

Fabício Marcus Silva Oliveira

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E DAS LESÕES INTESTINAIS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 WT E C57BL/6 CD1^{-/-} NA FASE AGUDA DA
INFECÇÃO AMEBIANA INOCULADOS COM *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA***

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2011

Fabrcio Marcus Silva Oliveira

**ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E DAS LESÕES INTESTINAIS EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 WT E C57BL/6 CD1^{-/-} NA FASE AGUDA DA
INFECÇÃO AMEBIANA INOCULADOS COM *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA***

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

Área de Concentração: Patologia Geral

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

2011

Oliveira, Fabrício Marcus Silva
Análise da resposta imunológica e das lesões intestinais em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-} na fase aguda da infecção amebiana inoculados com *Entamoeba histolytica*. [manuscrito] / Fabrício Marcus Silva Oliveira. – 2011
106 f. : ; 29,5 cm.

Orientador: Marcelo Vidigal Caliar. Co-orientadora: Maria Aparecida Gomes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Amebíase - Teses. 2. Entamoeba histolytica – Teses. 3. Patologia geral - Teses. 4. Disenteria amebiana. I. Caliar, Marcelo Vidigal. II. Gomes, Maria Aparecida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Medicina. IV. Título.

CDU: 616.993.12



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Batena 190/sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30130-100
Fone: (31) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
ppp@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, composta pelos professores doutores: Marcelo Vidigal Caliari, Maria Aparecida Gomes, Sérgio Costa Oliveira e Tatiane Alves da Paixão - UFMG, aprovou a defesa da dissertação intitulada: **"ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E DAS LESÕES INTESTINAIS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 WT E C57BL/6 CD1-/- INOCULADOS COM ENTAMOEBA HISTOLYTICA"**, apresentada pelo mestrando : **FABRÍCIO MARCUS SILVA OLIVEIRA**, para obtenção do título de Mestre em Patologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia - Área de Concentração em Patologia Geral, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 25 de fevereiro de 2011.

Prof. Marcelo Vidigal Caliari
Orientador

Profa. Maria Aparecida Gomes
Coorientadora

Prof. Sérgio Costa Oliveira

Profa. Tatiane Alves da Paixão

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e executado nos seguintes Laboratórios do ICB/UFMG:

- Laboratório de Amebíase/Departamento de Parasitologia.
- Laboratório de Imunobiologia/Departamento de Bioquímica e Imunologia.
- Laboratório de Protozooses/Departamento de Patologia Geral.
- Laboratório de Técnicas Histológicas/Departamento de Patologia Geral.

Agradecimentos

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

Ao Prof. Marcelo Vidigal Caliari, pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

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

A Prof^a. Ana Maria Caetano de Faria e seus orientandos Bernardo, Andrezza e Andréa, pela bondosa colaboração.

Ao Prof. Ricardo Tostes Gazzinelli pela doação dos camundongos C57BL/6 CD1^{-/-}.

A Luana e Cássia 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.

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.

A Gislene, pela sua contribuição nos experimentos e manejo dos animais.

As funcionárias da secretaria do departamento de Patologia.

Aos amigos da pós-graduação.

A Fapemig pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!!!

Aqueles que jamais irão me abandonar.
Deus, meus pais e familiares queridos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1 Patogênese.....	5
1.2 Mecanismos de escape e imunidade.....	7
1.3 Linfócitos NK T.....	9
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVO GERAL.....	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1 Animais utilizados.....	15
4.2 Cepa de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
4.3 Preparo do inóculo.....	16
4.4 Inoculação intracecal.....	17
4.5 Necropsia e histopatologia.....	17
4.6 Preparação de suspensões celulares.....	18
4.6.1 Meio de cultura.....	18
4.6.2 Preparação de suspensões celulares do baço e linfonodo cecal.....	18
4.7 Contagem das células viáveis.....	18
4.8 Análise fenotípica de linfócitos por citometria de fluxo.....	19
4.9 Análise quantitativa das lesões intestinais (erosões e úlceras).....	19
4.10 Reação imuno-histoquímica e análise quantitativa dos trofozoítos.....	20
4.11 Reação imuno-histoquímica e análise quantitativa dos linfócitos NK1.1 ⁺	21
4.12 Reação imuno-histoquímica para detecção de mucina MUC-2.....	21
4.13 Análise quantitativa da área de mucosa cecal, muco e da mucina MUC-2.....	22
4.14 Análise estatística.....	23
5.RESULTADOS.....	24
5.1 Análise por citometria de fluxo da frequência de linfócitos NK T, LTCD4 ⁺ , LTCD8 ⁺ e LB do baço e linfonodo cecal.....	24
5.2 Análise macroscópica, histopatológica e quantitativa das lesões cecais.....	31
5.3 Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos trofozoítos.....	33
5.4 Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos linfócitos NK1.1 ⁺	34
5.5 Análise qualitativa e quantitativa da mucosa cecal, de muco e da mucina MUC-2.....	35
5.6 Análise de correlação entre a área MUC-2 ⁺ e a extensão de Necrose.....	39
5.7 Análise de correlação entre a área MUC-2 ⁺ e o número de linfócitos NK1.1 ⁺	39
5.8 Análise de correlação entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK1.1 ⁺	40

6. DISCUSSÃO.....	42
7. CONCLUSÃO.....	49
8. ABSTRACT.....	50
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
10. ANEXOS.....	66
10.1 Figuras.....	66
10.2 Documento de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG.....	77
10.3 Artigo Submetido.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ceco de Camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	67
Figura 2: Fotomicrografia de ceco de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	69
Figura 3: Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de <i>Entamoeba histolytica</i>	71
Figura 4: Reação imuno-histoquímica para linfócitos NK T.....	73
Figura 5: Reação imuno-histoquímica para a mucina MUC-2.....	75

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Frequência de linfócitos NK T CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ do linfonodo cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	24
Gráfico 2: Frequência de linfócitos NK T CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	25
Gráfico 3: Frequência de linfócitos TCD4 ⁺ CD69 ⁺ do linfonodo cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	26
Gráfico 4: Frequência de linfócitos TCD4 ⁺ CD69 ⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	27
Gráfico 5: Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ do linfonodo cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	28
Gráfico 6: Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytic</i>	29
Gráfico 7: Frequência de linfócitos T CD19 ⁺ CD69 ⁺ do linfonodo cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} , controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	30
Gráfico 8: Frequência de linfócitos T CD19 ⁺ CD69 ⁺ retiradas do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	31
Gráfico 9: Extensão de mucosa necrosada em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} inoculados com <i>Entamoeba histolytica</i>	33
Gráfico 10: Número de trofozoítos no ceco de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} inoculados com <i>Entamoeba histolytica</i>	34

Gráfico 11: Número de linfócitos NK T no ceco de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles e infectados com <i>Entamoeba histolytica</i>	35
Gráfico 12: Área de mucosa cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles.....	37
Gráfico 13: Área de muco na mucosa cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles.....	37
Gráfico 14: Expressão de MUC-2 na mucosa cecal de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1 ^{-/-} controles.....	38
Gráfico 15: Correlação entre a área MUC-2 ⁺ e a extensão da necrose.....	39
Gráfico 16: Correlação entre a área MUC-2 ⁺ e número de linfócitos NK T.....	40
Gráfico 17: Correlação entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK T.....	41

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

- AHA - Abscesso hepático amebiano
- Ag's - Antígenos
- APC's - Células apresentadoras de antígenos
- CP's - Cisteína proteinases
- CC - Quimiocina
- CCL3 - Quimiocinas ligante 3
- CCL2 - Quimiocinas ligante 2
- CCL5 - Quimiocinas ligante 5
- DNA - cido desoxirribonucléico
- E. histolytica* – *Entamoeba histolytica*
- EhLPPG - Lipopeptidofosfoglicano de *E. histolytica*
- FACS - Citometria de fluxo
- GAL/GALNAC - Lectina específica para resíduos de galactose e N-acetil galactosamina
- GRO- α - Oncogene relacionado ao crescimento
- GMCSF - Fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos
- GPI - Glicosilfosdfatidilinositol
- H&E - Hematoxilina e Eosina
- Ig A - Imunoglobulina A
- Ig G - Imunoglobulina G
- IFN- γ - Interferon gama
- IL 2 - Interleucina 2
- IL 4 - Interleucina 4
- IL 6 - Interleucina 6
- IL 8 - Interleucina 8
- IL 10 - Interleucina 10
- IL 13 - Interleucina 13
- i*NK T - Linfócitos NK T invariantes
- LPPG - Lipopeptidofosfoglicano
- LC - Linfonodo cecal
- MEC - Matriz extracelular

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MUC-2 - Mucina 2

(*m*)NK T - Linfócitos NK T da mucosa

NO - Óxido Nítrico

NK T - Linfócitos NK T

NK - Natural *killer*

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPAS - Organização Pan- americana da Saúde

PAS - Ácido Periódico de Schiff

UNESCO - Organização das Nações Unidas para Educação, Ciência e Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

Pré IL18 - Pré interleucina 18

mRNA - Ácido Ribonucléico Mensageiro

TCR - Receptor de Células T

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

Th1 - T *helper* tipo 1

Th2 - T *helper* tipo 2

(*v*)NK T - Linfócitos NK T variantes

RESUMO

A *Entamoeba histolytica* é o protozoário causador da amebíase, doença que produz cerca de 50 milhões de casos e 100 mil óbitos por ano em todo o mundo. Estudo recente demonstrou que os linfócitos Natural Killer T (NK T) constituem barreira importante contra o desenvolvimento do abscesso hepático amebiano em suas fases iniciais. A atuação dos linfócitos na proteção de infecções invasivas é ainda um assunto controverso devendo ser melhor investigado. Neste contexto, os linfócitos NK T são especialmente atrativos devido a escassez e relevância de estudos na área. Portanto, objetivo do presente estudo foi avaliar a infecção, lesões e imunidade induzida pela *E. histolytica* em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}. Camundongos C57BL/6 *wild-type* e camundongos CD1^{-/-} foram inoculados intracecalmente com a *E. histolytica*, sacrificados após 48 horas de infecção para a coleta de baço, linfonodo mesentérico (LnM) e ceco. Suspensões celulares do baço e do LnM foram utilizados para análise por citometria de fluxo dos linfócitos NK T, LTCD4⁺, LTCD8⁺ e L B. O ceco foi utilizado para a análise quantitativa das lesões e, dos trofozoítos, linfócitos NK T e MUC-2 através de reações imuno-histoquímicas. A análise quantitativa da frequência de linfócitos NK T do LnM demonstrou redução significativa nos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} quando comparados com os grupos Eh-WT e CTRL-WT. Também foi verificada redução significativa da frequência de linfócitos CD19⁺ CD69⁺ e T CD8⁺ CD69⁺ no LnM dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}, em comparação aos grupos CTRL-WT e Eh-WT. Foi observado aumento significativo na frequência de linfócitos B do LC do grupo Eh-WT em comparação ao grupo CTRL-WT e, a sua redução no baço dos animais do grupo Eh-WT quando comparada com os grupos CTRL-CD1^{-/-}, Eh-CD1^{-/-} e CTRL-WT. A extensão de mucosa necrosada, bem como o número de trofozoítos, foi maior nos camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-} em relação ao grupo Eh-WT. A análise quantitativa mostrou que os linfócitos NK T foram significativamente menos frequentes nos camundongos dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}. Também foi observado aumento significativo no número de linfócitos NK T nos animais do grupo Eh-WT em relação a todos os outros grupos de animais. A área de mucosa do grupo CTRL-WT foi maior do que a observada no grupo CTRL-CD1^{-/-}. Nos animais de ambos os grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1 foi verificada redução significativa da área de marcação para MUC-2 em relação aos grupos CTRL-WT Eh-WT. Já no grupo Eh-WT, a área positiva de MUC-2 foi significativamente superior a observada nos camundongos do grupo CTRL-WT. Nossos resultados mostraram que os linfócitos NK T são eficazes na resistência contra os trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e que a sua deficiência favorece o surgimento de colite experimental amebiana grave. Além disso, a mucosa cecal mais delgada e com menor produção de MUC-2 em camundongos CD1^{-/-} favorece a infecção amebiana e o surgimento de lesões intestinais. Os linfócitos NK T estão relacionados com a produção de MUC-2 e a ação conjunta destes dois mecanismos da imunidade inata atuam na resistência contra a infecção amebiana em suas fases iniciais.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A *Entamoeba histolytica* (*E. histolytica*) é uma das sete parasitas do gênero *Entamoeba* capazes de infectar seres humanos. Ao contrário da *E. polecki* e da *E. histolytica*, a *Entamoeba 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). A *E. dispar* foi primeiramente descrita por Brumpt em 1925, na tentativa de explicar a alta percentagem de infectados assintomáticos, que correspondiam à cerca de 90% dos indivíduos infectados no mundo (Brumpt, 1925).

