.; SMITH, J.R.; KAGNOFF, M.F.; *Entamoeba histolytica* trophozoites induce na inflamatory cytokine response by cultured human

cells through the paracrine action of cytolytically released interleukin- α . J.Clin. Invest. 96:1269-1279, 1995.

ECKMANN, L.; STENSON, W.F.; SAVIDGE, T.C.; LOWE, D.L.; BARRETT, K.E.; FIERER, J.; SMITH J.R.; KAGNOFF, M.F.; Role of intestinal epithelial cells in the host secretory response to infection by invasive bacteria. J. Clin. Investig. 100:296-309, 1997.

EICHINGER, D.; A role for a galactose lectin and its ligands during encystment of *Entamoeba*. J Eukaryot Microbiol. 48:17-21, 2001.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: from molecules to disease. Clin. Microbiol. 3:318-331, 2000.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTAÑÓN-GUTIÉRREZ, G.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; *In vivo* pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res. 28:204-206.1997.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; ROBLES, A.; CHÁVEZ B, CASTAÑÓN, G.; ARGÜELLO, C.; LÁZARO-HALLER, A.; MARTÍNEZ-PALOMO A.; *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J.Euk.Microbiol.* Lawrence. 45(3):265-272, 1998.

EVANGELOPOULOS, A.; LEGAKIS, N.; VAKALIS, N.; Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. Parasitol Int. 50:185-89, 2001.

FERREIRA, C.B.; MARÇAL, J.R.; Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinésia, Uberlândia-MG: um estudo-piloto. Rev Soc Bra Med Trop. 30(5):373-377, 1997.

FERREIRA JUNIOR, M.; BATISTA, S.A.; VIDIGAL, P.VT.; CORDEIRO, A.A.C.; OLIVEIRA, F.M.S.; PRATA, L.O.; DINIZ, A.E.T.; BARRAL, C.M.;

BARBUTO, R.C.; GOMES, A.D.; ARAÚJO, I.D.; QUEIROZ, D.M.M.; CALIARI, M.V.; Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *European Journal of Histochemistry*. 59:137-146, 2015.

FREITAS, M.A.R.; FERNANDES, H.C.; CALIXTO, V.C.; ET AL.; “*Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. *Experimental Parasitology*. 122:306-309, 2009.

FRIEBEL A.; ILCHMANN, H.; AEPFELBACHER, M.; EHRBAR, K.; MACHLEIDT, W.; HARDT, W.D.; SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of Rho GTPases of the host cell. *J. Biol. Chem.* 276:34035–34040, 2001.

FURST, C.; GOMES, M.A.; TAFURI, W.L.; SILVA, E.F.; Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Pathologica*. 94(1):22-7, 2002.

GARCIA, L.S.; BRUCKNER, D.A.; *Diagnostic medical parasitology*. Elsevier Science Publishing CO. Inc., New York. 1988.

GALVÁN-MOROYOQUI, J.M.; DOMÍNGUEZ-ROBLES, M.C.; FRANCO, E.; MEZA, I.; The interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PloS Negl Trop Dis*. 2:1-12, 2008.

GHADIRIAN, E.; KONGSHAVN, P.A.L.; Genetic control of susceptibility of mice to infection with *E. histolytica*. *Parasite Immunology*. 6:349-360, 1984.

GIL, F.F.; BUSATTI, H.G.; CRUZ, V.L.; SANTOS, J.F.; GOMES, M.A.; High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health*. 107(6):320-324, 2013.

GOMES, M.A.; SILVA, E.F.; MACEDO, A.M.; VAGO, A.R.; MELO, M.A.; Lssp-Pcr for Characterization of Stains Of *Entamoeba histolytica* Isolated In Brazil. Parasitology. 114:517-520, 1997.

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

GOMES, M.A.; MELO, M.N. MACEDO, A.M.; PENA, G.P.; CALIARI, M.V.; SILVA, E.F.; Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical, and molecular parameters. Arch Med Res. 31 Suppl 4:S249-250, 2000.

GOSH, S.; FRISARDI, M.; RAMÍREZ-AVILA, L.; DESCOTEAUX, S.; STURM-RAMÍREZ, K.; NEWTON-SANCHEZ, O.A.; SANTOS-PRECIADO, J.I.; GANGULY, C.; LOHIA, A.; REED, S.; SAMUELSON, J.; Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp. Evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. J. Clin. Microbiol. 38: 3815-3821:2000.

GRAFFEO, R.; ARCHIBUSACCI, C.M.; SOLDINI, S.; ROMANO, L.; MASUCCI, L.; *Entamoeba dispar*: A rare case of enteritis in a patient living in a non endemic Area. Case Rep Gastrointest Med. 2014:1-3, 2014.

GUERRANT, R.L.; BRUSH, J.; RAVDIN, J.I.; SULLIVAN, J.A.; MANDELL, G. L.; Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. J. Infect. Dis.143: 83-93, 1981.

GUERRANT, R.L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T.S.; THIELMAN, N.M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R.V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P.M.; DUPONT, H.; GUZMÁN, C.E.; LÓPEZ, M.E.; REYES, P.; GÓMEZ, J.E.; CORREDOR, A.; AGUDELO, C.; Diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* em muestras de materia fecal por detección de adhesina de *E. histolytica* mediante ELISA. Revista del Instituto Nacional de Salud.1-4, 2001.

GUZMÁN-SILVA, M.A.; SANTOS, H.L.; PERALTA, R.S.; PERALTA, J.M. D.E.; MACEDO, H.W.; Experimental amoebic liver abscess in hamsters caused by trophozoites of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Exp Parasitol.*134:39-47, 2013.

HAMANO, S.; ASGHARPOUR, A.; ETROUP, S.E.; WYNN, T.A.; LEITER, E.H.; HOUP, E.; Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cells but requires hemopoietic IL-10 production. *J.Imunol.* 177: 1208-13, 2006.

HAQUE R, FARUQUE, A.S.G.; HAHN, P.; LYERLY, D.M.; PETRI JR, W.A.; *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. *J Infect Dis.*175: 734-36, 1997.

HAQUE, R.; DUGGAL, P.; ALI, I.M.; HOSSAIN. M.B.; MONDAL, D.; SACK, R. B.; FARR, B.M.; BEATY, T.H.; PETRI, W.A.; Innate and acquired resistance to amebiasis in Bangladesh children. *J Infect Dis.* 189: 547-552, 2002.

HAQUE, R.; HUSTON, C.D.; HUGHES, M.; HOUP, E.; PETRI JR, W.A.; Amebiasis. *N Engl J Med.* 348:156-1573, 2003.

HASNAIN, S.Z.; WANG, H.; GHIA, J.; HAQ, NIHAL.; DENG, Y.; VELCICH,A.; GRENCIS, R.K.; THORNTON, D.J.; KHAN, W.I.; Mucin gene Deficiency in Mice impairs Host Resistance to an Enteric Parasitic Infection. *Gastroenterology.* 138:1763-1771, 2010.

HEGAZI, M.A.; PATEL, T.A.; EL-DEEK, B.S.; Prevalence and characters of *Entamoeba histolytica* infection in Saudi infants and children admitted with diarrhea at 2 main hospitals at south Jeddah: a re-emerging serious infection with unusual presentation. *Braz J Infect Dis.* 17(1): 32-40, 2013.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J.; qBase relative quantification framework and software for

management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8(2):R19, 2007.

HELK, E.; BERNIN, H.; ERNST, T.; ITTRICH, H.; JACOBS, T.; HEEREN, J.; TACKE, F.; TANNICH, E.; LOTTER, H.; TNF α -mediated liver destruction by Kupffer cells and Ly6Chi monocytes during *Entamoeba histolytica* infection. *PLoS Pathogen.* 9(1), e1003096, 2013.

HOBBIE, S.; CHEN L.M.; DAVIS, R.J.; GALÁN, J.E.; Involvement of mitogenactivated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 159:5550-5559, 1997.

HOFFMANN, C.; GALLE, M.; DILLING, S.; KÄPPELI, R.; MÜLLER, J.A.; SONGHET, P.; BEYAERT, R.; HARDT, W.D.; In macrophages, caspase-1 activation by SopE and the type III secretion system-1 of *S. typhimurium* can proceed in the absence of flagellin. *PLoS One* 5:e12477, 2010.

HOUP, E.R.; GLEMBOCKI, A.J.; OBRIG, T.G.; MOSKALUK, C.A.; LOCKHART, L.A.; WRIGHT, R.L.; SEANER, R.M.; KEEPERS, T.R.; WILKINS, T.D.; PETRI JR, W.A.; The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J. Immunol. Baltimore.* 169: 4496-4503, 2002.

HUSTON, C.D.; Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol.* 20: 6-23, 2004.

IBARRA, J.A.; STEELE-MORTIMER, O.; *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cellular Microbiology.* 11:1579-1586, 2009.

JACKSON, T.F.; *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int J Parasitol.* 28(1):181-6, 1998.

JACOBS, A.L.; CARSON, D.D.; Uterine epithelial cell secretion of interleukin-1 α induces prostaglandin E₂ (PGE₂) and PGF₂ α secretion by uterine stromal cells in vitro. *Endocrinology*. 132:300-308, 1993.

JACOBS, A.L.; HWANG, D.; JULIAN, J.; CARSON, D.D.; Regulated expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by uterine stroma *Endocrinology*. 135: 1807-1815, 1994.

JARILLO-LUNA, R.A.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; TSUTSUMI, V.; *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. *Exp. Parasitol.*, New York. 101: 40-56, 2002.

KAGNOFF, M.F.; ECKMANN, L.; Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J. Clin. Investig.* 100:6-10, 1997.

KATZENSTEIN, D.; RICKERSON, V.; BRAUDE, A.; New concepts of amebic liver abscess derived from hepatic imaging, serodiagnosis, and hepatic enzymes in 67 consecutive cases in San Diego. *Medicine (Baltimore)*. 61: 237-46, 1982.

KEENE, W.E.; HIDALGO, M.E.; OROZCO, E.; MCKERROW, J.H.; *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp. Parasitol.* 71: 199-206, 1990.

KERSHENOBISH, D.; CORONA, D.L.; Amebiasis Hepática. In: Sociedad Mexicana de Parasitología (Ed), Amibiasis em el siglo XXI. IDISA Press, México. 44-56, 2008.

KIM, J.M.; JUNG, H.C.; JIN, D.Z.; IM, K.I.; SONG, I.S.; KIM, C.Y.; Cytokine genes are down-regulated when attachment of *Entamoeba histolytica* to HT-29 colon epithelial cells is prevented. *Scand J Immunol.* 45(6):613-7, 1997.

KRETSCHMER, R.R.; Amebiasis: Infection and Disease by *Entamoeba histolytica*. CRC Press, Boca Raton, FL.59-60, 1990.

LEIPPE, M.; ANDRA, J.; MULLER-EBERHARD, H.J.; Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 2602-2606, 1994a.

LEIPPE, M.; SIEVERTSEN, H. J.; TANNICH, E.; HORSTMANN, R. D.; Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. Parasitology 111: 569-574, 1995.

LEIPPE, M.; Amoebapores. Parasitol. Today. 13: 178-183, 1997.

LEIVA, B.; LEBBAD, M.; WINIECKA-KRUSNELL, J.; ALTAMIRANO, I.; TÉLLEZ, A.; LINDER, E.; Over diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua. A microscopic, triage parasite panel and PCR study. Arch Med Res, 37(4):529-34, 2006.

LEVECKE, B.; DREESEN, L.; BARRIONUEVO-SAMANIEGO, M.; BENÍTEZ, O.W.; PRAET, N.; BRANDT. J.; et al.; Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. Trans R Soc Trop Med Hyg. 105:737-739, 2011.

LI, E., YANG, W. G., ZHANG, T.; STANLEY JR, S. L.; Interaction of laminin with *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases and its effect on amebic pathogenesis. Infect. Immun. 63:4150-4153,1995.

LIDELL, M.E.; MONCADA, D.M.; CHADEE, K.; HANSSON, G.C.; *Entamoeba histolytica* cysteine protease cleave the MUC-2 in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proc. Natl. Acad. Sci Usa. 103: 9298-9303, 2006.

LIN J.Y.; CHADEE, K.; Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol.* 48: 3999-4005, 1992.

LÓPEZ-VANCELL, R.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R.; Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 86: 226-231, 2000.

MANN, B.J.; CHUNG, C.N.; DODSON, J.M.; Neutralizing monoclonal antibody epitopes of *Entamoeba histolytica* galactose adhesion to the cysteine rich extracellular domain of the 170 kilodalton heavy subunit. *Immunology.* 61: 1723-1728, 1997.

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

MOLDOVEANU, A.C.; DICULESCU, M.; BRATICERVICI, C.F.; Cytokines in inflammatory bowel disease. *Rom. J. Intern. Med.* 53(2):118-127, 2015.

MONCADA, D.; KELLER, K.; CHADEE, K.; *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. *Infect. Immun.* 71: 838-844, 2003.

MOODY, S.; BECKER, S.; NUCHAMOWITZ, Y.; MIRELMAN, D.; Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology.* 114: 95-104, 1997.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZÁLEZ, E.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A.; GARCÍA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMÉNEZ, C.; Infection by immunodeficiency virus-1 is not risk factor for amebiasis. *AM J Trop Med Hyg.* 73:296-300.

MORTIMER, L.; CHADEE, K.; The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Exp Parasitol.* 126: 366-380, 2010.

NATARAJAN, A.; SOUZA, R.E.; LAHOTI. N.G.; CHANDRAKALA. S.R.; Ruptured liver abscess with fulminant amoebic colitis: a case report with review. *Trop Gastroenterol.* 21: 201-203, 2000.

NEAL, R.A.; Some observations on the variation of virulence and response to chemotherapy of strains of *Entamoeba histolytica* in rats. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 44: 439-452, 1951.

NIEUWENHUIS, E.E.; MATSUMOTO, T.; LINDENBERGH, D.; WILLEMSSEN, R.; KASER, A.; SIMONS-OOSTERHUIS, Y.; BRUGMAN, S.; YAMAGUCHI, K.; ISHIKAWA, H.; AIBA, Y.; KOGA, Y.; SAMSOM, J.N.; OSHIMA, K.; KIKUCHI, M.; ESCHER, J.C.; HATTORI, M.; ONDERDONK, A.B.; LUMBERG, R.S.; Cd1d-dependent regulation of bacterial colonization in the intestine of mice. *J Clin Invest.* 119:1241-1250, 2009.

NORTH, M.J.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today.* 6: 270-5, 1990.

OLIVEIRA, F.M.S.; NEUMANN, E.; GOMES, M.A.; CALIARI, M.V.; *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol.* 5: 9-14, 2015.

OLIVEIRA, F.M.S.; COELHO, B.H. ; PRATA, L.O. ; SANTIAGO, A.F. ; ALVES, A.C. ; FARIA, A.M.C. ; GOMES, M.A. ; CALIARI, M.V.; Susceptibility to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to reduction in *natural killer T*-lymphocytes in C57BL/6 mice. *Current Infectious Disease Reports.*4: 22-29, 2012.

OUATTARA, M.; N'GUÉSSAN, N.A.; YAPI, A.; N'GORAN, E.K.; Prevalence and Spatial Distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among Schoolchildren in Agboville Area (Côte d'Ivoire). *Plos neglected diseases.* 4(1):574, 2010.

ÖZKAN, S.; TÜZÜN, H.; GÖRER, N.; CEYHAN, M.; AYCAN, S.; ALBAYRAK, S.; Water usage habits and the incidence of diarrhea in rural Ankara, Turkey. *Trans Soc Trop Med Hyg.* 101(11):1131-5, 2007.

PARASHAR, U.D.; BREESE, J.S.; GLASS, R.I.; The global burden of diarrhoeal disease in children. *Bull World Health Organ.* 81:236, 2003.

PAWLOWSKI, S.W.; WARREN, C.A.; GUERRANT, R.; Diagnosis and treatment of acute or persistent diarrhea. *Gastroenterology.* 136:1874-1886, 2009.

PAZ, M.G.A. DA.; ALMEIDA, M.F.; GÜNTHER, W.M.R.; Prevalência de diarreia em crianças e condições de saneamento e moradia em áreas periurbanas de Guarulhos, SP. *Rev Bras Epidemiol.* 15(1): 188-97,2012.

PEREZ-TAMAYO, R.; MONTFORT, I.; OLIVOS-GARCÍA, A.; RAMOS, E.; OSTRIA, C.B.; Pathogenesis of acute experimental liver Amebiasis. *Arch. Med.Res.* 37: 203-209, 2006.

PETRI JR, W. A.; SMITH JR, R.D.; SCHLESINGER, P.H.; MURPHY, C.F.; RAVDIN, J.I.; Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* 80: 1238-1244, 1987.

PILLAI, D.R.; KEYSTONE, J.S.; SHEPPARD, D.C.; MACLEAN, J.D.; MACPHERSON, D.W.; KAIN, K.C.; *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: Epidemiology and comparison of diagnostic methods in a setting of non-endemicity. *Clinical Infectious Diseases.* 29: 1315-1318, 1999a.

PILLAI, D.R.; KOBAYASHI, S.; KAIN, K.C.; *Entamoeba dispar*: molecular characterization of the Galactose/ N-Acetyl-D-galactosamine lectin. *Exp. Parasitol.* New York. 99: 226-234, 2001.

PRADO, M.S.; BARRETO, M.L.; STRINA, A.; FARIA, A.S.; NOBRE, A.A.; JESUS, S.R.; Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na Cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Rev Soc Bras Med Trop.* 34: 99-101, 2001.

QUE, X.; REED, S.L.; The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. *Parasitol. Today.* 13: 190-194, 1997.

RAVDIN, J.I.; GUERRANT, R.L.; A review of the parasite cellular mechanisms involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev Infect Dis.* 4:1185-1207, 1982.

RAVDIN, J.I.; STANLEY, P.; MURPHY, C.F.; PETRI JR, W.A.; Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. *Infect. Immun.* 57: 2179-2186, 1989.

RAMOS, F.; GARCÍA, G.; VALADEZ, A.; MORÁN, P.; GONZÁLEZ, E.; GÓMEZ, A.; MELENDRO, E.I.; VALENZUELA, O.; XIMÉNEZ, C.; *E. dispar* strain: analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution. *Mol Biochem Parasitol.* 141 (2):175-177, 2005.

REEVES, R.E.; Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn. *Adv Parasitol.* 23: 42-105, 1984.

REED, S.L.; KEENE, W.E.; AND MCKERROW, J.H.; Thiol proteinase expression and pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2772-2777, 1989.

REED, S.L.; EMBER, J.A.; HERDMAN, D.S.; DISCIPIO, R.G.; HUGLI, T.E., GIGLI, I.; The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.* 155: 266-274, 1995.

REYES, L.; LEÓN, R.; Diferenciación de *Entamoeba histolytica* / *Entamoeba dispar* y los nuevos hallazgos em La patogénesis de La amibiasis intestinal. *Rev costarric cienc Méd.* 23:3-4, 2002.

RIEHL, T.; COHN, S.; TESSNER, T.; SCHOLOEMANN, S.; STENSON, W.F.; Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology*. 118:1106-1116, 2000.

RICO, G.; LEANDRO,E.; ROJAS,S.; GIMENEZ, J.A.; KRETSCHMER, R.R.; The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Paratitol Res*. 90: 264-267, 2003.

RIVERA, W.L.; TACHIBANA, H.; KANBARA, H.; Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica* *Entamoeba dispar* in the Northern Philippines as detected by the polimerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 59(6): 916-921, 1998.

RIVERO-NAVA, L.; AGUIRRE-GARCÍA, J.; SHIBAYAMA-SALAS, M.; HERNANDEZ-PNDO, R.; TSUTSUMI, V.; CALDROM, J.; *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Exp. Parasitol*. 101:183-192, 2002.

RIVERO, Z.; BRACH, A.; CALCHI, M.; DÍAZ, I.; ACURERO, E.; MALDONADO, A.; ET AL.; Detección y diferenciación de *Entamoeba histolytica* y *Entamoeba dispar* mediante reacción en cadena de la polimerasa en individuos de una comunidad del Estado Zulia, Venezuela. *Cad. Saúde Pública*. 25(1):151-159, 2009.

SALATA, R.A. PEARSON, R.A.; RAVDIN J.; Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. *J. Clin. Invest*. 76: 491-499, 1985.

SALATA, R.A.; RAVDIN J.; The Interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* increases cytopathogenicity for liver cell monolayer. *J. Infect. Dis*. 154: 19-26, 1986.

SALCEDO, S.P.; NOURSADEGHI, M.; COHEN, J.; AND HOLDEN, D.W.; Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell Microbiol* 3: 587–597, 2001.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B.; RAMÍREZ-GIL, M.; VÁZQUEZ-MOCTEZUMA, I.; RAMOS-MARTÍNEZ, E.; TALAMÁS-ROHANA, P.; *Entamoeba histolytica*: induction of cyclooxygenase-2 expression during amoebic liver abscess formation in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Experimental Parasitology*. 106:119-125, 2004.

SANTOS, F.L.; CERQUEIRA, E.J.L.; SOARES, N.M.; Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38(2):196-198, 2005.

SARGEANT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; GRENE, J.D.; The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 72(5):519-21,1978.

SEYDEL, K.B.; ZHANG, T.; STANLEY, JR.; S.L.; Neutrophils play a critical role in early resistance to amoebic liver abscess in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun*. 65: 3951-3953,1997.

SEYDEL, K.B.; LI, E.; ZHANG, Z.; STANLEY JR, S.L.; Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amoebic infection of human intestine. *Gastroenterology* 115: 1446-1453, 1998.

SILVA, E.F.; *Entamoeba moshkovskii* TSHALAI, 1941: Novos focos na América do Sul; aspectos da morfologia e biologia em comparação com a *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903 e *Entamoeba ranarum* GRASSI, 1879, Belo Horizonte. Departamento de Parasitologia. 141p. 1972.

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; PÓVOA, M.M.; Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área

metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 21: 969-973, 2005.

SINGER, I.I.; KAWKA, D.W.; SCHOLOEMANN, S.; TESSNER, T.; RIEHL, T.; STENSON, W.F.; Ciclooxigenase-2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 115:297-306, 1998.

SHARMA, M.; VOHRA, H.; BHASIN, D.; Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. *Parasitology*, London.137: 783-796, 2005.

SHIBAYAMA, M.; DOLABELLA, S.S.; SILVA, E.F.; TSUTSUMI, V.; A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amebic liver abscess in hamsters. *Ann. Hepatol*. 6: 117-118, 2007.

SCHULTE, W.; SCHOLZE, H.; Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J. Protozool*. 36: 2772-2777, 1989.

STANLEY JR, S.L.; HIZENGA, H.; LI, E.; Isolation and partial characterization of a surface glycoconjugate of *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 50: 127-138,1992.

STANLEY JR, S.L.; ZHANG, T.; RUBIN, D.; AND LI, E.; Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun*. 63:1587-1590, 1995.

STANLEY JR, S.L.; REED, S.L.; Microbes and microbial toxins: Paradigms for microbial-mucosal infections. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 280: 1049-1054, 2001.

STANLEY JR, S.L.; Amoebiasis. *Lancet*, London. 361:1025-1032, 2003.

STAUFFER, W.; ABD-ALLA, M.; RAVDIN, J.I.; Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. Arch Med Res. 37:266-269, 2006.

STENSON, W.F.; ZHANG, Z.; RIEHL, T.; STANLEY, S.L.JR.; Amebic Infection in the Human Colon Induces Cyclooxygenase-2. Infection and Immunity. 3382-3388, 2001.

TANNICH, E.; ET AL.; Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Washington. 86: 5118-5122, 1989.

TAVARES-DIAS, M.; GRANDINI, A.G.; Precalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitose na população de São José da Bela Vista, São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 32: 5-63, 1999.

TAVARES, P.; RIGOTHIER, M.C.; KHUN, H.; ROUX, P.; HUERRE, M.; GUILLÉNS, N.; Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. Infect. Immun. 73: 1771-1778, 2005.

TEIXEIRA, J.C.; PUNGIRUM, M.E.M.C.; Análise da associação entre saneamento e saúde nos países em desenvolvimento da América Latina e do Caribe, empregando dados secundários do banco de dados da Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS. Rev Bras Epidemiol. 8 (4): 356-76, 2005.

THORNTON, D.J.; SHEEHAN, J.K.; From mucins to mucus: toward a more coherent understanding of this essential barrier. Proc Am Thorac Soc. 1:54-61, 2004.

TRAN, V.Q.; HERDMAN, D.S.; TORIAN, B.E.; REED, S.L.; The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. J. Infect. Dis. 177: 508-511, 1998.

TREVETT, A.F.; CARTER, R.C.; TYRREL, S.F.; The importance of domestic water quality management in the context of fecal-oral disease transmission. *J Water Health.* 3(3): 259-70, 2005.

TSE, S.K.; CHADEE, K.; Biochemical characterization of rat colonic mucins secreted in response to *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, Washington. 60: 1603-1612, 1992.

TSOLIS, R.M.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A.; BAUMLER, A.J.; Contribution of *Salmonella typhimurium* virulence factors to diarrheal disease in calves. *Infect. Immun.* 67:4879-4885, 1999.

TSUTSUMI, V.; ANAYA-VELÁZQUEZ, F.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; Amibiasis intestinal experimental: invasión y extensión de la lesión amibiana. *Arch Invest Med.* 21 (Suppl. 1): 47-52, 1990.

TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M.; Experimental Amebiasis: A Selected Review of Some *in vivo* Models. Elsevier. 9: 210-220, 2006.

UNICEF.; (Fundo das Nações Unidas para a Infância) Situação mundial da infância. Brasília (DF). 2005.

UNICEF.; United Nations International Children's Emergency Fund; WHO-World Health Organization. Diarrhea: why children are still dying and what can be done. UNICEF; WHO: Geneva; New York; 2009.

VALENZUELA O, MORÁN P, RAMOS, F, CARDOZA JI, GARCÍA G, VALADEZ A, ROJAS L, GARIBAY A, GONZÁLEZ E, XIMÉNEZ C. Short report: Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80: 51-54, 2009.

VAN SER SLUIS, M.; DE KONING, B.A.; DE BRUIJN, A.C.; ET AL.; MUC-2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC-2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology.* 131:117-129, 2006.

VARIYAM, E.P.; Luminal host-defence mechanisms against invasive amebiasis. Trends Parasitol, Oxford. 23: 108-111, 2006.

VELAQUEZ, C.; SHIBAYAMA-SALAS, M.; AGIRRE-GARCÍA, J.; Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. Parasite Immunol. 20: 255-262, 1998.