A *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 intestino humano e a segunda maior causa de morte entre as doenças parasitárias, superada apenas pela malária (Stanley, 2003).

A *E. histolytica* causa duas grandes síndromes clínicas, a colite amebiana e abscesso hepático amebiano (Hira *et al*, 2001; Stanley; Reed, 2001). Esta parasitose apresenta ampla distribuição geográfica com alta prevalência em regiões tropicais, onde as condições de higiene e educação sanitária são consideradas deficientes. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) e a Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO), a amebíase apresenta uma distribuição mundial, com exceção da América Central e Oceania (OMS, 1997). Estima-se que 10% da população mundial está infectada pelo parasita, e que apenas 1% dos indivíduos desenvolvem a forma invasiva da doença (Walsh, 1986).

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 severas 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).

Para diferenciar a infecção por *E. histolytica* ou *E. dispar* em amostras de fezes, têm sido utilizadas a pesquisa de antígeno do parasito (Haque *et al*, 1995, 1998, 2002) e a amplificação de sequências de ácido desoxirribonucléico (DNA) (Ali *et al*, 2003; Qvarnstrom *et al*, 2005; Roy *et al*, 2005; Khairnar; Parija, 2007). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica sensível utilizada para a caracterização da espécie da *Entamoeba* responsável pela infecção. Devido ao alto custo, tais metodologias ainda não estão disponíveis para uso regular de diagnóstico, porém têm auxiliado em estudos epidemiológicos que resultam no conhecimento da prevalência da amebíase (Silva *et al*, 2005). Os levantamentos epidemiológicos têm mostrado que a maioria dos indivíduos assintomáticos infectados são colonizados com *E. dispar*. 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).

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 parasita, 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).

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. Após 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* hospedam 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 em indivíduos imunossuprimidos, em particular naqueles com infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). De fato, algumas infecções por HIV têm sido detectadas durante admissão do paciente apresentando abscesso hepático amebiano (Kershenovich; Corona, 2008; Moran *et al*, 2005).

A maioria das infecções intestinais são assintomáticas, resultando em encistamento e excreção de cistos (Haque *et al*, 2002).

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 (OMS 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 severa, 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 severas 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 abscesso hepático amebiano (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 classificados como modelos 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 (Diamond *et al*, 1978).

1.1 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) através da ação de proteases amebianas e fagocitose (Tavares *et al*, 2005). Em torno dos parasitos, as células do hospedeiro mostram vários estágios de degeneração. 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) e as amebaporos (Espinosa-Cantellano; Martínez-Palomo, 2000). Através destas moléculas, a *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 IL10 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 (NK), também capazes de formar poros na

membrana celular (Leippe, 1995). Trofozoítos de *E. histolytica* deficientes da amebaporo isoforma 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 necrose da parede intestinal. A capacidade dos trofozoítos em destruir leucócitos “*in vitro*” e a escassez de células inflamatórias nas proximidades das lesões amebianas sugere que a maioria dos leucócitos é destruída pelo parasito, promovendo a liberação de produtos tóxicos e a ampliação da zona de necrose (Seydel *et al*, 1998).

1.2 Mecanismos de escape e imunidade

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 IL18) (Reed *et al*, 1995).

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 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. 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).

A mucosa do ceco e colón consiste de glândulas ou criptas tubulares, formada principalmente por enterócitos e células caliciformes, responsáveis pela produção de muco, que é a primeira barreira contra a adesão e invasão de parasitos, constituído por mucinas altamente glicosiladas. 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).

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 nestes camundongos (Velasquez *et al*, 1998; Pérez-Tamayo *et al*, 2006).

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 a 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).

1.3 Linfócitos NK T

Estudo recente demonstrou que os linfócitos Natural Killer T (NK T) constituem barreira importante contra o desenvolvimento do abscesso hepático amebiano em suas fases iniciais (Lotter *et al*, 2009). Tais autores verificaram que camundongos duplamente negativos para CD1 (CD1d^{-/-}) desenvolveram abscessos hepáticos maiores devido à inibição da apresentação de antígenos derivados do lipopeptidofosfoliglicano amebiano para os linfócitos NK T. Da mesma maneira, a redução da população de linfócitos NK T ativados em camundongos deficientes em CD1d provocou aumento da susceptibilidade à infecção pelo *Toxoplasma gondii* (Smiley *et al*, 2005).

Os linfócitos NK T são capazes de reconhecer antígenos (Ag's) glicolipídicos através da molécula CD1. Em seres humanos, o locus CD1 contém uma família de cinco genes que expressa cinco isotipos de moléculas

CD1: CD1 a, b, c, e, que é chamado de grupo I (CD1.1). Já o grupo II (CD1.2), é constituído pela molécula CD1d, que é encontrada em roedores e humanos, sendo expressa por leucócitos e potenciais APC's (Beckman *et al*, 1994, 1996; Sieling *et al*, 1995; Brossay *et al*, 1997; Brigl; Brenner, 2004). Os polipeptídios CD1 são estruturalmente semelhantes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, pois formam heterodímeros com a molécula β 2-microglobulina (Brossay *et al*, 1997)

Expressão significativa de mRNA para CD1 em camundongos foi observada no timo e no fígado e, em menor grau, no baço, pulmão e intestino (Bleicher *et al*, 1990; Bradbury *et al*, 1990; Lacasse; Martin, 1992). Também foi demonstrada a expressão de CD1 em timócitos corticais e em linfócitos B esplênicos de camundongos através da citometria de fluxo (FACS) (Bendelac, 1995).

Em ratos, a expressão de mRNA para CD1d foi encontrada no baço, timo, fígado, coração, rim e pulmão e, em humanos, CD1d foi observado em células do epitélio intestinal (Ichimiya *et al*, 1994; Blumberg, *et al*, 1991).

Não é ainda bem determinada a expressão de CD1 por importantes tipos celulares como as células dendríticas, macrófagos e subpopulações de células B nos centros germinativos, bem como as citocinas e os mecanismos que regulam a sua expressão (Bradbury *et al*, 1990).

Enquanto as células que expressam moléculas MHC classe I e MHC classe II podem apresentar peptídeos antigênicos para linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente, a molécula CD1d é capaz de apresentar antígenos glicolipídicos para os linfócitos NK T (Bendelac *et al*, 1995; Van Rijn *et al*, 2004). Assim, células restritas a CD1d poderiam responder à infecção pelo reconhecimento de lípidos e carboidratos antigênicos de diferentes patógenos (Schofield *et al*, 1999; Amprey *et al*, 2004).

Os linfócitos NK T são um subconjunto de linfócitos T encontrados no homem, camundongos e outros mamíferos, que expressam receptores de células NK, especialmente NK1.1 (NKR-P1C) em certas linhagens de camundongos e, CD161 (NKR-P1A) em seres humanos, variáveis de acordo com sua maturidade e estado de ativação. Além destes receptores da imunidade inata, os linfócitos NK T também expressam o receptor de antígeno de células T (TCR). Este subconjunto de linfócitos parece relacionar-se com

ambos os tipos de respostas imunes, Th1 ou Th2, devido a sua capacidade de iniciar a produção de grandes quantidades de IFN- γ e IL 4 (MacDonald 1995; Beldelac *et al*, 1997; Lotter *et al*, 2009). Os linfócitos NK T podem se diferenciar em células citotóxicas e têm sido descrito seu envolvimento em respostas imunes de doenças infecciosas, câncer, alergias e auto-imunidade (Tupin *et al*, 2007).

Diante do acúmulo de informações acerca dos linfócitos NK T, tais células foram subdivididas em populações de acordo com a cadeia- α do TCR, a molécula apresentadora de antígeno e a co-expressão de diferentes moléculas de superfície (Tupin *et al*, 2007; Kronenberg, 2007). As duas primeiras populações de linfócitos NK T possuem um TCR “*canonical*” (invariante) e o reconhecimento do antígeno ocorre especificamente pela molécula CD1d. Os termos “*canonical*” e “invariável” foram usados como sinônimos, para designar linfócitos invariantes (*i*)NK T V α 14 *i*(V α 14*i*) de camundongos, e seus homólogos em humanos que expressam o TCR V α 24*i*. Uma segunda população que expressa o TCR V α 7.2*i* em camundongos e um homólogo V α 19*i* em seres humanos, foi denominada de linfócito NK T da mucosa (*m*)NK T. Um terceiro grupo, denominado de (*v*)NK T variantes, engloba linfócitos NK T que não têm um TCR restrito ao reconhecimento de antígeno pela molécula CD1d. O quarto grupo é mais heterogêneo porque combina todos os outros linfócitos T que expressam receptores NK. Este grupo foi chamado de linfócitos *x*NK T ou linfócitos *tg*NK T (quando expressam um TCR transgênico) (Wingender; Kronenberg, 2005).

A população de linfócitos NK T mais estudada é a que possui o rearranjo do TCR V α 14 J α 18 invariante (V α 14*i*) em camundongos e um homólogo do TCR V α 24 J α 18 (V α 24*i*) em seres humanos. Linfócitos *i*NK T V α 14*i* e V α 24*i* reconhecem estruturas glicolípídicas apresentadas pelo CD1d. Há um grau elevado de reatividade cruzada entre espécies, pois as células de camundongo NK T V α 14*i* são capazes de reconhecer o CD1d humano e vice-versa (Borg *et al*, 2007).

Em camundongos, os linfócitos NK T surgem após o nascimento, proliferando até atingir a população normal em 6 a 8 semanas de vida, especialmente no timo, baço e fígado (Hanke *et al*, 1994). No fígado, os linfócitos NK T contabilizam de 20 a 30% dos linfócitos T; na medula óssea,

correspondem entre 10 a 20% dos timócitos maduros e 0,5 a 1% dos esplenócitos; e 0,1 a 0,5% em linfonodos periféricos (Bendelac *et al*, 1994; Hanke *et al*, 1994; Yoshimoto *et al*, 1995). Em seres humanos, a frequência de linfócitos NK T é geralmente baixa, apesar de um elevado grau de variabilidade interindividual ter sido relatado (Wingender; Kronenberg, 2005; Ohteki; MacDonald, 1994). Foi observado que a ativação dos linfócitos NK T murinos no timo, baço, medula óssea e fígado estimula sua atividade citotóxica e a produção tanto de citocinas Th1 , como o $\text{IFN-}\gamma$ e o $\text{TNF-}\alpha$, quanto citocinas Th2 , como IL 4, IL 10 e IL 13 (Bendelac *et al*, 1992; Bendelac; Schwartz, 1991; Michel *et al*, 2007). As subpopulações de linfócitos NK T também podem produzir IL17 (Michel *et al*, 2007).