VENTURA-JUÁREZ, J.; BARBA-GALLARDO, L.F.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ-MEDINA, L.; MÁRQUEZ-DÍAZ, F.; SOSA-DÍAZ, S.J.; GERARDO-RODRÍGUEZ, M.; GONZÁLEZ-ROMO, R.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R.; Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. Parasite Immunology. 29: 201-209, 2007.

VOHRA, H.; BHATTI, H.S.; GANGULY, N.K.; MAHAJAN, R.C.; Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea-pigs. Trans R Soc Trop Med Hyg. 83(5):648-650, 1989.

VINES, R.R.; RAMAKRISHNAN, G.; ROGERS, J.B.; LOCKHART, L.A.; MANN, B.J.; PETRI JR, W.A.; Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a $\beta 2$ integrin motif. Mol. Biol. Cell. 9: 2069-2079, 1998.

WALKER, C.L.F.; SACK, D.; BLACK, R.E.; Etiology of Diarrhea in Older Children, Adolescents and Adults: A Systematic Review. Plos Negl Trop Dis. 4 (8):1-8. 2010.

WALSH, J.A.; Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev. Infect. Dis. 8: 228-238, 1986.

WANG, W.; KELLER, K.; CHADEE, K.; Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. Infect. Immun. 60: 3169-3174, 1992.

WILLHOEFT, U.; HAMANN, L.; TANNICH, E.; A DNA sequence corresponding to the gene encoding Cysteine Proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. *Infect Immun.* 67: 5925-5929, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).; Report of a consultation of experts on Amoebiasis (México), *Weekly Epidemiological Record*, Geneva. 72: 97-100,1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).; Proceedings of the XIII Seminar on Amebiasis. Mexico City, Mexico, January 29-31. *Arch Med Res*; 28 Spec No.1-329, 1997b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).; The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization. 2008.

XIMÉNEZ, C.; MORÁN, P.; ROJAS, L.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A.; Reassessment of the epidemiology of amebiasis: State of the art. *Infection, Genetics and Evolution.* 9: 1023-1032, 2009.

XIMÉNEZ, C.; CERRITOS, R.; ROJAS, L.; DOLABELLA, S.; MORAN, P.; SHIBAYAMA, M.; GONZÁLEZ, E.; VALDEZ, A.; HERNÁNDEZ, E.; VALENZUELA, O.; LIMÓN, A.; PARTIDA, A.; SILVA, E. E.; Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 7: 1105-112, 2010.

ZHOU, D.; MOOSEKE, M.S.; GALÁN, J.E.; Role of the *S. typhimurium* actin-binding protein SipA in bacterial internalization. *Science.* 283: 2092-2095, 1999.

ZHOU, D.; MOOSEKE, M.S.; GALÁN, J.E.; An invasion-associated salmonella protein modulates the actin-bundling activity of plastin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:10176-10181, 1999a.

ZHANG, S.; SANTOS, S.R.L.; TSOLIS, R.M.; STENDER, S.; HARDT, W.D.; BAUMLER, A.J.; ADAMS, L.G.; The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium

effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. *Infect. Immun.* 70:3843-3855, 2002.

9. ANEXOS

9.1 Artigo publicado

Entamoeba dispar: Could it be pathogenic

Fabrcio Marcus Silva Oliveira, Elisabeth Neumann¹, Maria Aparecida Gomes²,
Marcelo Vidigal Calieri

Departments of General Pathology, ¹Microbiology and ²Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

KEY WORDS

Amebiasis, *entamoeba dispar*,
Entamoeba histolytica

ABSTRACT

Amebiasis is a disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. This ameba can colonize the human intestine and persist as a commensal parasite, similar to *Entamoeba dispar*, an ameba considered to be non-pathogenic. The similarities between *E. histolytica* and *E. dispar* make the latter an attractive model for studies aimed at clarifying the pathogenesis of amebiasis. However, in addition to being an interesting experimental model, this relative of *E. histolytica* remains poorly understood. In the 1990, it was believed that *E. dispar* was unable to produce significant experimental lesions. This scenario began to change in 1996, when *E. dispar* strains were isolated from symptomatic patients in Brazil. These strains were able to produce liver and intestinal lesions that were occasionally indistinguishable from those produced by *E. histolytica*. These and other findings, such as the detection of *E. dispar* DNA sequences in samples from patients with amebic liver abscess, have revived the possibility that this species can produce lesions in humans. The present paper presents a series of studies on *E. dispar* that begin to reveal a new facet of this protozoan.

INTRODUCTION

The protozoan *Entamoeba histolytica* is the causative agent of amebiasis. There are approximately 50 million cases of amebiasis per year worldwide, and it kills nearly 100 thousand people annually.^[1] Amebiasis is the most severe disease caused by protozoans that afflict the human intestine and the second leading cause of death

among parasitic diseases.^[2] It is characterized by two major clinical syndromes, amebic colitis and amebic liver abscess.^[3] The importance of amebiasis stems from its widespread geographical distribution, its high incidence, and its association, in some cases, with severe and potentially fatal pathologies. It therefore remains a public health problem in developing countries despite the existence of medications.^[4]

E. histolytica was first described over 130 years ago in Russia by L6sch in 1875, as cited by Jackson (1998).^[5] and was formally named in 1903 by Schaudinn, as cited by Clark (1998).^[6] In an attempt to explain the high prevalence of asymptomatic infected individuals, the Dualist Theory was proposed by Brumpt (1925), as cited by Walsh (1986): this theory proposed the existence of two amebas that were morphologically identical but biologically distinct.^[7] It was believed, however, that only *E. histolytica* should be able to penetrate tissues and produce invasive amebiasis. Subsequently, *E. histolytica* was separated into two distinct groups through isoenzyme electrophoresis: Pathogenic and

Address for correspondence

Prof. Marcelo Vidigal Calieri,
Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ci6ncias Biol6gicas,
Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Ant6nio Carlos, 6627, Belo
Horizonte, Minas Gerais, CEP 31 270-010 Brasil.
E-mail: calieri@icb.ufmg.br

Access this article online

Quick Response Code: 	Website: www.tropicalparasitology.org
	DOI: 10.4103/2229-5070.148887

non-pathogenic (NP), according to Brumpt 1925, as cited by Sargeant *et al.* (1978).^[2] The NP species would then explain the prevalence of asymptomatic disease in approximately 90% of infected individuals worldwide.^[7] The definitive proof that these two groups represented distinct species was obtained by deoxyribonucleic acid (DNA) analysis,^[8] and the new species was called *Entamoeba dispar*, by Brumpt 1925, as cited by Diamond and Clark (1993).^[24] The isoenzyme profiles, the differences in gene sequences, and the use of monoclonal antibodies confirmed the existence of two distinct species that have since been officially recognized by the World Health Organization (WHO).^[2] Currently, it is estimated that *E. histolytica* and *E. dispar* infect approximately 12% of the world population, with infections with the latter being substantially more common and with infections with *E. histolytica* possibly representing 1% of infections.^[2]

To differentiate infection by *E. histolytica* from infection by *E. dispar*, parasite antigen detection in stool samples^[25] and gene segment amplification in both stool and amebic liver abscess samples^[26] have been used. Epidemiological surveys have shown that most asymptomatic individuals infected by one of these species are colonized by *E. dispar*. However, in some regions, there is a high prevalence of *E. histolytica* in asymptomatic individuals and in patients with diarrhea.^[27-28] Studies on the genetic variation among ameba species provide important clues to explain the different clinical presentations of *E. histolytica* infection and provide data on the geographical distribution and mobility of epidemiologically important strains. Studies on the epidemiology of amebiasis in endemic areas have used molecular approaches to characterize the prevalent species of *Entamoeba* in human infection. These studies have attempted to correlate the different species and sub-populations with the diverse spectrum of clinical forms: (a) Symptomatic infections caused by *E. histolytica* (intestinal or extra-intestinal amebiasis); (b) asymptomatic *E. dispar* infections; (c) mixed asymptomatic infections caused by *E. histolytica* and *E. dispar*; and (d) asymptomatic *E. histolytica* infections.^[29]

With the recognition of the species *E. dispar* in 1997,^[2] several studies were conducted comparing this species with *E. histolytica*. *E. dispar* is morphologically similar to *E. histolytica* and has been considered as a distinct species based on isoenzyme patterns of amebas isolated from asymptomatic patients and those with invasive disease.^[3] The two *Entamoeba* species have nearly identical sets of genes encoding the major virulence factors. However, *E. histolytica* secretes approximately 10 to 1,000 times more cysteine proteases than *E. dispar*.^[27] The activity of *E. dispar* amebaporesis is approximately one-third of that observed in *E. histolytica*.^[24] Furthermore, the Gal/GalNac lectin of *E. dispar* shows homology with two members of the heavy-chain family and four of the light-chain

family in comparison to the *E. histolytica* lectin, leading to reduced adhesion and cytotoxicity *in vitro*.^[24]

Before its identification as a separate species, *E. dispar* was described as NP *E. histolytica*.^[24] Experimental studies involving NP *E. histolytica* failed to demonstrate its ability to produce significant lesions in laboratory animals.^[24,25] Moreover, after the description of *E. dispar*, experimental research continued to show similar results. Espinosa-Cantellano *et al.*, inoculated 5×10^8 and 5×10^9 *E. dispar* trophozoites in hamsters by the intra-hepatic route. Seven days after infection, the authors observed only focal inflammatory infiltrate with no formation of necrosis and granuloma.^[24] These findings, coupled with *in vitro* observations that *E. dispar* secretes toxic products in lower amounts and with lower activity than *E. histolytica*, reinforced the idea that *E. dispar* was commensal and thus incapable of generating human and experimental lesions. In fact, the axenic *E. dispar* SAW 760 strain produced a milder cytopathic effect on MDCK epithelial cells compared to that produced by *E. histolytica*.^[24]

The prevalence of *E. dispar* is not known. It is speculated that this species is responsible for most infections that were previously considered to be associated with *E. histolytica*. Studies worldwide show a higher prevalence of *E. histolytica* in developing countries; however, even in these countries, the prevalence of *E. dispar* is high.^[24,29-30]

In Brazil, amebiasis is an important cause of morbidity.^[24,30] *E. histolytica* is most prevalent in Manaus, where it infects 6.8% of the population,^[27] in Fortaleza, where it infects 14.9% of the low-income population,^[24] and in Belém, where it infects 29.5% of individuals living in the metropolitan area.^[29] In the remaining areas of the country, studies show a higher prevalence of *E. dispar*. In Pernambuco, Belo Horizonte (Minas Gerais), and Salvador (Bahia), only *E. dispar* was detected, with the exception of Minas Gerais. Our group has found an infection rate of nearly 5% with *E. histolytica*/*E. dispar* in communities of great Belo Horizonte.^[30] To date, 99% of these infections have been associated with *E. dispar* (unpublished data).

E. dispar is considered non-invasive and thus related to asymptomatic infections. In Brazil, non-dysenteric colitis represents a very frequent clinical presentation. The ameba isolates belonging to this group were analyzed by isoenzymes and PCR and identified as *E. dispar*. Our group was the first to identify *E. dispar* isolated from symptomatic cases.^[31,42] The strains isolated in these cases were also able to infect experimental animals. As noted earlier, the first experimental studies involving NP *E. histolytica* (*E. dispar*) did not succeed in reproducing

the amebic lesions. However, since 2000, studies published using xenic *E. dispar* strains isolated in Brazil began to show results different than those observed in previous reports. *E. dispar* strains isolated from patients living in the North and Southeast regions of Brazil were inoculated in the liver (5×10^4 trophozoites) and cecum (1×10^4 trophozoites) of hamsters and rats, respectively.^[24] All animals showed hepatic and intestinal lesions similar to those caused by *E. histolytica*, as well as the presence of trophozoites. The same was reported by Costa *et al.*, after inoculating the liver of hamsters with 2.5×10^4 trophozoites of other *E. dispar* strains also isolated from symptomatic and asymptomatic individuals in Brazil.^[24] Inoculation of the microbiota of each strain in control hamsters did not lead to liver lesions or produced only discrete purulent lesions, indicating that *E. dispar* trophozoites were responsible for the development of liquefactive necrosis. Unlike the xenic strains, the use of axenic^[22] and monoxenic^[24,42] strains of *E. dispar* failed to produce amebic abscesses, demonstrating the importance of bacterial association to acquire pathogenicity through unknown mechanisms. Recently, two other studies described what has been observed since 2000. Similar to the MCR strain, the experimental amebic liver abscess was reproduced in hamsters inoculated with xenic *E. dispar* strains also isolated from Brazilian asymptomatic patients.^[24,47]

Research on the genetic diversity of *E. histolytica* and *E. dispar* in individuals with asymptomatic infection or invasive disease has shown high polymorphism of both *Entamoeba* species.^[24,42] Evidence for genetic diversity has been demonstrated through differences in the genotypes of *E. histolytica* isolated from stool and amebic liver abscess samples from the same patient.^[24] Other authors also detected different genotypes of *E. histolytica* trophozoites isolated from two distinct amebic liver abscesses from the same patient.^[24] As with certain *E. histolytica* strains, *E. dispar* strains may also exhibit varied biological behavior as a result of genetic diversity.^[24]

The use of more precise methods for quantifying amebic lesions showed that the liver abscess produced by the *E. dispar* MCR strain is as important and significant as that produced by the *E. histolytica* EGG strain.^[24] It is noteworthy that although the EGG strain was isolated from a symptomatic patient presenting dysenteric colitis and amebic abscess, the MCR strain was isolated from an asymptomatic patient. The kinetics of amebic liver abscess produced by a single *E. dispar* strain was studied over 8 days of infection, during which it was possible to describe changes such as the different phases of epithelioid granuloma, thrombosis and apoptosis.^[24] Although polyclonal antibodies were used in these two studies, immunohistochemical identification of *E. dispar*

trophozoites greatly aided the counting of parasites and the qualitative and quantitative assessment of lesions associated with parasitism.