Devido ao início rápido das suas funções efetoras após a ativação, têm sido descrita a participação dos linfócitos NK T em uma grande variedade de reações imunes, desde a resposta contra patógenos e células neoplásicas até mecanismos auto-imunes (Kronenberg, 2007; Tupin *et al*, 2007). De fato, é relatado que os camundongos deficientes em linfócitos NK T , especialmente os linfócitos NK T , apresentam maior susceptibilidade à infecções (Arase *et al*, 1992; Bendelac; Schwartz, 1991).

Os linfócitos NK T podem ser ativados pelo reconhecimento antigênico mediado pelo CD1d e TCR, através de citocinas pró-inflamatórias, tais como o $\text{IFN-}\gamma$ tipo I, IL 12 e IL 18, isoladamente ou em combinação, que podem ser produzidas por células dendríticas e macrófagos, logo após o início de processos infecciosos. A via de ativação independente da apresentação de antígenos foi chamada de ativação indireta (Wingender; Kronenberg, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que tais citocinas podem funcionar como agentes co-estimulatórios, quando for necessária a apresentação de antígenos via CD1d para a ativação dos linfócitos NK T (Brigl *et al*, 2003).

Estudos recentes sugerem que CD1d e os linfócitos NK T atuam no controle da colonização bacteriana no trato gastrointestinal de camundongos. A colonização do intestino por ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foi maior em camundongos deficientes em CD1d. No mesmo estudo, os autores observaram que os linfócitos NK T foram capazes de estimular as células de Paneth, que expressam CD1d, a secretar peptídeos antimicrobianos (Nieuwenhuis *et al*, 2009).

Conforme comentamos anteriormente, foi demonstrado que camundongos deficientes em linfócitos NK T $V\alpha 14 J\alpha 18$ apresentam capacidade reduzida de impedir a expansão do abscesso hepático amebiano experimental. A dificuldade destes camundongos em controlar a infecção foi comprovada pelo desenvolvimento de abscessos hepáticos maiores e pelo aumento das taxas de re-isolamento de trofozoítos de *E. histolytica* nas lesões hepáticas, quando comparado aos animais controles *wild-type* (Lotter *et al*, 2006).

Como observado em outros protozoários, a *E. histolytica* expõe em sua superfície um complexo glicoconjugado ancorado por glicosilfosfatidilinositol (GPI), designado lipopeptidofosfoglicano (LPPG) de *E. histolytica* (EhLPPG). Este glicoconjugado têm sido associado à patogenicidade da *E. histolytica* devido a diferenças observadas na quantidade e antigenicidade dos EhLPPG's em amebas patogênicas e não-patogênicas (Brigl *et al*, 2003; Moody *et al*, 1998). Para verificar se os linfócitos NK T secretam IFN- γ após estimulação com EhLPPG, linfócitos foram retirados de camundongos CD1d^{-/-} ou $J\alpha 18^{-/-}$ deficientes em NK T ou de todas as sub-populações de linfócitos NK T, e cultivados com APCs estimuladas pelo EhLPPG. Os autores observaram grande redução na secreção de IFN- γ nos camundongos CD1d^{-/-} e $J\alpha 18^{-/-}$, mostrando que os linfócitos NK T são uma importante fonte de IFN- γ diante da exposição ao EhLPPG. A produção de IFN- γ por linfócitos NK T ativados com EhLPPG pode dar início a uma resposta adaptativa do tipo Th1, capaz de ampliar a secreção de IFN- γ e contribuir para aumentar a eficiência da resposta imune contra a *E. histolytica*, reduzindo o número de trofozoítos e a expansão do abscesso amebiano (Lotter *et al*, 2009)

2. JUSTIFICATIVA

A amebíase é uma importante parasitose que soma muitas mortes em todo o mundo. Tentativas de conter sua expansão e morbidade passam pelo entendimento da patogênese da doença. Muitas dúvidas ainda persistem sobre os mecanismos da agressão amebiana e muitas substâncias ainda não identificadas devem estar envolvidas na geração e controle das lesões. A atuação dos linfócitos na proteção de infecções invasivas é ainda um assunto controverso devendo ser melhor investigado. Neste contexto, os linfócitos NK T são especialmente atrativos devido a escassez e relevância de estudos na área.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção, lesões e imunidade induzidas pela *E.histolytica* em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}.

3.1 Objetivos específicos:

3.1.1 Análise por citometria de fluxo da frequência de linfócitos NK T, LTCD4⁺, LTCD8⁺ e LB a partir de células isoladas do baço e linfonodo cecal.

3.1.2 Análise macroscópica, histopatológica e quantitativa das lesões cecais.

3.1.3 Identificação e quantificação por imuno-histoquímica dos trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e dos linfócitos NK1.1⁺ cecais.

3.1.4 Análise quantitativa da área de mucosa cecal, de muco e da mucina MUC-2 identificada por imuno-histoquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados

Foram utilizados 16 camundongos C57BL/6 *wild-type* (WT) (8 Eh-WT infectados e 8 CTRL-WT controles) e 16 camundongos C57BL/6CD1^{-/-} (8 Eh-CD1^{-/-} infectados e 8 CTRL-CD1^{-/-} controles) com idade aproximada de 70 dias. Os animais foram obtidos no biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e no biotério da FIOCRUZ/Belo Horizonte (camundongos C57BL/6CD1^{-/-} gentilmente cedidos pelo professor Ricardo Tostes Gazzinelli).

4.2 Cepa de *Entamoeba histolytica*

Foi utilizada a cepa EGG axênica de *E. histolytica*, isolada em 1988 no laboratório de Amebíase do departamento de Parasitologia do ICB-UFMG, de paciente apresentando colite disentérica e abscesso hepático amebiano. A análise sorológica através da técnica de ELISA foi positiva para *E. histolytica*, bem como a análise através do zimodema e do PCR (Gomes *et al*, 1999; Martinez *et al*, 1996.).

4.3 Preparo do inóculo

A cepa foi descongelada em banho-maria à 37°C, por cinco minutos, colocada em tubos com meio YI-S-32 modificado em estufa à 37° C; em seguida transferida para garrafa com o mesmo meio e mantida em estufa. As garrafas foram colocadas em banho de gelo, desprezado o sobrenadante, acrescentado tampão fosfato, centrifugado por cinco minutos e novamente desprezado o sobrenadante. Para contagem dos trofozoítos, meio rico em amebas foi colocado em um microtubo contendo eosina diluída 1:2, que funcionou como marcador de vitalidade, e depois levado à câmara de Neubauer. Para o cálculo de amebas por mL foi feita a multiplicação do número de amebas contadas pela diluição utilizada para a contagem e pelo fator de correção 2500 (Seydel *et al*, 1997).

4.4 Inoculação intracecal

Dezesseis camundongos (oito Eh-CD1^{-/-} e oito Eh-WT), divididos em subgrupos de 4 animais cada, foram anestesiados com solução de xilazina 2% (10 mg/Kg) e ketamina 5% (150mg/Kg) para realização de uma incisão horizontal no abdome de aproximadamente 2cm e inoculação intracecal de 10⁶ trofozoítos contidos em 0,1 ml de meio de cultura YI-S-32. Os dezesseis camundongos controles (oito CTRL-CD1^{-/-} e oito CTRL-WT), também divididos em grupos de 4 animais cada foram inoculados também pela via intracecal somente com meio de cultura YI-S-32 estéril.

4.5 Necropsia e histopatologia

Os animais foram sacrificados após 48 horas de infecção através de sangria sob anestesia geral e deslocamento cervical, para a coleta de ceco, baço e linfonodo mesentérico (LnM). O ceco foi submetido a uma abertura longitudinal, posteriormente fixado em formol tamponado 10% pH 7,2. Após o período de fixação, cada ceco foi dividido em 3 fatias, cortadas no sentido transversal, que foram desidratadas, diafanizadas, infiltradas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes com 4 µm de espessura, para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e para a realização de reações imuno-histoquímicas. As lesões foram descritas quanto a sua intensidade, topografia e presença de parasitos. 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, que é exclusivamente utilizado para o armazenamento temporário destas carcaças. Posteriormente foram coletados como lixo biológico infectante pelo serviço de limpeza do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), direcionados para o abrigo externo específico e recolhidos pela Serviço de Limpeza Urbana (SLU).

4.6 Preparação de suspensões celulares

4.6.1 Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI 1640 como meio incompleto e, como meio de cultura, RPMI 1640 enriquecido com 2 mM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercapto-etanol, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de fungizona, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

4.6.2 Preparação de suspensões celulares do baço e linfonodo mesentérico

O baço e LnM de cada animal foram retirados e mantidos em meio RPMI 1640 completo em tubos de centrifuga de 15ml e mantidos no gelo. As suspensões de células do baço e LnM foram preparadas de acordo com a seguinte técnica, padronizada no Laboratório de Imunobiologia do ICB: o baço foi colocado em um macerador de vidro e pressionado em meio incompleto. Os LnM's foram macerados utilizando as extremidades ásperas de lâminas de vidro; as suspensão de células foram transferidas para um tubo de 15 mL e centrifugadas a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Foi desprezado o sobrenadante e ressuspendidas as células em meio completo para contagem das células viáveis.

No caso do baço, foi desprezado o sobrenadante e acrescentado 9 µL de água destilada para lisar as hemácias e, imediatamente após, adicionado 1 mL de PBS 10X concentrado. Novamente foi centrifugado a 1200 rpm, por 10 minutos a 4°C, as células foram ressuspendidas em meio completo e contadas as células viáveis.

4.7 Contagem das células viáveis

O número de células viáveis da suspensão foi obtido contando-se alíquotas com 50 µl da suspensão celular em volume igual de eritrocina e colocada na Câmara de Neubauer. Após a contagem das células não coradas (viáveis), o número de células foi expresso de acordo com a fórmula: n° de

células / ml = (células viáveis x diluição x 10^4) / n^o campos contados na Câmara de Neubauer. As concentrações das suspensões foram então todas padronizadas para se obter 5×10^6 células/mL.

4.8 Análise fenotípica de linfócitos por citometria de fluxo

Depois de isoladas do baço e LnM, as células foram ressuspensas em PBS pH 7,2 contendo 0,2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida sódica, a uma concentração de 2×10^7 células/mL. Em seguida, foram adicionados 25 μ L da suspensão celular em uma placa de 96 poços com fundo em U e incubadas por 30 minutos, a 4^o C, com 10 μ L de solução dos anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos CD3, NK1.1, CD4, CD8, CD19 e CD69 (PharMingem, *San Diego, CA, EUA*) diluídos em PBS wash, conjugados com fluorocromos ficoeritrina (PE), fluoresceína (FITC) e CyChrome (Cy). Após esse período, as placas foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm e 4^o C, o sobrenadante foi desprezado por inversão rápida e, em seguida, lavadas com PBS-azida por duas vezes. O *pellet* foi ressuspensado em 200 μ L de fixador Mac Facs Fix, as suspensões armazenadas a 4^o C e protegidas da luz até a aquisição dos dados, utilizando-se FACScan de três cores (*Becton Dickinson, Mountain View, Califórnia, USA*). Como controles negativos, foram utilizados os anticorpos IgG2a-FITC e IgG2b-PE em células incubadas com imunoglobulinas do mesmo isotipo utilizado no anticorpo marcado. A porcentagem de células positivas foi analisada através do programa Cell Quest em comparação ao controle negativo. Durante a aquisição foram coletados 30.000 eventos para análise. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e sub-populações celulares, foram realizadas através de um sistema computacional acoplado ao citômetro.

4.9 Análise quantitativa das lesões intestinais (erosões e úlceras)

Foram denominadas de erosões, as pequenas lesões destrutivas da mucosa cecal, menos frequentemente capazes de atingir também a submucosa, com presença ou ausência de infiltrado inflamatório misto. Já as úlceras intestinais são lesões maiores e mais profundas, sempre atingindo a

mucosa e submucosa e, às vezes, a muscular. Para mensuração da área total de lesões intestinais, foram analisados cortes histológicos corados pela H&E das 3 fatias de cada ceco dos animais dos grupos Eh-WT e Eh-CD1^{-/-}. Todas as erosões e úlceras foram digitalizadas através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (*Tokyo, Japan*) e manualmente medidas para obtenção da extensão da necrose em μm , por intermédio do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (*Oberkochen, Germany*).

4.10 Reação imuno-histoquímica e análise quantitativa dos trofozoítos

Os cortes para processamento em imuno-histoquímica foram desparafinados em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40vv à 0,2% em 200 ml de PBS por 20 minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando-se os cortes com soro de cabra diluído 1:40 por 40 minutos. Os cortes foram incubados com soro policlonal anti-*E. histolytica* diluído 1:1000 (produzido nos Laboratórios de Amebíase e de Protozooses/ICB/UFMG), por 18 horas; em seguida, incubados com IgG biotinilada diluída 1:200 (*Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA*) e estreptavidina conjugada com peroxidase (*Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA*) também 1:200, por 1 hora cada. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos obtidos de lesões amebianas ricas em trofozoítos. Como controle negativo, o anticorpo 1^o foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan. Todos os trofozoítos identificados pela imuno-histoquímica, nas três fatias de cada ceco dos animais dos grupos Eh-WT e Eh-CD1^{-/-}, foram visualizados e quantificados através da objetiva de 40X do microscópio Axiolab Carl Zeiss.

4.11 Reação imuno-histoquímica e análise quantitativa dos linfócitos NK1.1⁺

Outros cortes histológicos das fatias de ceco foram desparafinados em xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em PBS pH 7,2. Foi realizado o reaproveitamento antigênico com a solução Dako Retrieval (Dako, USA) à 100° c por vinte minutos. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40vv à 0,2% em 200 ml de PBS por 20 minutos e os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando-se os cortes com soro de camundongo diluído 1:40 por 1 hora. Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal biotilado anti-NK-1.1 de camundongo (*Pharmingen, San Diego, CA, USA*) diluído 1:40, por 18 horas e, em seguida, com estreptavidina conjugada com peroxidase (*Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA*) 1:100, por 1 hora. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos do ceco de animais do grupo CTRL-WT. Como controle negativo, o anticorpo 1^o foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 2 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan. Todos os linfócitos NK T identificados pela imuno-histoquímica, em uma fatia de cada ceco dos animais dos grupos CTRL-WT, CTRL-CD1^{-/-}, Eh-WT e Eh-CD1^{-/-}, foram visualizados e quantificados através da objetiva de 40X do microscópio Axiolab Carl Zeiss.

4.12 Reação imuno-histoquímica para detecção de mucina MUC-2

Foram utilizados cortes histológicos do ceco de todos os grupos de animais. Foi realizado o reaproveitamento antigênico com a solução Dako Retrieval (Dako, USA) à 100° c por vinte minutos. O bloqueio dos sítios de ligação inespecífica e da peroxidase endógena foi realizado como na reação para detecção de trofozoítos. Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti MUC-2 diluído 1:150 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

USA), por 18 horas; em seguida, incubados com IgG biotinizada diluída 1:50 (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (*Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA*) 1:100, por 1 hora cada. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40v à 0,2%. Como controles positivos foram usados cortes histológicos do ceco de animais do grupo CTRL-WT. Como controle negativo, o anticorpo 1º 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.

4.13 Análise quantitativa da área de mucosa cecal, muco e da mucina MUC-2

Um corte histológico de cada ceco dos grupos CTRL-WT e CTRL-CD1^{-/-}, corados pelo PAS, foi visualizado pela objetiva de 40X para a digitalização de 20 imagens aleatórias através da microcâmara JVC TK-1270/RGB (*Tokyo, Japan*). Em cada animal, foram analisados 11 x 10³ µm² de mucosa cecal para o cálculo das áreas de muco, que se mostravam PAS positivas. Os pixels com tons de bonina das regiões coradas pelo PAS foram selecionados para a criação de uma imagem binária, processamento digital para eliminação dos artefatos e obtenção da área em µm². A área total de mucosa cecal foi calculada nas mesmas 20 imagens digitalizadas de cada animal, através da seleção de todos os tipos de pixels presentes na mucosa e da criação da respectiva imagem binária.

A área de marcação MUC-2⁺ foi calculada à partir de 20 imagens da mucosa cecal dos animais dos grupos CTRL-WT, Eh-WT, CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}. A área positiva de MUC-2 foi calculada selecionando os pixels com tons de marrom e utilizando a mesma metodologia da análise das regiões PAS⁺.

A metodologia empregada para o imageamento microscópico, segmentação de imagens e definição das condições de morfometria foi a descrita por Caliani (1997).

4.14 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Prism 5.0, empregando-se os testes *One-way ANOVA* quando analisado mais de dois grupos, seguido do teste *Tukey como post test* e o *Test t unpaired* foi empregado quando comparado dois grupos. Todos os grupos assumiram distribuição *Gaussian* quando submetidos ao teste de normalidade *Shapiro-Wilk*. Os resultados foram expressos como média \pm SEM e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Alguns resultados obtidos foram correlacionados entre si através do teste de correlação de *Pearson* por assumir distribuição normal entre as variáveis, em outros resultados empregamos o teste de correlação de *Spearman* por não assumir ou garantir relação linear entre as variáveis.

5. RESULTADOS

5.1 Análise por citometria de fluxo da frequência de linfócitos NK T, LTCD4⁺, LTCD8⁺ e LB do baço e linfonodo mesentérico

O modelo experimental deste estudo permitiu realizar a análise fenotípica por citometria de fluxo dos linfócitos NK T, TCD4⁺, TCD8⁺ e B do baço e LnM e, traçar o perfil da frequência celular de camundongos selvagens e deficientes para molécula CD1 em resposta a infecção por *E. histolytica*.

A frequência de linfócitos NK T CD3⁺ NK1.1⁺ do LnM foi reduzida significativamente em camundongos dos grupos CTRL-CD1^{-/-} (4,76 ± 1,59%) e Eh-CD1^{-/-} (3,19 ± 1,57%) quando comparados com os grupos Eh-WT (20,24 ± 6,09%) e CTRL-WT (13,00 ± 1,45%) (p<0,05) (Gráfico 1). Tal redução era esperada, pois a molécula CD1 é um componente restrito aos linfócitos NK T.

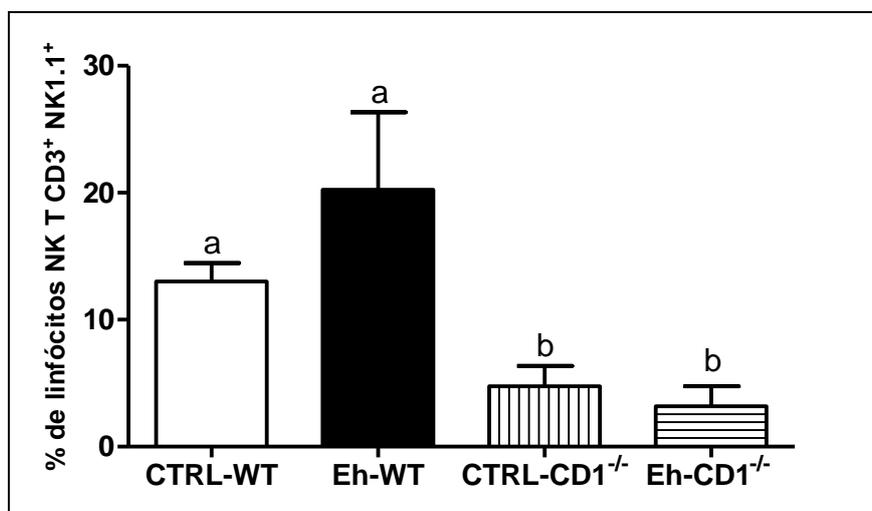


GRÁFICO 1: Frequência de linfócitos NK T CD3⁺ NK1.1⁺ do linfonodo mesentérico de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8. p<0,05

Já no baço, não ocorreu diferença significativa na frequência de linfócitos NK T, quando comparados os grupos CTRL-WT ($8,18 \pm 1,12\%$), Eh-WT ($8,16 \pm 1,16\%$), CTRL-CD1^{-/-} ($7,60 \pm 0,8563\%$) e Eh-CD1^{-/-} ($8,46 \pm 1,39\%$) (Gráfico 2).

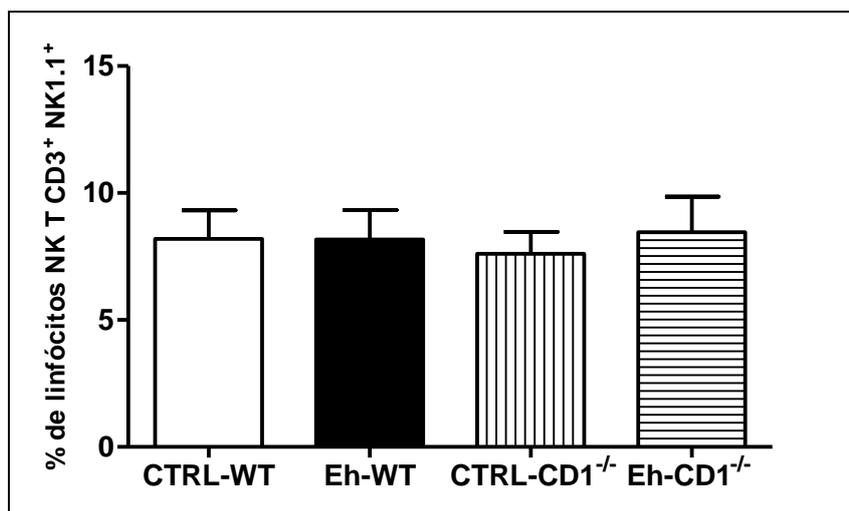


GRÁFICO 2: Frequência de linfócitos NK T CD3⁺ NK1.1⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8.

Não foi observada diferença significativa na frequência de linfócitos TCD4⁺ CD69⁺ no LnM entre os grupos CTRL-WT ($13,68 \pm 3,57\%$), Eh-WT ($14,84 \pm 2,0\%$), CTRL-CD1^{-/-} ($11,08 \pm 0,27\%$) e Eh-CD1^{-/-} ($11,05 \pm 0,39\%$) (Gráfico 3). A frequência de linfócitos TCD4⁺ CD69⁺ no baço também não variou significativamente quando comparados os grupos CTRL-WT ($6,97 \pm 0,54\%$), Eh-WT ($7,78 \pm 0,45\%$), CTRL-CD1^{-/-} ($7,66 \pm 0,57\%$) e Eh-CD1^{-/-} ($7,08 \pm 0,39\%$) (Gráfico 4).