Our group inoculated the *E. dispar* MCR strain into the liver and cecum of different hosts to evaluate their susceptibility. We found that the hamster is the fittest animal to develop an abscess by *E. dispar* (100% of challenged animals) and that both the mouse and the rat presented amebic colitis in approximately 70% of cases (unpublished data).

By studying the *in vivo* binding of antibodies and complement to trophozoites of the MCR strain, we observed that trophozoite binding and destruction was higher than in animals inoculated with the *E. histolytica* EGG strain.^[24] Together with the larger amounts of *E. dispar* trophozoite debris observed, these findings confirmed the lower ability of this species to escape the action of the immune system. The joint study of MCR and EGG strains provided a better understanding of the relationship between the immune system and the development of amebic liver abscess. Regarding the virulence and pathogenicity inherent to each species, antibodies, complement, macrophages, and neutrophils seem to interfere in the selection of more resistant trophozoites and in the development of amebic liver abscesses.^[24,25]

The explanation of the acquisition of pathogenicity of the *E. dispar* strains may lie in their interaction with bacteria. The observation that these lesions were obtained only after the association of bacteria with *E. dispar* suggest that the bacteria may be causing early injuries that favor the proliferation of and tissue invasion by trophozoites, by increasing the expression of virulence factors and/or by incorporating genes. In fact, the symbiosis between bacteria and *E. histolytica* or *E. dispar* may modulate phenotypic changes and virulence properties of ameba.^[24,25]

A recent *in vitro* study showed that the increased virulence of the *E. histolytica* HM1: MSS strain was mediated by the presence of pathogenic enterobacteria. In this study, the researchers observed that the phagocytosis of *Shigella dysenteriae* and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) by *E. histolytica* trophozoites increased the cytopathic effect of trophozoites on epithelial cells as well as the cysteine protease activity and the expression of Gal/GalNAc-specific lectin. The authors also suggest that infection with enterobacteria may render the intestine epithelial cells more susceptible to the virulence mechanisms of *E. histolytica*.^[26]

Although *E. dispar* is considered commensal for humans, evidence shows that additional in-depth studies are required to address this issue. *E. dispar* has been isolated

from patients presenting symptoms of non-dysenteric colitis^[21,42] and from a patient with dysenteric colitis.^[22] Moreover, DNA sequences of *E. dispar* were detected and genotyped in samples from patients with amebic liver abscess, suggesting that *E. dispar* may also be involved in the development of lesions in the human intestine and liver.^[24]

Given the evidence that *E. dispar* can produce significant experimental lesions in the presence of bacteria, along with the high frequency of intestinal co-infections that affect millions of people annually, we believe that the most important steps are further in-depth studies on the relationship between *E. dispar* and bacteria. Thus, we began a preliminary analysis of the possible interference of *Salmonella typhimurium* infection (intra-gastric intubation of 10^8 colony-forming units (CFUs) at 14 hours before the amebic infection) with the MCR strain of *E. dispar* (intracecal inoculation of 5×10^6 trophozoites) for approximately 7 days. In Wistar rats infected with *E. dispar* only, intestinal lesions were characterized by areas of mucosal destruction and submucosal inflammation (mixed inflammatory infiltrate, hyperemia, and edema), which sometimes reached the muscle and serosa. The presence of bacteria increased the intestinal necrosis area and the intensity of the inflammatory response. We scanned the necrotic areas through a JVC TK-1270/RGB micro-camera and measured these areas using the KS300 software in the Carl Zeiss image analyzer.^[23] We morphometrically confirmed the development of a larger lesion area of the cecal mucosa in animals infected with both *E. dispar* and *S. typhimurium* ($139,822 \pm 30,089 \mu\text{m}^2$) compared to the lesion area of the cecal mucosa in animals infected with *E. dispar* only ($50,657 \pm 5,131 \mu\text{m}^2$) ($P < 0.0001$). Infection of animals with *S. typhimurium* alone did not lead to the destruction of the colonic mucosa as observed in *E. dispar* infection, and only the presence of areas of epithelial shedding was observed. The inflammation caused by *S. typhimurium* alone in the sub-mucosal layer was substantially reduced compared to that observed in animals co-infected with *E. dispar* and *S. typhimurium*. Future molecular biology studies will determine whether the bacteria favored the expression of amebic virulence factors and/or whether the epithelial lesions alone caused by bacteria favor trophozoite adhesion and invasion.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by The Minas Gerais State Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG) and the National Council for Research and Development (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq).

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). Report of a consultation of experts on Amoebiasis (México). Geneva: Epidemiology Bulletin 1997;18:13-14.
2. Stanley SL Jr. Amoebiasis. Lancet 2003;361:1025-34.
3. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amoebiasis. N Engl J Med 2003;348:1565-73.
4. Huston CD. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. Trends Parasitol 2004;20:23-6.
5. Jackson TF. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. Int J Parasitol 1998;28:181-6.
6. Clark CG. Royal society of tropical medicine and hygiene meeting at manson house, London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Trans R Soc Trop Med Hyg 1998;92:361-4.
7. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: Estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986;8:228-38.
8. Sargeant PC, Williams JE, Crene JD. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1978;72:519-21.
9. Tannich E, Horstmann RD, Knobloch J, Arnold HH. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:5118-22.
10. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Eukaryot Microbiol 1993;40:340-4.
11. Haque R, Duggal P, Ali IM, Hossain MB, Mondal D, Sack FB, et al. Innate and acquired resistance to amoebiasis in bangladeshi children. J Infect Dis 2002;186:547-52.
12. Ali IK, Zaki M, Clark CG. Use of PCR amplification of tRNA gene-linked short tandem repeats for genotyping *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2006;43:5842-7.
13. Haque R, Faruque AS, Hahn P, Lyerly DM, Petri WA Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection in children in Bangladesh. J Infect Dis 1997;175:734-6.
14. Gomes MA, Pesquero JB, Furst C, Valle FR, Pesquero JL, Silva EF. An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitology 1999;119:359-62.
15. Evangelopoulos A, Legakis N, Vekalis N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. Parasitol Int 2001;50:185-9.
16. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Morán P, Shibayama M, et al. Human amoebiasis: Breaking the paradigm? Int J Environ Res Public Health 2010;7:1105-20.
17. Reed SL, Keene WE, McKerron JH. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 1989;27:2772-7.
18. Leippe M. Amoebapores. Parasitol Today 1997;13:178-83.
19. Dodson JM, Clark CG, Lockhart LA, Leo BM, Schroeder JW, Mann BJ. Comparison of adherence, cytotoxicity, and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitology 1997;46:225-35.
20. Chadee K, Smith JM, Meerovitch E. *Entamoeba histolytica*: Electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). Am J Trop Med Hyg 1985;34:870-8.

21. Vohra H, Bhatti HS, Ganguly NK, Mahajan RC. Virulence of pathogenic and non-pathogenic symdemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea-pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:648-50.
22. Espinosa Cantellano M, Castañón Gutiérrez C, Martínez-Falomo A. *In vivo* pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch Med Res* 1997;28:204-6.
23. Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Chávez B, Castañón C, Argüello C, Lázaro-Haller A, et al. *Entamoeba dispar*: Ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45:265-72.
24. Acuna-Soto R, Samuelson J, De Girolami F, Zarate M, Mollan-Velasco F, Schoonick G, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:58-70.
25. Guzmán CE, López ME, Reyes F, Gómez JE, Corredor A, Agudelo C. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in stool samples for detection of *E. histolytica* adhesin by ELISA. *Biomédica* 2001;21:167-71.
26. Rivero Z, Brach A, Calchi M, Díaz I, Acurero E, Maldonado A, et al. Detección and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by polymerase chain reaction in a community in Zulia State, Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2009;25:161-9.
27. Reyes L, León R. Differentiation *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* and the new findings in the pathogenesis of intestinal amebiasis. *Rev Costarric Cienc Méd* 2002;23:3-4.
28. Ouattara M, N'Guéssan NA, Yapi A, N'Goran EK. Prevalence and spatial distribution of *Entamoeba histolytica/dispar* and *Giardia lamblia* among schoolchildren in Agboville area (Côte d'Ivoire). *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e6574.
29. Hegazi MA, Patel TA, El-Deek BS. Prevalence and characters of *Entamoeba histolytica* infection in Saudi infants and children admitted with diarrhea at 2 main hospitals at South Jeddah: A re-emerging serious infection with unusual presentation. *Bras J Infect Dis* 2013;17:32-40.
30. Rivera WL, Tachibana H, Kanbara H. Field study on the distribution of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in the northern Philippines as detected by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:916-21.
31. Ramos F, García C, Valader A, Morán F, González E, Gómez A, et al. *E. dispar* strain: Analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution. *Mol Biochem Parasitol* 2006;141:175-7.
32. Leiva B, Lebbad M, Winiacka-Krusnell J, Altamirano I, Téllez A, Linder E. Over diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in Nicaragua: A microscopic, triage parasite panel and PCR study. *Arch Med Res* 2006;37:529-34.
33. Levecke B, Dreesen L, Barrionuevo-Samaniego M, Ortiz WB, Fraet N, Brandt J, et al. Molecular differentiation of *Entamoeba* spp. in a rural community of Loja province, South Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011;105:737-9.
34. Stauffer W, Abd-Alla M, Ravdin JI. Prevalence and incidence of *Entamoeba histolytica* infection in South Africa and Egypt. *Arch Med Res* 2006;37:266-9.
35. Ferreira CB, Marçal Júnior O. Intestinal parasitoses in schoolchildren of Martinésia District, Uberlândia, MG: A pilot study. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997;30:373-7.
36. Santos FL, Cerqueira EJ, Soares NM. Comparison of the thick smear and Kato-Katz techniques for diagnosis of intestinal helminth infections. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;38:196-8.
37. Benetton ML, Gonçalves AV, Meneghini ME, Silva EF, Carneiro M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica/E. dispar* complex: An epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;99:332-40.
38. Braga LL, Gomes ML, Da Silva MW, Façanha FE Jr, Fiuna L, Mann BJ. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:268-71.
39. Silva MC, Monteiro Odo S, Araújo Bdos A, Silva JV, Póvoa MM. Determination of *Entamoeba histolytica* infection in patients from Greater Metropolitan Belém, Pará, Brazil, by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antigen detection. *Cad Saúde Pública* 2006;21:969-73.
40. Gil FF, Busatti HC, Cruz VL, Santos JF, Gomes MA. High prevalence of enteroparasitosis in urban slums of Belo Horizonte-Brazil. Presence of enteroparasites as a risk factor in the family group. *Pathog Glob Health* 2013;107:320-4.
41. de Martines AM, Gomes MA, Viana Jda C, Romanha AJ, Silva EF. Isoenzyme profile as parameter to differentiate pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996;38:407-12.
42. Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. *Parasitology* 1997;114:517-20.
43. Gomes MA, Melo MN, Macedo AM, Pena GF, Caliani MV, Silva EF. Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, biochemical, and molecular parameters. *Arch Med Res* 2000;31:S249-50.
44. Costa AO, Viana JC, Assis D, Rocha OA, Silva EF. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch Med Res* 2000;31:S247-8.
45. Furst C, Gomes MA, Tafuri WL, Silva EF. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Pathologica* 2002;94:22-7.
46. Dolabella SS, Serrano-Luna J, Navarro-García F, Cerritos R, Ximénez C, Galván-Moroyocqui JM, et al. Amoebic liver abscess production by *Entamoeba dispar*. *Ann Hepatol* 2012;11:107-17.
47. Guzmán-Silva MA, Santos HL, Peralta RS, Peralta JM, de Macedo HW. Experimental amoebic liver abscess in hamsters caused by trophozoites of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Exp Parasitol* 2013;134:39-47.
48. Ghosh S, Frisardi M, Ramirez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramirez K, Newton-Sanchez OA, et al. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: Evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J Clin Microbiol* 2000;38:3815-21.
49. Ramos F, Moran F, González E, García C, Ramiro M, Gómez A, et al. High prevalence rate of *Entamoeba histolytica* asymptomatic infection in a rural Mexican community. *Am J Trop Med Hyg* 2006;73:87-91.
50. Ali IK, Clark CG, Petri WA Jr. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect Genet Evol* 2008;8:698-707.
51. Valenzuela O, Morán F, Ramos F, Cardona JI, García C, Valader A, et al. Two different chitinase genotypes in a

- patient with an amoebic liver abscess: A case report. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:51-4.
52. Costa CA, Brito KN, Gomes MA, Caliani MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite* 2007;14:329-34.
53. Costa CA, De Brito KN, Gomes MA, Caliani MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. *Eur J Histochem* 2010;54:e39.
54. Costa CA, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliani MV. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: *In vivo* binding of antibodies and complement. *Parasit Vectors* 2010;3:23.
55. Costa CA, Fonseca TH, Oliveira FM, Santos JF, Gomes MA, Caliani MV. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: An immunohistochemical and morphometric study. *Parasit Vectors* 2011;4:27.
56. Bhattacharya A, Chidyal R, Prasad J, Bhattacharya S, Diamond LS. Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. *Infect Immun* 1992;60:1711-3.
57. Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2006;48:245-50.
58. Galván-Moroyoqui JM, Del Carmen Domínguez-Robles M, Franco E, Mesa I. The interplay between *Entamoeba* and enteropathogenic bacteria modulates epithelial cell damage. *PLoS Negl Trop Dis* 2008;2:e266.
59. Craffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, Romano L, Masucci L. *Entamoeba dispar*: A rare case of enteritis in a patient living in a non endemic area. *Case Rep Gastrointest Med* 2014;2014:498058.