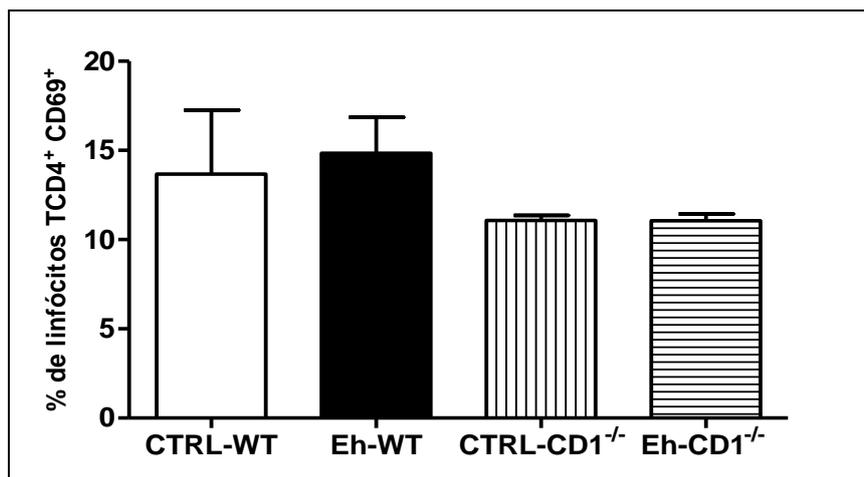


GRÁFICO 3: Frequência de linfócitos TCD4⁺ CD69⁺ do linfonodo mesentérico de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8.

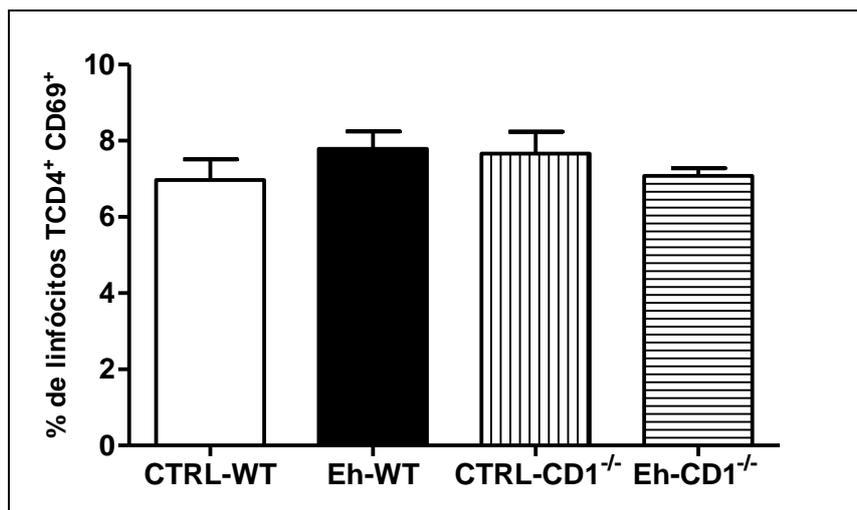


GRÁFICO 4: Frequência de linfócitos TCD4⁺ CD69⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8.

Foi verificada redução significativa na frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ do LnM dos grupos CTRL-CD1^{-/-} (7,99 ± 0,43%) e Eh-CD1^{-/-} (6,74 ± 0,84%) em comparação aos grupos CTRL-WT (31,64 ± 9,29%) e Eh-WT (35,68 ± 3,71%) ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

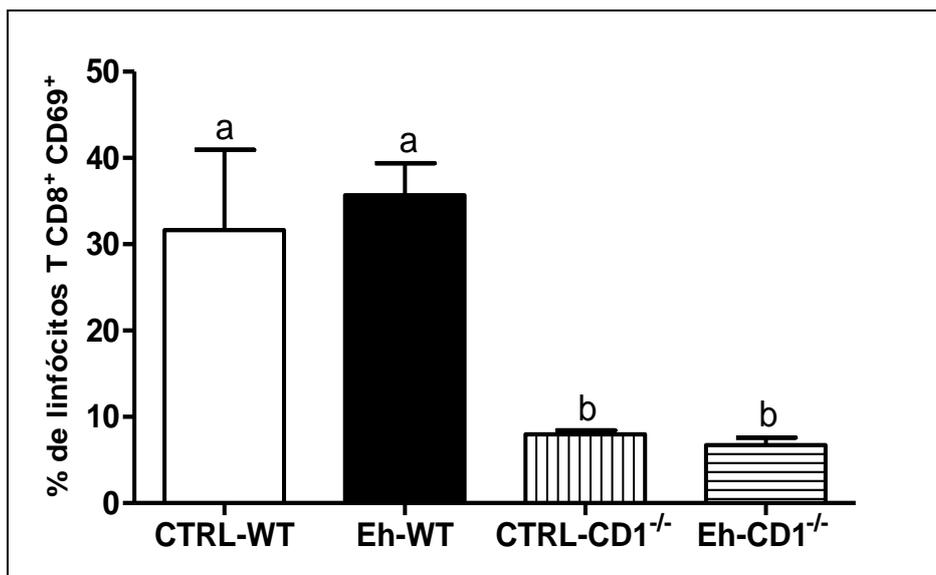


GRÁFICO 5: Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ do linfonodo mesentérico de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8. p<0,05

No baço não foi verificada diferença significativa na frequência dos linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ quando comparados os grupos CTRL-WT (17,50 ± 2,54%), Eh-WT (13,57 ± 2,71%), CTRL-CD1^{-/-} (12,68 ± 1,48%) e Eh-CD1^{-/-} (8,78 ± 0,47%) (Gráfico 6).

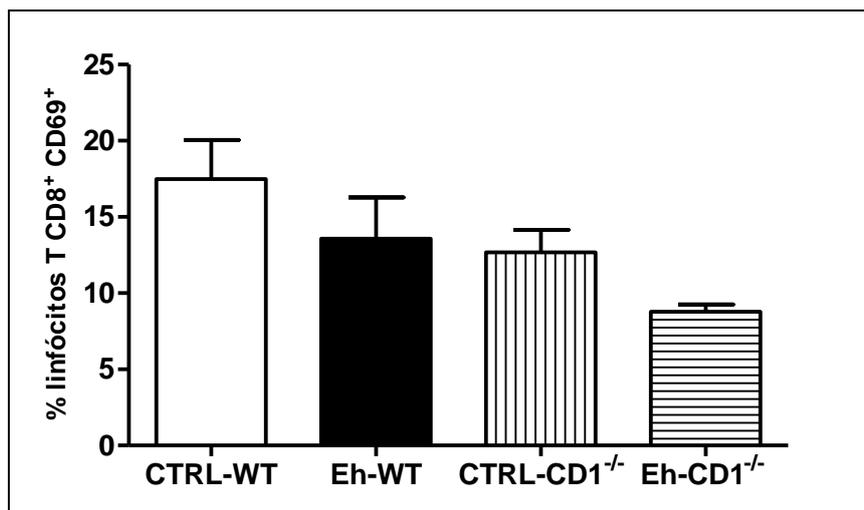


GRÁFICO 6: Frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8.

O LnM dos animais dos grupos CTRL-CD1^{-/-} (1,55 ± 0,25%) e Eh-CD1^{-/-} (0,87 ± 0,11%) apresentaram redução significativa na frequência de linfócitos CD19⁺ CD69⁺ quando comparados ao grupo CTRL-WT (38,70 ± 6,97%) e Eh-WT (64,88 ± 10,46%) ($p < 0,05$). Também ocorreu aumento significativo na frequência de linfócitos CD19⁺ CD69⁺ do LC do grupo Eh-WT (64,88 ± 10,46%) em comparação ao grupo CTRL-WT (38,70 ± 6,97%) ($p < 0,05$) (Gráfico 7).

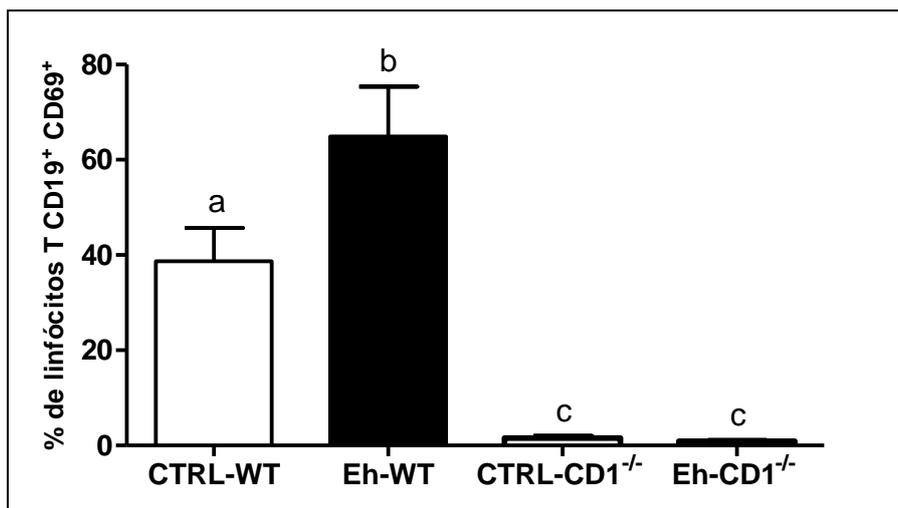


GRÁFICO 7: Frequência de linfócitos T CD19⁺ CD69⁺ do linfonodo mesentérico de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-}, controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8. p<0,05

A frequência de linfócitos CD19⁺ CD69⁺ no baço dos animais do grupo Eh-WT (3,52 ± 0,23%) foi menor quando comparada com os grupos CTRL-CD1^{-/-} (7,60 ± 0,85%), Eh-CD1^{-/-} (8,46 ± 1,39%) e CTRL-WT (4,74 ± 0,44%) (p<0,05) (Gráfico 8).

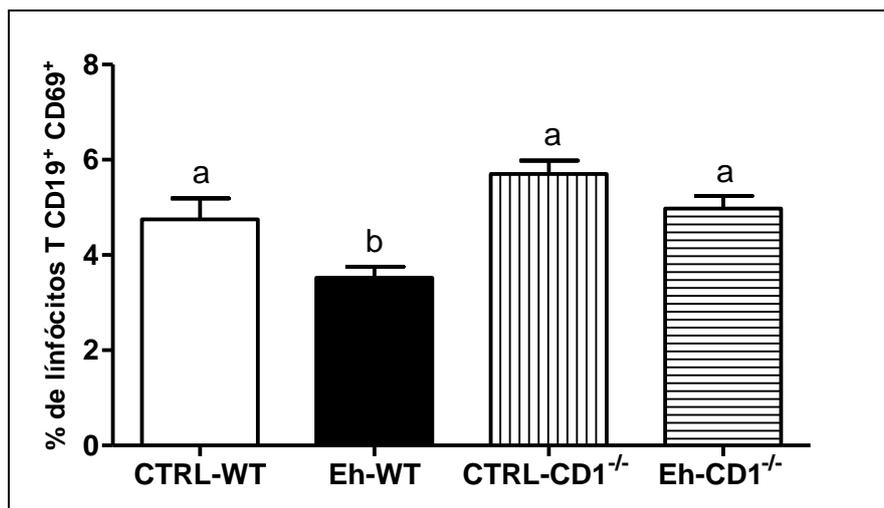


GRÁFICO 8: Frequência de linfócitos T CD19⁺ CD69⁺ do baço de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-} controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=8. p<0,05

5.2 Análise macroscópica, histopatológica e quantitativa das lesões cecais

Após 48 horas de infecção, a análise macroscópica mostrou hiperemia no ceco de todos os camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-}, ausência de conteúdo fecal e presença de úlceras cecais em 2 animais deste grupo. As úlceras mostravam-se protuberantes, de formato arredondado e de coloração esbranquiçada, visíveis tanto na superfície mucosa quanto na serosa (Figuras 1e, f). A análise macroscópica do ceco dos camundongos do grupo Eh-WT não detectou a presença de lesões, sendo encontradas apenas hiperemia (Figuras 1c, d). Os cecos dos camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-} geralmente eram maiores e mais distendidos por gases quando comparados aos dos camundongos do grupo controle CTRL-CD1^{-/-} (dados não mostrados). O mesmo não foi observado no grupo Eh-WT em relação ao seu controle CTRL-WT.

A análise histopatológica mostrou que a mucosa cecal dos animais do grupo CTRL-WT estava mais espessa, com criptas mais alongadas, aparentemente, com maior produção de muco pelas células caliciformes em relação ao grupo CTRL-CD1^{-/-}, cuja mucosa mostrava-se mais delgada e com criptas mais curtas (Figuras 2a, b).

Foram observadas lesões cecais amebianas em todos os camundongos dos grupos Eh-CD1^{-/-} e Eh-WT. As úlceras amebianas eram caracterizadas por necrose da mucosa e submucosa, às vezes atingindo também a camada muscular, com a presença de debris celulares e infiltrado inflamatório misto constituído por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e raros eosinófilos (Figuras 2e, f). Foram observadas úlceras em 07 animais do grupo Eh-CD1^{-/-}, de um total de 10 animais necropsiados, em contraste dos animais do grupo Eh-WT onde não foram observadas úlceras. Foram encontradas em todos os animais de ambos os grupos Eh-WT e Eh-CD1^{-/-}, as zonas de necrose mais superficiais detectadas somente à microscopia óptica, denominadas de erosões e caracterizadas por pequena zona de destruição da mucosa, às vezes atingindo pequena faixa de submucosa, com ou sem infiltrado inflamatório misto, discreto ou moderado (Figuras 2c, d).

A análise quantitativa mostrou que a extensão de mucosa necrosada foi maior nos animais do grupo Eh-CD1^{-/-} ($2.713 \pm 566,6 \mu\text{m}$) do que nos camundongos Eh-WT ($575,4 \pm 69,73 \mu\text{m}$) ($p < 0,05$) (Gráfico 9).

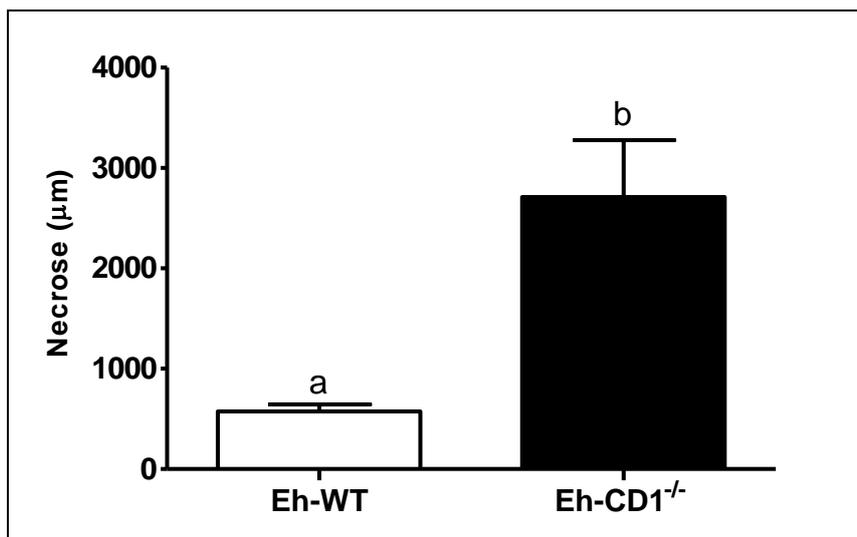


GRÁFICO 9: Extensão de mucosa necrosada em camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-} inoculados com *Entamoeba histolytica*.

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 wild-type infectados com *E. histolytica*.

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*.

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão, N=10. $p < 0,05$

5.3 Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos trofozoítos

Não foi observada reação positiva em trofozoítos nos cortes histológicos onde o anticorpo primário foi substituído por PBS (dado não mostrado), ao contrário dos cortes que receberam o anticorpo anti-*E. histolytica* (Figura 3a). Os trofozoítos de *Entamoeba histolytica* identificados pela imuno-histoquímica foram encontrados em maior número nas áreas de necrose e na borda de úlceras cecais, em ambos os grupos infectados (Figuras 3b, c). Em menor quantidade, os trofozoítos foram observados na submucosa imediatamente abaixo da úlcera, bem como distante da mesma, demonstrando a capacidade de invasão do parasito (Figuras 3c, d). A análise quantitativa mostrou que os trofozoítos foram frequentes em maior número nos camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-} ($14,3 \pm 3,95$) do que nos camundongos do grupo Eh-WT ($5,6 \pm 1,19$) ($p < 0,05$) (Gráfico 10).

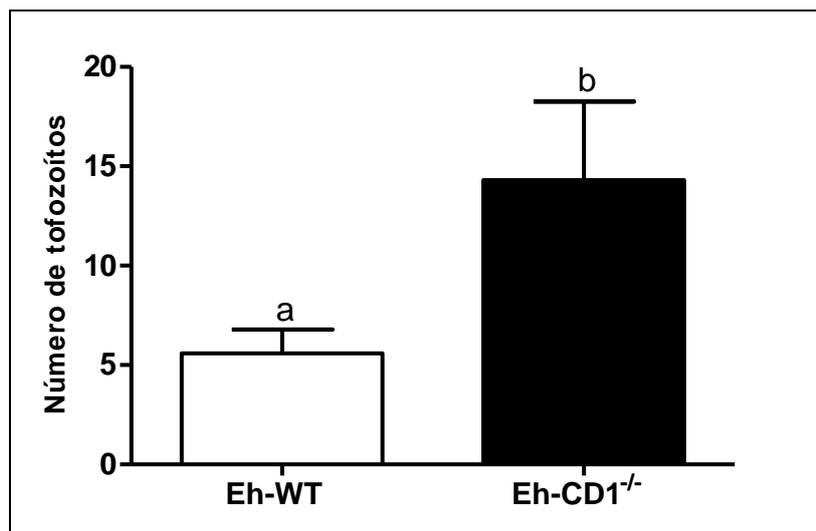


GRÁFICO 10: Número de trofozoítos no ceco de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-} inoculados com *Entamoeba histolytica*.

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 wild-type infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=10. *p<0,05

5.4 Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos linfócitos NK1.1⁺.

Os linfócitos NK1.1⁺ foram identificados através da presença de coloração marrom escura, de localização citoplasmática, resultante da ligação do anticorpo anti-NK-1.1 de camundongo e da precipitação de diaminobenzidina. Todas as células positivas apresentavam núcleo pequeno e esférico e, citoplasma frequentemente bem evidente (Figura 4a). Nos animais dos grupos CTRL-WT e CTRL-CD1^{-/-} os linfócitos NK1.1⁺ foram encontrados predominantemente na lâmina própria e, mais raramente, na submucosa (Figuras 4a, d). Já nos animais dos grupos Eh-CD1^{-/-} e Eh-WT, os linfócitos NK1.1⁺ foram observados com maior frequência tanto na lâmina própria quanto na submucosa (Figuras 4b, c, e, f)

A análise quantitativa mostrou que os linfócitos NK1.1⁺ foram significativamente menos frequentes nos camundongos dos grupos CTRL-CD1^{-/-} (26,3 ± 2,95) e Eh-CD1^{-/-} (22,4 ± 4,23) quando comparados com os grupos CTRL-WT (69,5 ± 7,17) e Eh-WT (121,1 ± 21,98) (p<0,05). A análise das

suspensões celulares do linfonodo mesentérico por citometria de fluxo nos camundongos CD1d^{-/-} mostrou redução significativa dos linfócitos NK T (CD3⁺ NK1.1⁺), sugerindo que a maioria dos linfócitos NK1.1⁺ tratavam-se deste tipo celular. Também foi observado aumento significativo no número de linfócitos NK T nos animais do grupo Eh-WT em relação a todos os outros grupos de animais (p<0,05). Não foi observada diferença significativa entre os animais dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}. (Gráfico 11).

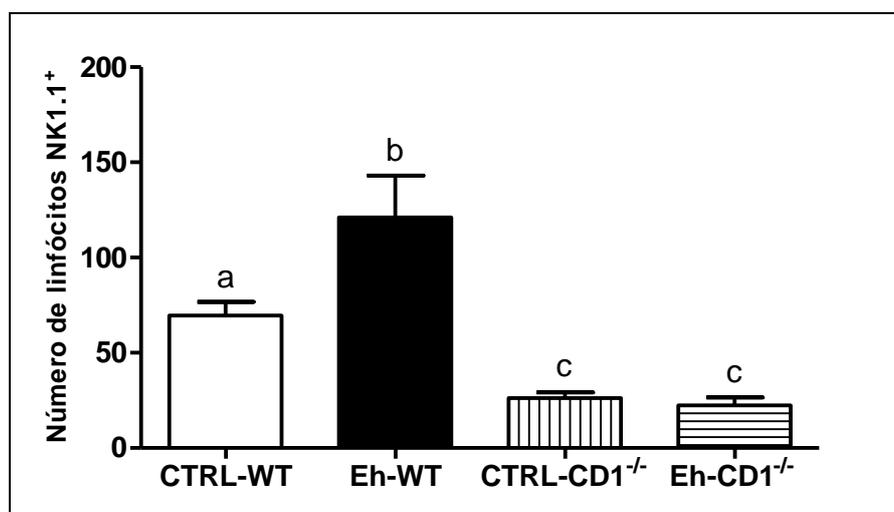


GRÁFICO 11: Número de linfócitos NK1.1⁺ no ceco de camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6 CD1^{-/-} controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=10. p<0,05

5.5 Análise qualitativa e quantitativa da mucosa cecal, de muco e da mucina MUC-2

A mucosa do ceco consiste de glândulas ou criptas tubulares, formada principalmente por células calciformes e enterócitos. A mucosa dos camundongos do grupo CTRL-WT apresentava-se mais espessa (Figura 2a) e

aparentemente com maior produção de muco pelas células caliciformes em relação ao grupo CTRL-CD1^{-/-}, cuja mucosa mostrava-se mais delgada (Figura 2b). Diante de tais observações, utilizamos a coloração histoquímica Ácido Periódico de Schiff (PAS) para avaliar prováveis diferenças na expressão de polissacarídeos sulfatados, carboxilados e de glicoproteínas que constituem o muco produzido pelas células caliciformes e também para mensurar a área de mucosa.

A análise quantitativa mostrou que a área de mucosa dos camundongos do grupo CTRL-WT ($31.254 \pm 1.273 \mu\text{m}^2$) foi maior do que a observada nos camundongos do grupo CTRL-CD1^{-/-} ($20.641 \pm 1.885 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$) (Gráfico 12). Também foi observado que a área corada pelo PAS foi maior nos camundongos do grupo CTRL-WT ($5.820 \pm 237,1 \mu\text{m}^2$) do que nos camundongos do CTRL-CD1^{-/-} ($3.525 \pm 496,2 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,05$) (Gráfico 13). Diante destas diferenças observadas, decidimos avaliar a expressão imunohistoquímica da mucina MUC-2 na mucosa cecal de todos os grupos de animais.