How to cite this article: Oliveira FM, Neumann E, Gomes MA, Caliani MV. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol* 2015; 5:9-14.

Source of Support: Nil. Conflict of Interest: None declared.

DOI: 10.4103/2015.22015

Announcement

iPhone App



Download
iPhone, iPad
application

A free application to browse and search the journal's content is now available for iPhone/iPad. The application provides "Table of Contents" of the latest issues, which are stored on the device for future offline browsing. Internet connection is required to access the back issues and search facility. The application is Compatible with iPhone, iPod touch, and iPad and Requires iOS 3.1 or later. The application can be downloaded from <http://itunes.apple.com/us/app/medknow-journals/id458064375?ls=1&mt=8>. For suggestions and comments do write back to us.



9.2 Artigo submetido

The *in vitro* association of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* increase the gene expression of amebic virulence factors.

Short-title: Influence of *S. Typhimurium* on the virulence of *E. histolytica* and *E. dispar*

Fabício Marcus Silva Oliveira^{1,2}, Sávio Henrique de Cicco Sandes⁴, Luana Oliveira Prata², Mario Abatemarco Junior³, Ana Cláudia de Carvalho Fernandes², Elisabeth Neumann³, Álvaro Cantini Nunes⁴, Maria Aparecida Gomes⁵, Marcelo Vidigal Caliarí²

Author details

¹ Postgraduate Program in Pathology, Institute of Biological Sciences of the Federal University. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

² Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

³ Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

⁵ Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author: Marcelo Vidigal Caliarí (caliari@icb.ufmg.br)

Department of General Pathology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. CEP 31 270-010

Abstract

The mechanisms of acquisition of the amoebic virulence are poorly understood and there are only a few studies on the interaction between *E. histolytica* and bacteria. Moreover, despite the fact that *E. dispar* is considered commensal, some studies have shown that it can produce experimental lesions. We evaluated the induction of amoebic virulence factors by *in vitro* association with *S. Typhimurium*. Total RNA was isolated from cultures of amoebas using TRIzol reagent and reverse transcribed in cDNA using random hexamers primers. The real-time PCR analysis was performed using SYBR Green chemistry and the reference genes actin and GAPDH were used for data normalization. A normalized, relative gene expression value of some of amoebic virulence factors was calculated using a $\Delta\Delta C_q$ method. The association of *S. Typhimurium* with cultures of *E. histolytica* amoebic strain produced an increase in gene expression of amoebapore-A (Ap-A) in the EGGx strain. It was also observed that the association of *S. Typhimurium* with the culture of *E. dispar* strains caused an increase in the expression of Ap-A and cysteine proteinase-5 (CP-5) in the MCR strain, Ap-A and Gal/GalNAC lectin in the ADO strain, and CP-5 and Gal/GalNAC lectin in the VEJ strain. However, the association with *S. Typhimurium* resulted in reduction in CP-2 expression in the VEJ strain. Interestingly the strains of MCR, ADO and VEJ of *E. dispar* studied here demonstrated the ability to express CP-5. *In vitro* association of strains of *E. histolytica* and *E. dispar* with *S. Typhimurium* could increase the Gal/GalNAC lectin expression, Ap-A, and CP-2 and CP-5 at most trials, indicating that the interaction with bacteria can induce virulence in amoebic trophozoites.

Keywords: Amebiasis, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba histolytica*, virulence factors, *Salmonella Typhimurium*

Introduction

The *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) is a protozoan that causes amebiasis, a disease that annually produces about 50 million cases and 100,000 deaths worldwide, mainly characterized by the development of amoebic colitis and amoebic liver abscess [1]. Amebiasis is the most serious protozoan infection that affects the human intestine and the second leading cause of death among parasitic diseases, second only to malaria [2]. The *Entamoeba dispar* (*E. dispar*), another species of amoeba that is considered commensal, was first described by Brumpt in 1925 in an attempt to explain the high percentage of asymptomatic cases that corresponded to about 90% of infected individuals in the world [3].

E. histolytica trophozoites are able to produce different molecules related to induction of tissue damage to the intestinal wall, especially the lectin specific for residues of Galactose and N-acetyl galactosamine (GAL/GALNAC), the cysteine proteinases (CP's), such as CP-2 and CP-5, and the amoebapores such as type A and C [4].

Adhesion of trophozoites to the colonic mucus occurs primarily through the interaction of amoebic lectin specific for GAL/GALNAC with glycoconjugates from the host [5]. The CPs digest and impair the synthesis of Mucin 2 (MUC-2), which is the main component of the intestinal mucus, they cleave collagen, elastin, fibrinogen, and laminin, eliminating mechanical obstacles so the trophozoites may invade the tissue [6,7]. The amoebapores have structural and functional homology with granulolysine and NK-lysin, which are perforins produced by cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells respectively, also capable of forming pores in the cell membrane [8].

Diarrheal diseases, including amebiasis, are an important worldwide public health problem; they have diverse etiology and cause more than 2 million deaths annually, especially in children under 5 years of age [9]. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) is also a common cause of gastroenteritis in humans. *S. Typhimurium* is a member of the family Enterobacteriaceae, a large group of Gram-negative, facultative anaerobic bacteria, many of which are part of the indigenous microbiota of the intestine of vertebrates. Although there are more than 2,500 serovars of *Salmonella*, only a few are commonly

associated with three illnesses in humans: self-limiting gastroenteritis, severe gastroenteritis, and typhoid fever [10].

Research on the genetic diversity of *E. histolytica* and *E. dispar* in individuals with asymptomatic infection or with invasive disease, showed high polymorphism of both species of *Entamoeba* [11,12]. Evidence of this genetic diversity has been demonstrated by the observed differences in the genotypes of *E. histolytica* isolated from stool samples and amebic liver abscess obtained from the same patient [13]. Other authors also detected different genotypes *E. histolytica* trophozoites, isolated from two different amebic liver abscesses [14].

Both species of *Entamoeba* have almost the same set of genes encoding major virulence factors. However, *E. histolytica* secretes about 10 to 1000 times more cysteine proteases than *E. dispar* [15]. Furthermore, amoebapore activity in *E. dispar* is about one third of what is observed in *E. histolytica* [16]. On the other hand, *E. dispar* has been isolated from patients with symptomatic non-dysenteric colitis [17], and *E. dispar* DNA sequences were detected and genotyped in the samples of patients with dysenteric colitis [18] and in patients with amebic liver abscess, suggesting that *E. dispar* may also be involved in the development of lesions in the large intestine and liver in humans [19].

Studies conducted by our research group, as well as other authors, have also demonstrated experimental liver injury in hamsters inoculated with *E. dispar* trophozoites associated with original host intestinal microbiota [20,21]. The observation that these lesions were obtained only after the association of bacteria with *E. dispar*, suggests that some bacteria can be stimulating the virulence development by the trophozoites [20]. In fact, some authors speculate that the symbiosis between bacteria and *E. histolytica* and *E. dispar* can modulate phenotypic modifications and properties of amoeba virulence [22-24].

Researchers have shown in vitro that the increase of virulence of the strain HM:MSS of *E. histolytica* was mediated by the presence of pathogenic enterobacteria. The authors also suggested that infection with enterobacteria could make the epithelial cells of the intestine more susceptible to virulence mechanisms of *E. histolytica* [24]. There are still many questions about the influence of intestinal bacteria on the virulence of amoebae. In this study, we evaluated the influence of the bacterium *Salmonella*

enterica subsp. *enterica* serovar Typhimurium on the virulence of *Entamoeba dispar* and *Entamoeba histolytica* of isolated trophozoites *in vitro* culture.

Methods

Entamoeba cultures

EGG xenic (EGGx) strain of *E. histolytica* isolated in 1988 in the laboratory of Amoebiasis belonging to the department of Parasitology of ICB-UFMG, from a patient presenting dysenteric colitis and amebic hepatic necrosis, was used. The MCR, ADO and VEJ xenic strains of *E. dispar*, isolated in 1988 in the Laboratory of Amoebiasis from patients presenting non-dysenteric colitis and negative serology for *E. histolytica*, were also used. Serology, zymodeme and PCR methodologies identified the samples as strains belonging to *E. histolytica* and *E. dispar*. The EGG xenic strain of *E. histolytica* and the strains MCR, ADO, VEJ of *E. dispar* were grown in Pavlova medium.

Strain of *Salmonella* Typhimurium

Strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) of human origin, kindly provided by Professor Elisabeth Neumann, was kept in the Laboratory of Ecology and Physiology of Microorganisms of the ICB/UFMG. The strain was grown in Brain Heart Infusion (BHI) medium grown for 18 hours at 37 ° C in aerobiosis and 0.2 ml of dry heat sterilized glycerin was added. For the experiments the strain was activated twice in BHI broth (aerobiose) at 37 ° C for 18 hours without shaking. To evaluate the growth of *S. Typhimurium*, successive dilutions of the activated cultures were made in 0.85% sterile saline, followed by plating 100µL of 10⁻⁵, 10⁻⁶ and 10⁻⁷ dilutions in BHI agar plates for counting of isolates, respectively by the spread plate technique. The plates were incubated at 37 ° C for 48 h in aerobiose, colonies were counted. Subsequently, culture suspensions were prepared, diluted in 0.85% saline solution at the concentration of 10⁷ Colony Forming Units (CFU).

In vitro* culture of amebic trophozoites in association with *S. Typhimurium

E. histolytica strain EGGx and *E. dispar* MCR, ADO and VEJ strains were grown separately in Pavlova medium in a bottle and maintained in an incubator at 37 °C for a 48 hour period. During 48 hours in culture the growth of strains was monitored. Once growth was observed, some bottles of different amoebic strains were associated with *S. Typhimurium* bacteria at a concentration of 10⁶ UFC in 10 µl. This co-culture was maintained for a period of 24 hours in an incubator at 37°C and then the trophozoites were collected from the cultures associated or not with the bacterium *S. Typhimurium* [25]. The trophozoites were placed in a microtube containing eosin, functioning as a vitality marker, at a dilution 1:2 and then brought to a Neubauer chamber. To calculate the amoebae/ml we multiplied the number of counted trophozoites by the used dilution and by the correction factor 2500 [26].

RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from cultures of *E. dispar* and *E. histolytica* using the TRIzol Reagent (Invitrogen, USA), according with manufacturer's instructions, following treatment with Turbo DNase I (Ambion, USA). The quality and quantity of extracted RNA were evaluated on NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), considering the absorbance ratios of 280/260 and 260/230 nm. The cDNA synthesis was performed using 1 µg of RNA of each sample with High Capacity Kit (Life Technologies, USA) according to the manual.

RT qPCR Assay:

The real-time PCR was performed using Power SYBR Green PCR Master Mix 2X kit according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems, USA) and gene specific primers (**Table 1**). The housekeeping genes Actin and GAPDH were used for the normalizations. The approach was optimized by the primers' concentrations in function of the specificity and efficiency of amplification. The PCR reactions were performed in a final volume of 20 µL, using 10 µL SYBR Green Master Mix, 50 pmols cDNA (2µl) and primers at concentrations according with Table 1. The results are showed graphically in terms of the Relative Expression Level (REL), considering the Relative Quantification ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Cq}$) according with Hellemans *et. al*, (2007), using the means and standard deviations of the relative

level of mRNA for each virulence gene normalized against the reference gene expression level [27].

Table 1: Primers used in RNA differential display reactions.

Gene	Sequence of primers	Efficiency (%)	Annealing temperature	Amplicon Size	Concentration
Actin	F 5' AAGCTGCATCAAGCGTGAA3' R 5' ACCAAGGAATGATGGAGA3'	105.82	60°C	119bp	10 pmols
GAPDH	F 5' GGAAGTGTGAAGCTGGAGA3' R 5' CCCATCCAATTTGAGCTGG3'	109.67	60°C	92bp	20 pmols
Ap-A	F 5' TCACTGCTACTCACCAAGGA3' R 5' ACTTTATCAGCTCCCTTAGTGGT3'	108.68	60°C	97bp	15 pmols
CP-2	F 5' GTTTGTGCTGTTGGATATGGTGT3' R 5' CCTTTATCCCCATCCTGTTCC3'	112.75	60°C	86bp	15 pmols
CP-5	F 5' AGAGACCAAGCATCATGTGGA3' R 5' TCTTTGATCCAGCAACCAACA3'	96.45	60°C	93bp	10 pmols
Gal/GalNAc	F 5' ATGCGAAACTGCAACATGTGATC3' R 5' TGGTGTGATTGTGGGAATTCTTC3'	98.03	60°C	94bp	20 pmols

Subt Subtitles: bp- base pair. F- primer forward. R- primer reverse

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism® 6.0 software (GraphPad Software Inc.). The values obtained were evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test to see if there was a normal distribution of data. The mean, standard deviation and coefficient of variation for each set of data were obtained. Afterwards the Mann-Whitney test was performed because the data did not assume normal distribution. Results were expressed as interquartile range and the differences were considered significant when $\&p$ ($p \leq 0.05$). The n values correspond to the experiment done in triplicate.