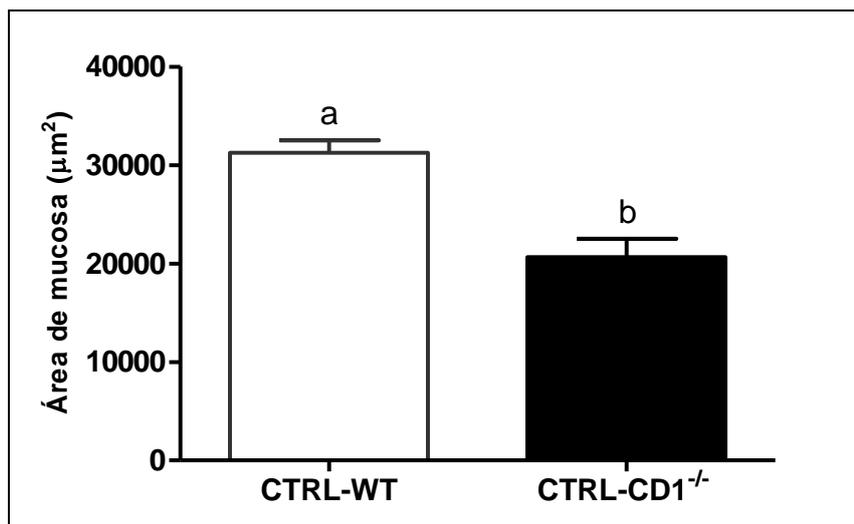


GRÁFICO 12: Área de mucosa cecal de camundongos C57BL/6 wild-type e C57BL/6 CD1^{-/-} controles.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} controles não infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=10. *p<0,05

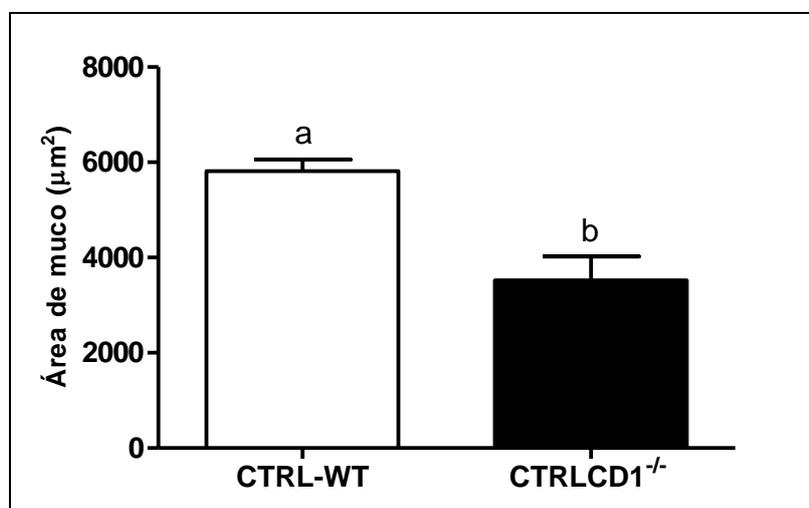


GRÁFICO 13: Área de muco na mucosa cecal de camundongos C57BL/6 wild-type e C57BL/6 CD1^{-/-} controles.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} controles não infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=10. p<0,05

Nos animais de ambos os grupos CTRL-CD1^{-/-} (391,0 ± 47,34 μm²) e Eh-CD1^{-/-} (750,0 ± 68,44 μm²) foi verificada redução significativa da área de marcação para MUC-2 em relação aos grupos CTRL-WT (1.066 ± 192,9 μm²) e Eh-WT (2.168 ± 152,9 μm²) (p<0,05) (Figuras 5a, b, c, d). Não foi verificada diferença entre os grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}. Já no grupo Eh-WT, a área MUC-2⁺ foi significativamente superior a observada nos camundongos do grupo CTRL-WT (p<0,05) (Gráfico 14).

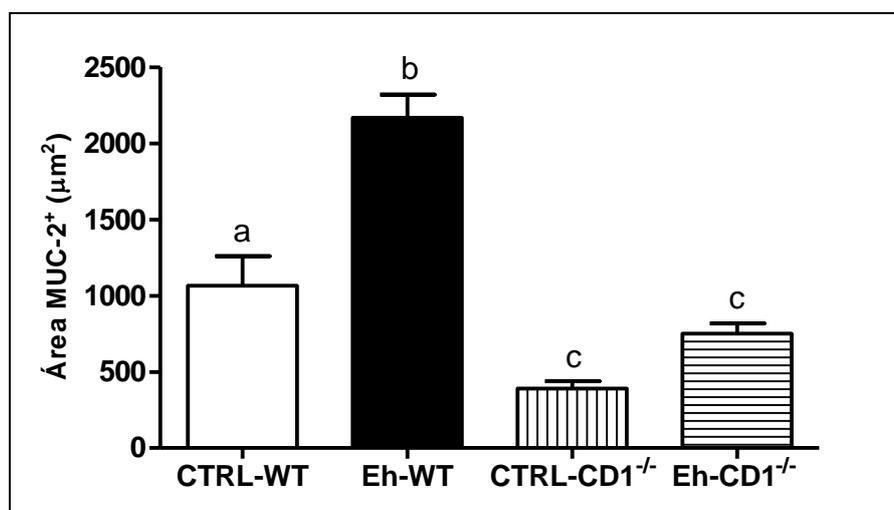


GRÁFICO 14: Área MUC-2⁺ na mucosa cecal de camundongos C57BL/6 wild-type e C57BL/6 CD1^{-/-} controles e infectados com *Entamoeba histolytica*.

CTRL-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* não infectados com *E. histolytica*

Eh-WT: Camundongos C57BL/6 *wild-type* infectados com *E. histolytica*

CTRL-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} não infectados com *E. histolytica*

Eh-CD1^{-/-}: Camundongos C57BL/6 CD1^{-/-} infectados com *E. histolytica*

Os dados são mostrados como média ± erro padrão, N=10. p<0,05

5.6 Análise de correlação entre a área MUC-2⁺ e a extensão de necrose

Para avaliar as prováveis correlações existentes entre a área MUC-2⁺ e a extensão de necrose, foi aplicado o teste de correlação *Pearson* após verificada a distribuição normal entre as variáveis. Nos animais inoculados com *E. histolytica* foi observada correlação negativa entre a área MUC-2⁺ e a extensão de necrose ($r= 0,4168$), ou seja, quanto menor a área MUC-2⁺ maior a extensão da necrose ($p<0,05$) (Gráfico 15).

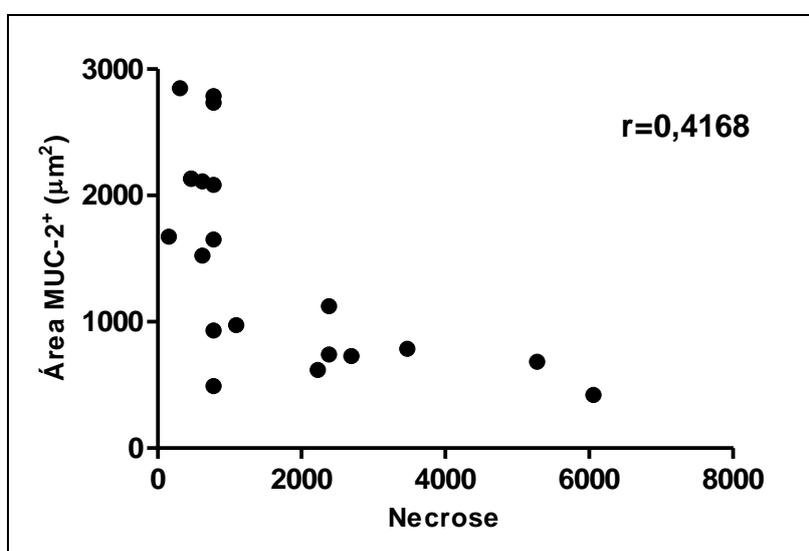


GRÁFICO 15: Correlação entre a área MUC-2⁺ e a extensão da necrose. Os dados são mostrados como coeficiente de determinação r . $p<0,05$
Teste de correlação negativa, correlação de *Pearson*.

5.7 Análise de correlação entre a área MUC-2⁺ e o número de linfócitos NK1.1⁺

Ao analisarmos as possíveis correlações existentes entre a área de MUC-2⁺ e o número de linfócitos NK1.1⁺, empregamos o teste de correlação de *Spearman* por não podermos assumir ou garantir relação linear entre as variáveis. Nos animais inoculados com *E. histolytica* foi observada correlação positiva entre a área MUC-2⁺ e o número de linfócitos NK1.1⁺ ($r^2= 0,5956$), ou

seja quanto menor a área MUC-2⁺ menor o número de linfócitos NK1.1⁺ ($p < 0,05$) (Gráfico 16).

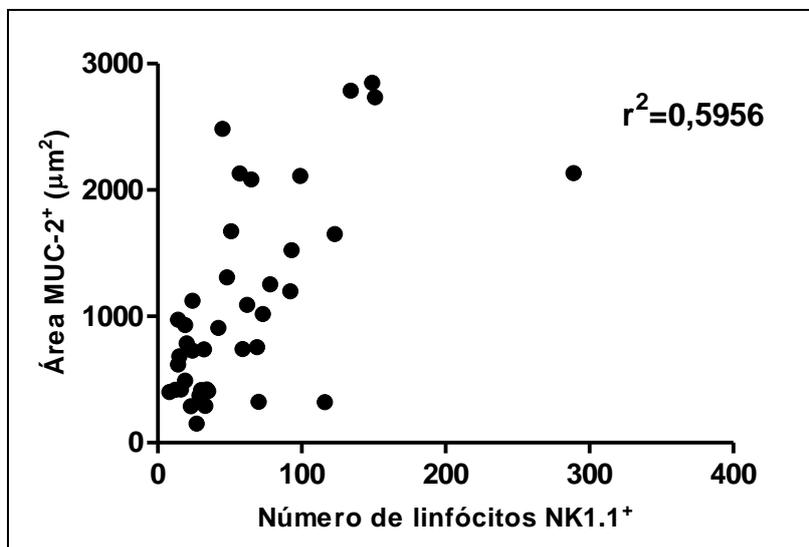


GRÁFICO 16: Correlação entre a área MUC-2⁺ e o número de linfócitos NK1.1⁺.

Os dados são mostrados como coeficiente de determinação r^2 . $p < 0,05$

Teste de correlação positiva, correlação de *Spearman*.

5.8 Análise de correlação entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK1.1⁺

Para analisar as possíveis correlações existentes entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK1.1⁺, foi realizado o teste de correlação de *Spearman* por não podermos assumir ou garantir relação linear entre as variáveis. Nos animais inoculados com *E. histolytica* foi observada correlação negativa entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK1.1⁺ ($r^2 = 0,6159$), ou seja, quanto menor o número de linfócitos NK1.1⁺, maior a extensão de necrose ($p < 0,05$) (Gráfico 17).