Results

Effect of *in vitro* co-culture of *S. Typhimurium* with axenic and xenic strains of *E. histolytica* and *E. dispar* on the expression of amoebic virulence factors

The effects of the association of *S. Typhimurium* with the culture of trophozoites of *E. histolytica* and *E. dispar* on the relative level of gene expression (mRNA level) of amoebapore A (Ap-A), cysteine proteinase 2 (Cp-2), cysteine proteinase 5 (Cp-5) and the GAL/GALNAC lectin, were calculated using as a calibrator the expression values from the control group, which has the expression level defined as 1x. [34]. The analysis of the relative expression of these amoebic virulence factors was performed with EGG-x strain of *E. histolytica* and MCR, ADO and VEJ strains of *E. dispar*.

None of the experimental treatments had any effect on the relative expression of normalizing genes (*Actin* and *GAPDH*), since no significant differences were found ($p > 0.05$) in relative expression between the experimental groups. Therefore, the *Actin* and *GAPDH* genes were used safely for normalizing expression data of the amoebic virulence factors. The analysis relative quantitation of Ap-A gene expression in the culture of *E. histolytica* EGGx strain associated with *S. Typhimurium* (3,807) (2,413-5,987) showed a significant increase when compared to the EGG-x culture not associated with *S. Typhimurium* (0,8740) (0,639-1,706) ($p = 0,0317$) (Figure 1A). The same finding was observed in the *S. Typhimurium*-associated cultures of *E. dispar* MCR-ST (4,993) (3,546-7,159) and ADO-ST (1,919) (1,462-3,161) group as compared with their respective non-associated control group MCR (0,8238) (0,6130-1,941) ($p = 0,0079$) and ADO (1,000) (0,6997-1,443) ($p = 0,0317$) (Figures 1B, 1C).

Fig 1. This is the Fig 1 Title. This is the Fig 1 legend

In relation to gene expression of cysteine proteinases 2 and 5, different patterns were observed. While CP-2 relative quantitation of gene expression in most strains did

not change or even had a significant decrease (VEJ strain) when associated with *S. Typhimurium*, CP-5 amounts increased in MCR and VEJ strains after incubation with *S. Typhimurium*. Figures 2A-D show the results of CP-2 expression: *E. dispar* MCR-ST (2,175) (1,536-3,132) vs MCR (1,525) (0,3701-2,232), ADO-ST (2,291) (0,6639-3,783) vs ADO (1,182) (0,6834-1,519), and *E. histolytica* EGGx-ST (0,6008) (0,3607-1,816) vs (EGGx (1,072) (0,5425-1,860); *E. dispar* VEJ-ST (0,3890) (0,1269-0,5527) vs VEJ (1,064) (0,8375-1,158) ($p=0,0079$). Figures 3B and 3D show the results of CP-5 expression: MCR-ST (1,465) (1,358-1,721) vs MCR (1,025) (0,8177-1,217) ($p=0,0079$), and VEJ-ST (1,536) (1,293-2,540) vs VEJ (1,031) (0,7814-1,265) ($p=0,0317$).

Fig 2. This is the Fig 2 Title. This is the Fig 2 legend

Fig 3. This is the Fig 3 Title. This is the Fig 3 legend

The expression of Gal/GalNAC lectin gene showed an increase after association with *S. Typhimurium* for *E. dispar* strain ADO and VEJ. Group ADO-ST (2,408) (1,911-3,278) and VEJ-ST (13,94) (10,06-17,07) had significant higher values as compared to ADO (0,9979) (0,6777-1,481) ($p=0,0079$) and VEJ (1,113) (0,4542-2,530) ($p=0,0079$) controls (Figure 4C, 4D). The strains MCR and EGGx had not Gal/GalNAC lectin gene expression significant changes in presence or not of *S. Typhimurium*, with MCR-ST (0,4642) (0,3395-1,464) vs MCR (0,7045) (0,4770-2,536) and EGGx-ST (0,1570) (0,06675-0,7870) vs EGGx (0,9316) (0,6671 - 1,576) (Figure 4A, 4B).

Fig 4. This is the Fig 4 Title. This is the Fig 4 legend

Discussion

In order to determine whether the enteropathogenic bacteria contribute to the increased gene expression of amebic virulence factors, we evaluated the influence of the bacterium *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium on the virulence of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* trophozoites isolated from *in vitro* culture. The experimental model of this study allowed us to analyze and quantify gene expression by RT-qPCR of amebic virulence factors, the amoebapore A, cysteine

proteinase 2 and 5, and Gal/GalNAC lectin, produced by strains of *E. histolytica* and *E. dispar* *in vitro* associated with *S. Typhimurium*. The results were compared with the data obtained with strains of *E. histolytica* and *E. dispar*, which has not undergone interaction with the bacterium *S. Typhimurium*.

It is important to note that so far this is the only work that observed and quantified the modulation of gene expression of some of the major amebic virulence factors of *E. dispar* and *E. histolytica* after interaction with *S. Typhimurium*. Our experiments contribute to reinforce the virulence induction hypothesis in these species of amoebas after interaction with enteropathogenic bacteria [22-24].

One of the primary amebic virulence factors that becomes active after the adhesion of trophozoites with the host cells are amoebapores, which are primarily responsible for the cytotoxic effect caused to the host cells. In fact, trophozoites of *E. histolytica* belonging to HM1:IMSS strain submitted to the inhibition of Ap-A synthesis, presented *in vitro* a reduction in the ability to damage kidney cells of hamsters, stressing the importance of Ap-A as a virulence factor [28]. Our results showed that the interaction for a 18 hour period of EGGx, MCR and ADO strains with the *S. Typhimurium* induced an increase in gene expression of Ap-A, thus contributing to a possible intensification in aggression capacity of these amoebic strains. In fact, we recently observed in a previous study, that mice co-infected with *S. Typhimurium* and trophozoites from the MCR strain of *E. dispar*, had a bigger damage in the intestinal mucosa, leading to the emergence of destruction zones on cecal mucosa significantly superior and increased inflammatory response when compared to mice only infected with amebic trophozoites [29]. This means, among other virulence factors Ap-A was possibly involved in the development of these cecal lesions.

By analyzing the gene expression of CP-5 in *E. dispar* strains ADO and MCR, we found an interesting phenomenon. Unlike observed in our study, researchers observed the absence of gene expression of CP-5 when using other strains of *E. dispar*, as the mono-xenic SAW 760 maintained in culture with *Crithidia fasciculata* and xenic strains ERI1007 and the SAW 142 held in culture with the indigenous intestinal microbiota of which were isolated from patients [35,36]. In our analysis, the CP-5 besides being expressed in MCR, ADO and VEJ strains, has also showed an increase in gene expression in the culture associated with *S. Typhimurium* when compared to the non-associated culture. The CP-5 is an important virulence factor and its gene

expression, as well as its increased expression in the strains studied by us in association with *S. Typhimurium*, is associated with an increased amoebic pathogenicity. Regarding the relationship of the CP-5 expression with the ability of trophozoites to produce damage, such cysteine proteinase, has been blamed for being able to degrade a wide range of components such as elastin, fibrinogen, collagen, favoring a great destruction of a physical barrier, facilitating the movement and the invasion of trophozoites [37]. The increased expression of CP-5, in addition to increasing Ap-A and perhaps other virulence factors probably has been involved in the development of amoebic lesions caused by ADO strain in different studies [20, 23].

To date there are few studies detailing the CP-2 gene expression in *E. histolytica* and *E. dispar* and especially under the conditions that we studied. By comparing the gene expression of CP-2, it was observed a reduction in *E. dispar* strain VEJ when grown in association with *S. Typhimurium*. Unlike what happened with VEJ strain, it was not observed change of CP-2 expression in *E. dispar* strains MCR and ADO and *E. histolytica* strain EGGx when associated with *S. Typhimurium*. The divergence of results in our experiment, with respect to CP-2, could be because those strains are distinct with individual levels of virulence. As well as the Ap-A, CP-2 could also be involved in the pathogenesis of cecal lesions in mice inoculated with MCR strain [29]. The CPs contributes to the pathogenesis of amebiasis by facilitating the degradation of cell membrane and extracellular matrix components including fibronectin, collagen as well as immunoglobulins and complement system [30-32]. It has been described in the literature that CP-2 is present in both *E. histolytica* and *E. dispar* and is responsible for degradation of mucin MUC2 of the colonic mucus contributing to the development of damage to the host [33, 34].

The Gal/GalNAC lectin is another amoebic virulence factor that we investigated, being described as the most important virulence factors in both *in vitro* and *in vivo*, which is responsible for the adhesion of amebic trophozoites to host cells to begin its cytotoxic effects [38-40]. The association with *S. Typhimurium* was also capable of enhance gene expression of this virulence factor in *E. dispar* of the ADO e VEJ strains. Corroborating our results, researchers identified in their experiments that trophozoites belonging to HM1-IMSS strain of *E. histolytica*, after being grown and phagocytosed the following bacteria: commensal *E. coli* 086 H18, the pathogenic EPEC B171-0111: NM and the *Shigella dysenteriae*, exhibited *in vitro* increased adhesion of the

trophozoites to the Madin-Darby Canine Kidney cells (MDCK cells) due to the high levels of Gal/GalNAC lectin [24]. The authors also observed an intensification in damage in MDCK cells related to the increased activity of cysteine proteinases. Contrary to what was observed in the study above and confronting our results, when the same researchers analyzed the SAW 760 strain of *E. dispar* under the same conditions of co-culture, they did not observe adhesion and cell damage [24].

Our results showed that the co-culture of amebic trophozoites with the enteric bacterium *S. Typhimurium* for 18 hours is correlated with increased gene expression of amebic virulence factors in most of the strains of *E. histolytica* and *E. dispar*, probably inducing and/or enhancing the ability of these strains to produce tissue damage. Interestingly, ADO and MCR strains of *E. dispar* studied here have shown the ability to express CP-5. We believe that this important finding will help to elucidate the virulence mechanisms leading to the development of intestinal and liver damage produced by *E. dispar* in experimental models [20,21,23,41,42,43] as well as clinical cases that have been documented in humans [18,19].

Conclusion

Our experiments have identified that the amebic virulence factors that we have studied, amoebapore A, cysteine proteinases 25 and Gal/GalNAC lectin, exhibited in most cases an increased gene expression in *E. histolytica* and *E. dispar* strains associated *in vitro* with *S. Typhimurium*, indicating that such interaction leads to virulence in amebic trophozoites.

Important questions have been made regarding the pathogenesis of amebiasis due to the limitation of information about the influence of intestinal bacteria on the amoebae virulence and due to new clinical and molecular findings reporting and identifying the presence of *E. dispar* in individuals with amebic liver abscess or dysenteric and non-dysenteric amoebic colitis. Our study demonstrated the influence of bacteria in these mechanisms, as well as identified potential virulence factors that may be involved in both *E. histolytica* and in *E. dispar*. It is also important to highlight the gene expression of CP-5 that we observed in ADO and MCR strains of *E. dispar*, which has never been observed in other studies. This expression is another phenomenon that

may help to clarify all the experimental lesions we observed in animals inoculated with *E. dispar* strains[].

Acknowledgements

This work was financially supported by the Dean of Research of the Federal University of Minas Gerais (*Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais-PRPq/UFGM*), The Minas Gerais State Research Foundation (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG*), and the National Council for Research and Development (*Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento - CNPq*).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Legends

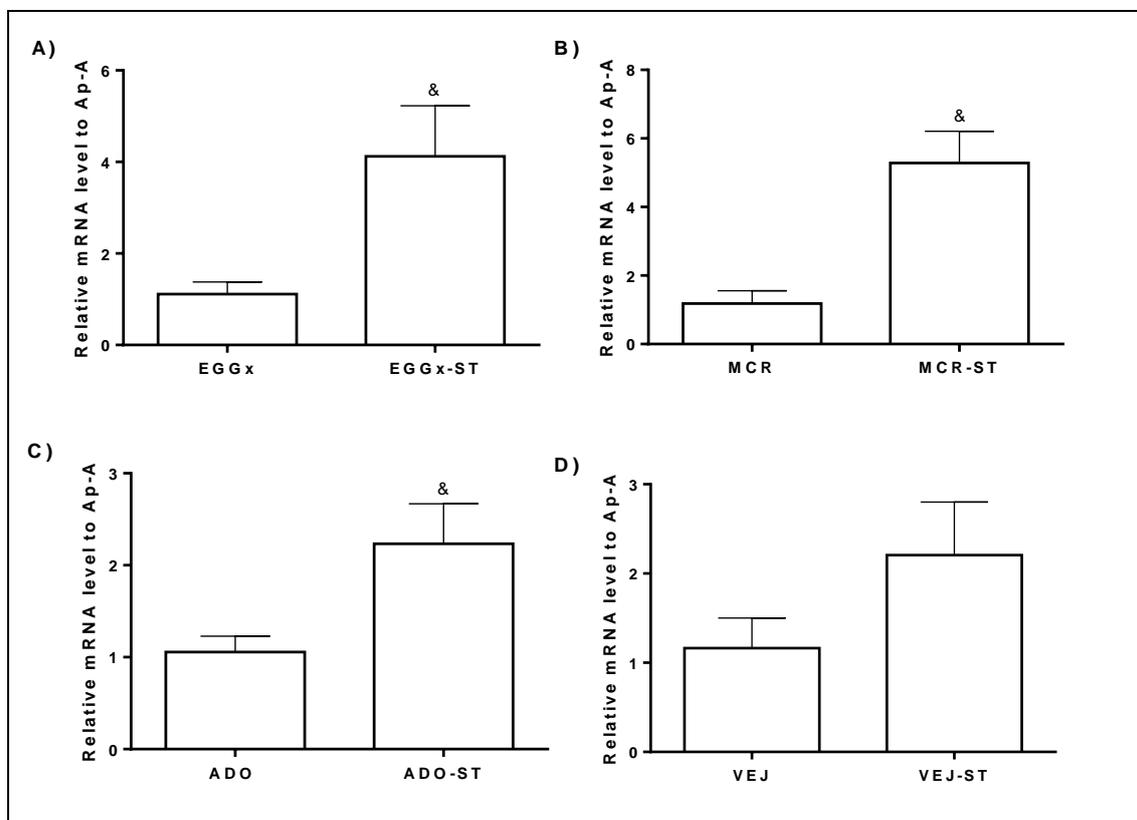


Figure 1: Evaluation of the effect of the association of *S. Typhimurium* on the in vitro culture of trophozoites of EGGx strains of *E. histolytica*, MCR, ADO and VEJ of *E. dispar* on the relative gene expression of amebaporo A (Ap-A). A) EGGx: *Entamoeba histolytica*, EGG strain xenic not associated to the *S. Typhimurium*. B) EGGx-ST: *Entamoeba histolytica*, EGG xenic strain associated to the *S. Typhimurium*; $p=0,0317$. MCR: *E. dispar*, MCR strain not associated *S. Typhimurium*. MCR-ST: *E. dispar*, MCR strain associated *S. Typhimurium*; $p=0,0079$. C) ADO: : *E. dispar* ADO strain not associated to the *S. Typhimurium*. ADO-ST: *E. dispar* ADO strain associated to the *S. Typhimurium*; $p=0,0317$. D) VEJ: *E. dispar*, VEJ strain not associated to the *S. Typhimurium*. VEJ-ST: *E. dispar*, VEJ strain associated to the *S. Typhimurium*. The Mann-Whitney test was used because they were non-parametric data. Data are shown as mean \pm SD, n = 5.

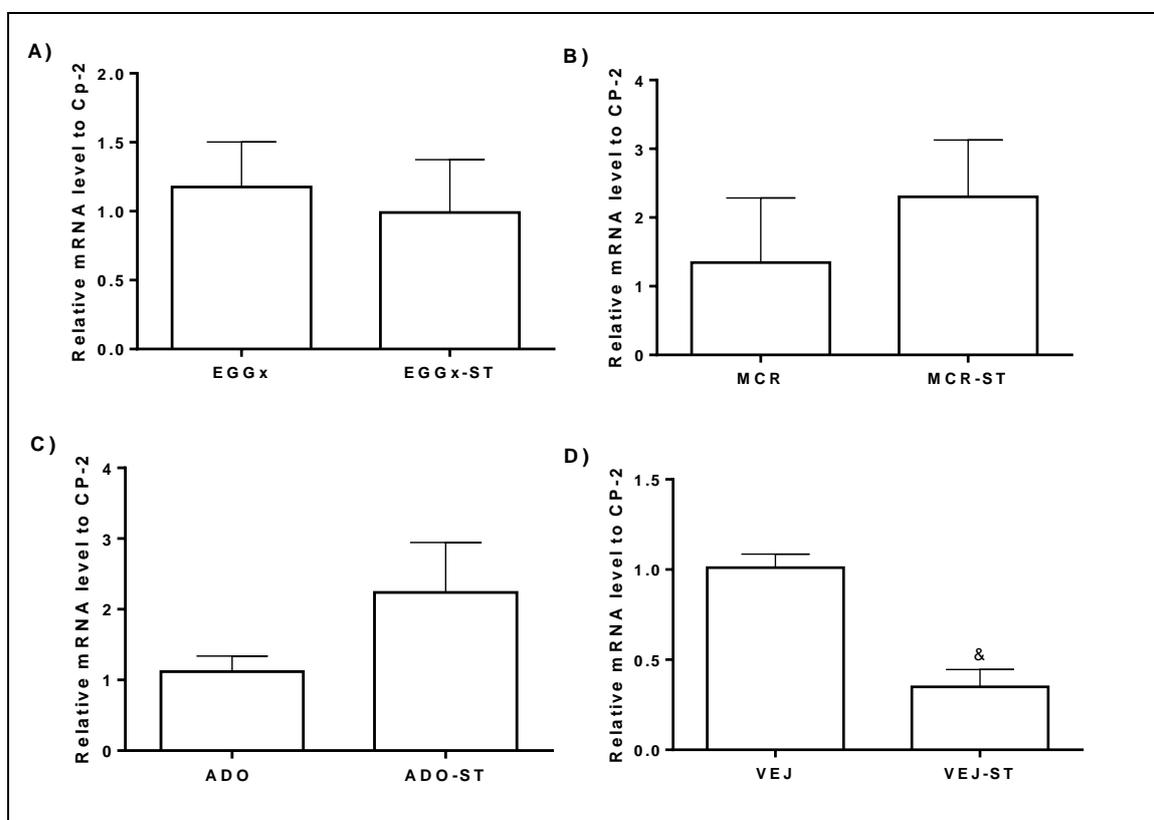


Figure 2: Evaluation of the effect of the association of *S. Typhimurium* on the in vitro culture of trophozoites of EGGx strains of *E. histolytica*, MCR, ADO and VEJ of *E. dispar* on the relative gene expression of Cysteine proteinase 2 (Cp-2). A) EGGx: *Entamoeba histolytica*, EGG strain xenic not associated to the *S. Typhimurium*. EGGx-ST: *Entamoeba histolytica*, EGG xenic strain associated to the *S. Typhimurium*. B) MCR: *E. dispar*, MCR strain not associated *S. Typhimurium*. MCR-ST: *E. dispar*, MCR strain associated *S. Typhimurium*. C) ADO: *E. dispar* ADO strain not associated to the *S. Typhimurium*. ADO-ST: *E. dispar* ADO strain associated to the *S. Typhimurium*. D) VEJ: *E. dispar*, VEJ strain not associated to the *S.*

Typhimurium. VEJ-ST: *E. dispar*, VEJ strain associated to the *S. Typhimurium*; $p=0.0079$. The Mann-Whitney test was used because they were non-parametric data. Data are shown as mean \pm SD, $n = 5$.

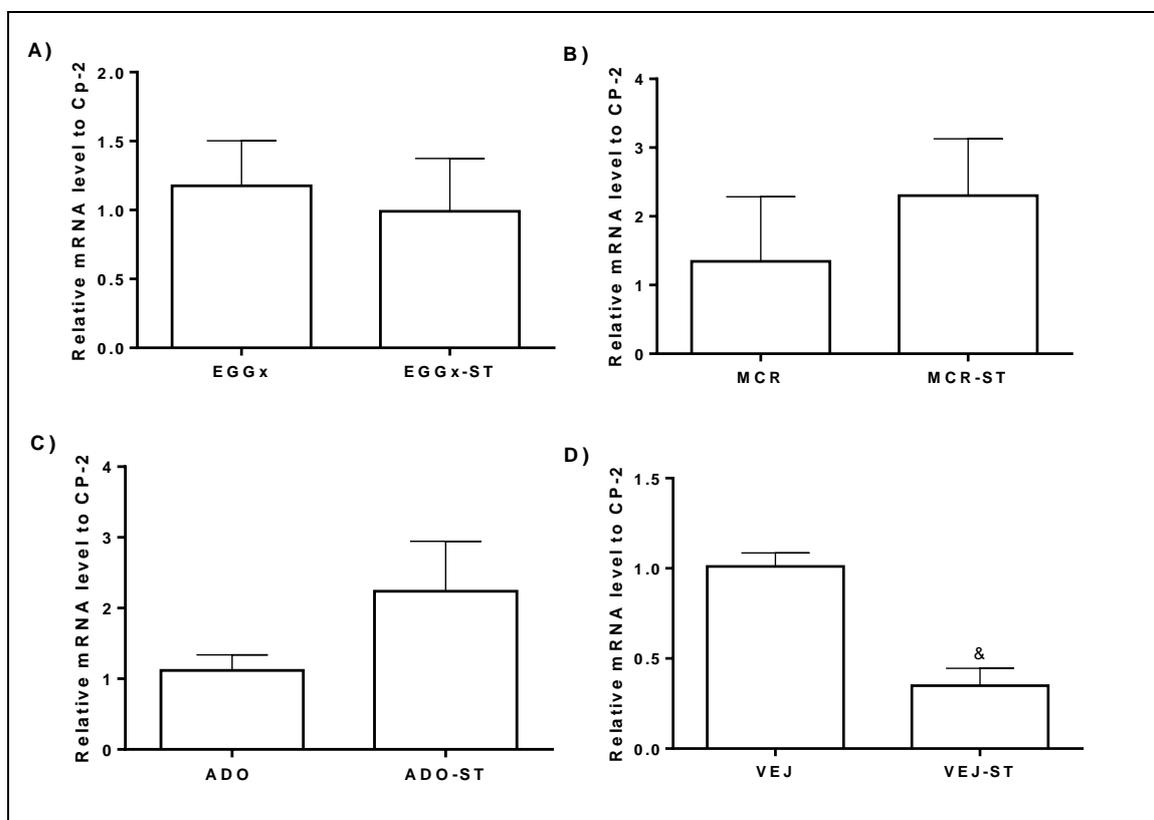


Figure 3: Evaluation of the effect of the association of *S. Typhimurium* on the in vitro culture of trophozoites of EGGx strains of *E. histolytica*, MCR, ADO and VEJ of *E. dispar* on the relative gene expression of Cysteine proteinase 5 (Cp-5).

A) EGGx: *Entamoeba histolytica*, EGG strain not associated to the *S. Typhimurium*. EGGx-ST: *Entamoeba histolytica*, EGG xenic strain associated to the *S. Typhimurium*. B) MCR: *E. dispar*, MCR strain not associated *S. Typhimurium*. MCR-ST: *E. dispar*, MCR strain associated *S. Typhimurium*; $p=0.0079$. C) ADO: *E. dispar* ADO strain not associated to the *S. Typhimurium*. ADO-ST: *E. dispar* ADO strain associated to the *S. Typhimurium*. D) VEJ: *E. dispar*, VEJ strain not associated to the *S. Typhimurium*. VEJ-ST: *E. dispar*, VEJ strain associated to the *S. Typhimurium*; $p=0.0317$. The Mann-Whitney test was used because they were non-parametric data. Data are shown as mean \pm SD, $n = 5$.

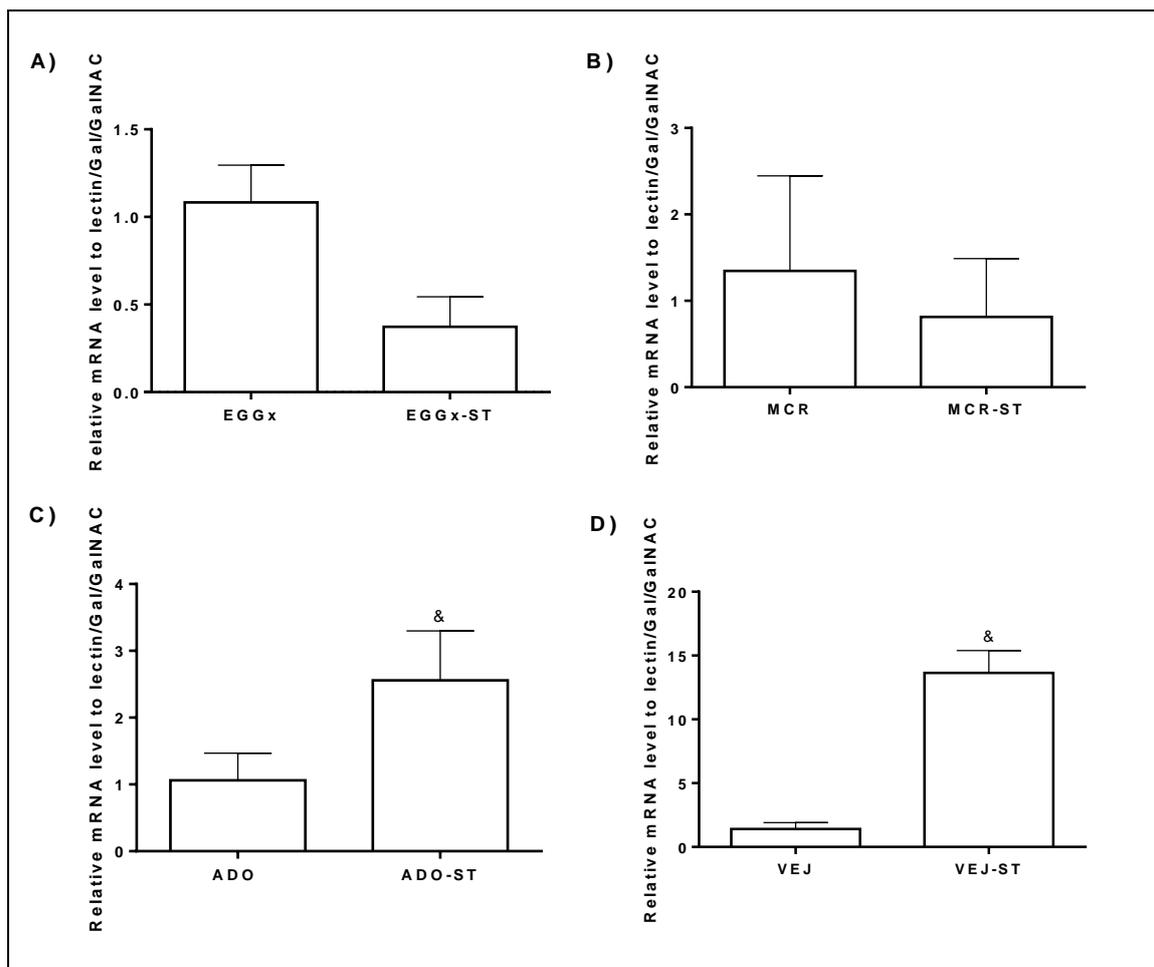


Figure 4: Evaluation of the effect of the association of *S. Typhimurium* on the in vitro culture of trophozoites of EGGx strains of *E. histolytica*, MCR, ADO and VEJ of *E. dispar* on the relative gene expression of Lectin galactose and N-acetyl galactosamine (Gal/GalNAC). A) EGGx: *Entamoeba histolytica*, EGG strain xenic not associated to the *S. Typhimurium*. EGGx-ST: *Entamoeba histolytica*, EGG xenic strain associated to the *S. Typhimurium*. B) MCR: *E. dispar*, MCR strain not associated *S. Typhimurium*. MCR-ST: *E. dispar*, MCR strain associated *S. Typhimurium*; &p=0,0079. C) ADO: *E. dispar* ADO strain not associated to the *S. Typhimurium*. ADO-ST: *E. dispar* ADO strain associated to the *S. Typhimurium* D) VEJ: *E. dispar*, VEJ strain not associated to the *S. Typhimurium*. VEJ-ST: *E. dispar*, VEJ strain associated to the *S. Typhimurium*; &p=0,0079. The Mann-Whitney test was used because they were non-parametric data. Data are shown as mean \pm SD, n = 5.

References

1. OMS (WHO). Report of a consultation of experts on Amoebiasis (México), Weekly Epidemiological Record, Geneva. 1997; 72: 97-100.
2. Stanley JR SL. Amoebiasis. The Lancet. 2003; 361: 1025-1034.
3. Brumpt E. Summary of studies *Entamoeba dispar* n. sp., amoeba cysts nucleus four, Human parasite. Bull. Acad. Méd. 1925; 94: 943-952.
4. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: from molecules to disease. Clin. Microbiol. 2000; 3: 318-331.
5. Petri JR WA.; Smith JR RD, Schlesinger PH, Murphy CF, Ravdin JI. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the in vitro adherence of *Entamoeba histolytica*. J. Clin. Invest. 80: 1238-1244, 1987.
6. Que X, Reed SL. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. Parasitol. Today. 1997; 13: 190-194.
7. Seydel KB, Li E, Zhang Z, Stanley JR SL. Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. Gastroenterology. 1998; 115: 1446-1453.
8. Leippe M, Sievertsen HJ, Tannich E, Horstmann RD. Spontaneous release of cysteine proteinases but not of pore-forming peptides by viable *Entamoeba histolytica*. Parasitology. 1995; 111: 569-574,
9. Ibarra JA, Steele-Mortimer O. *Salmonella* – the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cellular Microbiology. 2009; 11:1579-1586.

10. Salcedo SP, Noursadeghi M, Cohen J, Holden DW. Intracellular replication of *Salmonella typhimurium* strains in specific subsets of splenic macrophages *in vivo*. *Cell Microbiol.* 2001; 3: 587–597.
11. Gosh S, Frisardl M, Ramírez-Avila L, Descoteaux S, Sturm-Ramírez K, Newton-Sanchez OA, Santos-Preciado JI, Ganguly C, Lohia A, Reed S, Samuelson J. Molecular epidemiology of *Entamoeba spp.* Evidence of a bottleneck (demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 3815-3821.
12. Ramos F, García G, Valadez A, Morán P, González ZE, Gómez A, Melendro EI, Valenzuela O, Ximénez C. *E. dispar* strain: Analysis of polymorphism as a tool for study of geographic distribution. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2005; 141: 175-177.
13. Ali IK, Clark CG, Petri WAJR. Molecular epidemiology of amebiasis. *Infect. Genet. Evol.* 2008; 8: 698-707.
14. Valenzuela O, Morán P, Ramos, F, Cardoza JI, García G, Valadez A, Rojas L, Garibay A, González E, Ximénez C. Short report: Two different chitinase genotypes in a patient with an amebic liver abscess: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80: 51-54.
15. North MJ, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today.* 1990; 6: 270-5.
16. Leippe, M.; Amoebapores. *Parasitol. Today.* 1997; 13: 178-183.
17. Costa AO, Viana JC, Assis D, Rocha OA, Silva EF. Comparison of Xenic and Monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch Med Res.* 2000; 31: 247-248.

18. Graffeo R, Archibusacci CM, Soldini S, Romano L, Masucci L. *Entamoeba dispar*: A rare case of enteritis in a patient living in a non endemic area. *Case Rep Gastrointest Med.* 2014; 2014: 498058.
19. Ximénez C, Cerritos R, Rojas L, Dolabella S, Moran P, Shibayama M, González E, Valdez A, Hernández E, Valenzuela O, Limón A, Partida A, Silva E E. Human amebiasis: breaking the paradigm? *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2010; 7: 1105- 1120.
20. Costa OA, Gomes AM, Rocha AO, Silva FE. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. *Rev. Inst. Med. Trop.* 2006; 48: 245-250.
21. Costa CAX, Brito KN, Gomes MA, Caliarí MV. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite.* 2007; 14: 329-34.
22. Bhattacharya A, Ghildyal R, Prasad J, Bhattacharya S, Diamond SI. Modulation of a surface antigen of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. *Infect Immun.* 1992; 60: 270-5.
23. Shibayama M, Dolabella SS, Silva EF, Tsutsumi V. A Brazilian species of *Entamoeba dispar* (ADO) produces amebic liver abscess in hamsters. *Ann. Hepatol.* 2007; 6: 117-118.
24. Galván-Moroyoqui JM, Domínguez-Robles MC, Franco E, Meza I. The interplay between *Entamoeba* and Enteropathogenic Bacteria Modulates Epithelial Cell Damage. *PloS Negl Trop Dis.* 2008; 2: 1-12.
25. Gomes MA, Martins MS, Costa AO, Silva EF. Influence of Bacteria Upon Cytopathic Effect And Erythrophagocytosis of Different Axenic Strains of

- Entamoeba Histolytica*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo , Brasil.1995; 37: 197-200.
26. Seydel KB, Zhang T, Stanley JR SL. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscess in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 1997; 65: 3951-3953.
 27. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 2007; 8(2), R19.
 28. Bracha R, Nuchamowitz Y, Leippe M, Mirelman D. Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.* 1999; 34: 463-472.
 29. Oliveira FMS, Neumann E, Gomes MA, Caliarí MV. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. *Trop Parasitol.* 2015; 5: 9-14.
 30. Keene WE, Hidalgo ME, Orozco E, Mckerrow JH. *Entamoeba histolytica*: Correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. *Exp. Parasitol.* 1990; 71: 199-206.
 31. Schulte W, Scholze H. Action of the major protease from *Entamoeba histolytica* on proteins of the extracellular matrix. *J. Protozool.* 1989; 36: 2772-2777.
 32. Tran VQ, Herdman DS, Torian BE, Reed SL. The neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades IgG and prevents its binding. *J. Infect. Dis.* 1998; 177: 508-511.
 33. Bruchhaus I, Loftus BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during *in vitro* cultivation. *Eukaryotic Cell.* 2003; 2: 501–509.

34. Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine protease cleave the MUC2 in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proc. Natl. Acad. Sci Usa. 2006; 103: 9298-9303.
35. Bruchhaus I, Jacobs T, Leippe M, Tannich E. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* differences in numbers and expression of cysteine proteinase genes. Mol Microbiol. 1996; 22: 255-263.
36. Willhoeft U, Hamann L, Tannich E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. Infect Immun. 1999; 67: 5925-5929.
37. Freitas MAR, Fernandes HC, Calixto VC *et al.* “*Entamoeba histolytica*: cysteine proteinase activity and virulence. Focus on cysteine proteinase 5 expression levels. Experimental Parasitology. 2009; 122: 306-309.
38. López-Vancell R, Montfort I, Pérez-Tamayo R. Galactose-specific adhesin and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res. 2000; 86: 226-231.
39. Blazquez S, Rogothier MC, Huerre M, Guillen N. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. Int. J. Parasitol. 2007; 37: 425-433.
40. Vines RR, Ramakrishnan G, Rogers JB, Lockhart L A, Man B J, Petri Jr WA. Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a beta 2 integrin motif. Mol. Biol. Cell. 1998; 9: 2069-2079.
41. Costa CAX Brito KNO, Gomes MA, Caliarí MV. Histopathological and immunohistochemical study of the hepatic lesions experimentally induced by *Entamoeba dispar*. Eur J Histochem. 2010a; 54: 170-174.

42. Costa CAX, Nunes AC, Ferreira AJ, Gomes MA, Caliari MV. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: *in vivo* binding of antibodies and complement. *Parasit Vectors*. 2010b; 3: 1-10.
43. Costa CAX, Fonseca THS, Oliveira FMS, Santos JFG, Gomes MA, Caliari MV. Influence of inflammation on parasitism and area of experimental amoebic liver abscess: immunohistochemical and morphometric study. *Parasites & Vectors*. 2011; 4: 1-7.

← ↶ → 📁 Arquivar 📁 Mover ▾ 🗑️ Apagar 🛡️ Spam ▾ ⋮ Mais ▾



• PLOS ONE: Notification of co-authorship on manuscript - [EMID:96e5f1b93864e63f]

• **PLOS ONE** <em@editorialmanager.com>

Hoje em 0:48 ★

Para: Fabrício Marcus Silva Oliveira Oliveira

PONE-D-16-47664

The in vitro association of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* increase the gene expression of amebic virulence factors.

Prof. Marcelo Vidigal Caliar

Dear MSc Fabrício Marcus Oliveira,

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to PLOS ONE and entitled "The in vitro association of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* increase the gene expression of amebic virulence factors."

The corresponding author for the submission process is: Prof. Marcelo Vidigal Caliar

The full author list for the submission is: Marcelo Vidigal Caliar; Fabrício Marcus Silva Oliveira Oliveira; Sávio Henrique de Cicco Sandes; Luana Oliveira Prata; Mario Abatemarco Junior; Ana Cláudia de Carvalho Fernandes; Elisabeth Neumann; Álvaro Cantini Nunes; Maria Aparecida Gomes; Marcelo Vidigal Caliar

If you are not aware of this submission, or if you should not be listed as a co-author, then please contact the journal office at plosone@plos.org.

Kind regards,

9.3 Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

C E T E A

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 224/2012**, relativo ao projeto intitulado "*Influência das bactérias Escherichia coli enteropatogênica e Salmonella Typhimurium sobre a virulência da Entamoeba histolytica e da Entamoeba dispar na colite amebiana experimental: análise da expressão de genes amebianos e estudo patológico*", que tem como responsável(is) **Marcelo Vidigal Caliari**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)*, tendo sido aprovado na reunião de **19/ 09/2012**.

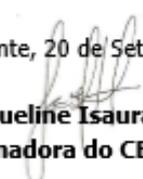
Este certificado expira-se em **19/ 09/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 224/2012**, related to the project entitled "*Influence of the bacteria Escherichia coli enteropathogenic and Salmonella Typhimurium on the virulence of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in the amebian experimental colitis: analysis of amebian gene expression and pathological study*", under the supervisors of **Marcelo Vidigal Caliari**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **September 19, 2012**.

This certificate expires in **September 19, 2017**.

Belo Horizonte, 20 de Setembro de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.4 Ata da Defesa de Tese



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO FABRÍCIO MARCUS SILVA OLIVEIRA

Realizou-se, no dia 13 de dezembro de 2016, às 09:00 horas, C3-241 Depto de Patologia Geral ICB-UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *INFLUÊNCIA DA SALMONELLA ENTERICA SOROVAR TYPHIMURIUM SOBRE A VIRULÊNCIA DA ENTAMOEBA DISPAR E DA ENTAMOEBA HISTOLYTICA IN VITRO E NA COLITE AMEBIANA EXPERIMENTAL.*, apresentada por FABRÍCIO MARCUS SILVA OLIVEIRA, número de registro 2012772239, graduado no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari - Orientador (UFMG), Prof(a). Maria Aparecida Gomes (UFMG), Prof(a). Marta de Lana (UFOP), Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu (UFOP), Prof(a). Adriana Oliveira Costa (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Wanderson Geraldo de Lima (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

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

Belo Horizonte, 13 de dezembro de 2016.


Prof(a). Marcelo Vidigal Caliari (Orientador-Presidente-Doutor-UFMG)


Prof(a). Maria Aparecida Gomes (Co-orientadora-Doutora-UFMG)


Prof(a). Marta de Lana (Doutora-UFOP)


Prof(a). Sílvia Dantas Cangussu (Doutora-UFOP)


Prof(a). Adriana Oliveira Costa (Doutora-UFMG)


Prof. Wanderson Geraldo de Lima (Doutor-UFOP)