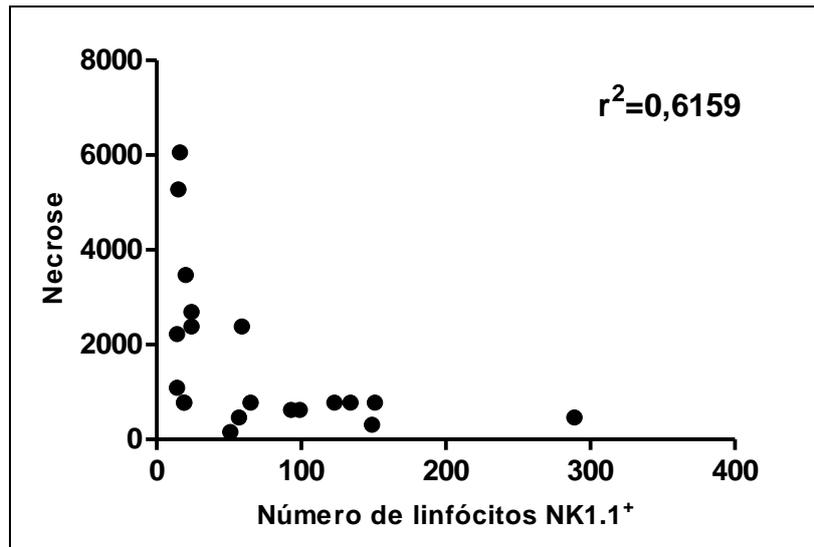


GRÁFICO 17: Correlação entre a extensão de necrose e o número de linfócitos NK1.1⁺.

Os dados são mostrados como coeficiente de determinação r^2 . $p < 0,05$

Teste de correlação negativa, correlação de *Spearman*.

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar comparativamente a frequência de linfócitos na amebíase intestinal em camundongos selvagens (C57BL/6WT) e *knockout* para CD1d (C57BL/6CD1^{-/-}) e correlacioná-los com a intensidade das lesões, o número de trofozoítos, de linfócitos NK T, área de muco e com a expressão de MUC-2. É importante ressaltar que, até o momento, este foi o único trabalho que propôs pesquisar o envolvimento de linfócitos NK T na colite amebiana.

Uma das observações mais importantes deste estudo foi a demonstração de que os camundongos *knockout* para a molécula CD1 e, conseqüentemente com menor número de linfócitos NK T, são mais susceptíveis à infecção amebiana e ao desenvolvimento de lesões cecais. Além disso, a menor produção da mucina MUC-2 nos camundongos C57BL/6CD1^{-/-} está associada à redução do número de linfócitos NK T e ao surgimento de lesões cecais mais intensas.

O modelo experimental deste estudo permitiu realizar a análise fenotípica por citometria de fluxo dos linfócitos NK T, TCD4⁺, TCD8⁺ e B do LnM e baço, traçando o perfil da frequência celular de camundongos selvagens e deficientes para a molécula CD1 em resposta a infecção por *E. histolytica*. A frequência de linfócitos NK T CD3⁺ NK1.1⁺ do LnM foi reduzida significativamente em camundongos dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} quando comparados com os grupos Eh-WT e CTRL-WT. Os linfócitos NK T são ativados diretamente através do reconhecimento de Ag's glicolipídicos pela molécula CD1 (Tupin *et al*, 2007). Tal redução era esperada nos camundongos C57BL/6CD1^{-/-}, pois a molécula CD1 é um componente necessário para ativação de linfócitos NK T. Esta análise confirma que os camundongos C57BL/6CD1^{-/-} realmente apresentavam uma reduzida frequência de linfócitos NK T em relação aos camundongos selvagens, sendo apropriados para o nosso estudo.

No LnM dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} foi verificada menor frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ em relação aos grupos CTRL-WT e Eh-WT. Tal redução provavelmente pode ter ocorrido pela deficiência de células NK T ativadas. Células NK T restritas a CD1d ativadas, produzem uma

variedade de citocinas e sua ausência pode levar a uma diminuição na proliferação de célula T CD8⁺ CD69⁺. Alguns autores observaram em camundongos J α 18^{-/-} e CD1d^{-/-}, que a ativação de células NK T mediada por α -Galactosilceramida aumenta a proliferação homeostática de células T CD8⁺ mas não de células T CD4⁺. O aumento da proliferação homeostática de células T CD8⁺, foi relacionado à produção de IL-4 por células NK T ativadas, mostrando que a IL-4 atua diretamente sobre essas células T CD8⁺ induzindo a sua proliferação (Ueda *et al*, 2006). Contudo, em relação aos linfócitos T citotóxicos, estudos de outros autores têm mostrado escassez destas células na colite amebiana bem como no abscesso hepático. A caracterização por imuno-histoquímica de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ na colite amebiana humana não demonstrou a presença de um número significativo destas células e nem o contato das mesmas com trofozoítos, tanto em regiões lesadas quanto em áreas preservadas (Ventura-Juárez *et al*, 2007).

Alguns autores propõem que os principais mecanismos imunes utilizados na infecção intestinal por *E. histolytica*, ocorrem nos primeiros dias após a infecção, sendo mediados pela imunidade inata e independentes de linfócitos T (Asgharpour *et al*, 2005). Ao analisarmos as células T CD8⁺ CD69⁺ no baço, não verificamos nenhuma diferença significativa na frequência destes linfócitos quando comparados os camundongos dos grupos CTRL-WT, Eh-WT, CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-}. Contudo, os resultados demonstraram uma tendência de redução da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD69⁺ no baço dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} em relação aos grupos CTRL-WT e Eh-WT.

A molécula CD1d é constitutivamente expressa nas células dendríticas, linfócitos B e macrófagos, tanto no homem quanto no camundongo, embora os níveis de expressão possam variar entre estes tipos celulares (Brossay *et al*, 1997). A análise quantitativa dos linfócitos demonstrou redução significativa na frequência de linfócitos B (CD19⁺ CD69⁺) no LnM dos animais dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} quando comparados aos grupos CTRL-WT e Eh-WT. É possível que tal redução de linfócitos B recém ativados no LnM dos camundongos C57BL/6CD1^{-/-} esteja relacionada a escassez de linfócitos NK T ativados nos camundongos deficientes em CD1, o LnM drena diretamente a linfa da mucosa cecal onde existem muitos linfócitos NK T. Alguns autores já mostraram que a ativação *in vivo* de linfócitos NK T murinos com α -

Galactosilceramida induz a produção de IL 4 por estes linfócitos e leva à expressão de marcadores de ativação como CD69, B7-2 e I-A^b em linfócitos B (Kitamura *et al*, 2000). Em humanos, a ativação de linfócitos NK T *in vitro* com α -Galactosilceramida induz a produção de IL 4 e IL 13 que estimulam a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos IgG1 e IgM total (Galli *et al*, 2003).

Ao compararmos o número de linfócitos B recém ativados no LnM dos camundongos do grupo Eh-WT com o grupo CTRL-WT, foi verificado o aumento significativo nos camundongos infectados com *E. histolytica*. Os linfócitos B, além de participarem na apresentação de antígenos via MHC e CD1d, também atuam na imunidade contra *E. histolytica* através da produção de IgA e IgG. A resposta humoral contra a *E. histolytica* na colite amebiana pode atuar tanto local como sistemicamente, dependendo do nível de invasão intestinal e extra-intestinal causada pelo protozoário (Carrero *et al*, 2007). O aumento significativo do número de linfócitos B recém ativados no LnM do grupo Eh-WT sugere a ativação da imunidade humoral e sua provável participação na resistência contra os trofozoítos, apesar do tempo de infecção deste estudo não permitir uma análise mais detalhada. A capacidade do LnM de drenar diretamente a linfa vinda do intestino onde esta o foco inflamatório também poderia favorecer a chegada de antígenos e a ativação dos linfócitos B.

Ao contrário do observado no LnM, houve redução da frequência de linfócitos B recém ativados no baço dos animais do grupo Eh-WT quando comparada com os grupos CTRL-CD1^{-/-}, Eh-CD1^{-/-} e CTRL-WT. Os linfócitos B parecem participar da imunidade à *E. histolytica*. Assim, pode estar ocorrendo o recrutamento de linfócitos B recém ativados do baço para o LnM ou outros órgãos onde seriam mais expostos a antígenos provenientes do local da inflamação e ativados para a produção de IgA e IgG. Essa migração explicaria a redução na frequência dessas células no baço.

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 do grupo Eh-CD1d^{-/-} quando comparado com os camundongos do grupo Eh-WT. 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). Neste trabalho, os autores mostraram que a colonização do intestino por ambas as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas foi maior em camundongos C57BL/6CD1^{-/-}.

A molécula CD1d é conhecida pela sua capacidade de apresentar antígenos glicolipídicos para os linfócitos NK T (Van Rijn *et al*, 2004). Assim, células restritas a CD1d poderiam responder à infecção pelo reconhecimento de lípidos e carboidratos antigênicos de diferentes patógenos (Schofield *et al*, 1999; Amprey *et al*, 2004). Através da técnica de imuno-histoquímica, foram identificados linfócitos NK1.1⁺ em todos os grupos de camundongos, caracterizados pela presença de núcleo pequeno e esférico, com citoplasma frequentemente bem evidente nos camundongos dos grupos CTRL-WT e CTRL-CD1^{-/-}. Os linfócitos NK1.1⁺ foram encontrados predominantemente na lâmina própria e, mais raramente, na submucosa. Já nos animais dos grupos Eh-WT e Eh-CD1^{-/-}, foram observados com maior frequência tanto na lâmina própria quanto na submucosa. Tal observação pode ser atribuída a resposta imune contra os trofozoítos presentes na parede cecal, que desencadeiam a migração de neutrófilos e outras células inflamatórias para a submucosa e a lâmina própria. Durante a evolução da amebíase, os trofozoítos de *E. histolytica* movimentam-se pela submucosa, ampliando a zona de necrose e originando a clássica lesão colônica amebiana conhecida como "úlceras em forma de frasco ou botão de camisa" (Prathap; Gilman, 1970). A maior frequência de linfócitos NK1.1⁺ na submucosa e na lâmina própria dos camundongos do grupo Eh-WT, aliado ao menor número de trofozoítos também observado nestes animais quando comparado com o seu controle, sugere que tais linfócitos possam estar atuando na resposta a infecção intestinal amebiana. Tal hipótese é reforçada pela observação de que os camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-} apresentaram reduzido número de linfócitos NK1.1⁺ e elevado parasitismo tecidual.

A menor quantidade de linfócitos NK1.1⁺ no ceco dos camundongos dos grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} era esperada, uma vez que os camundongos duplamente negativos para CD1d não possuem linfócitos NK T, restritos a apresentação de antígenos via CD1d (Smiley *et al*, 2005).

Sabe-se que a imunidade inata, como a constituída pelas barreiras epiteliais 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 microrganismos.

No grupo de camundongos selvagens inoculados com *E. histolytica*, a análise histopatológica mostrou que a maior parte da mucosa cecal era mais espessa, com criptas alongadas e, aparentemente, com maior produção de muco em relação aos camundongos C57BL/6CD1^{-/-} inoculados com *E. histolytica*, as quais apresentavam uma mucosa delgada e com criptas mais curtas. Diante de tais observações e da ausência de publicações sobre o ceco normal de camundongos C57BL/6CD1^{-/-}, utilizamos a coloração PAS para avaliar prováveis diferenças na expressão de polissacarídeos sulfatados, carboxilados e de glicoproteínas que constituem o muco produzido pelas células caliciformes e também para mensurar a área de mucosa. A análise quantitativa da área de mucosa, bem como da área PAS⁺, confirmou o achado histopatológico e contribuiu para mostrarmos que a área de mucosa e de muco dos camundongos do grupo CTRL-WT foram significativamente maiores do que as observadas nos camundongos CTRL-CD1^{-/-}.

É possível que a barreira epitelial mucosa, com sua espessura e produção de muco em quantidades normais, tenha colaborado para menores níveis de lesão e parasitismo nos camundongos do grupo Eh-WT. Já nos camundongos C57BL/6CD1^{-/-} infectados, a deficiência destes elementos que em condições normais atuam limitando a agressão da infecção em suas fases iniciais, pode ter favorecido parcialmente a maior frequência de úlceras cecais e o maior número de trofozoítos. Alguns estudos corroboram os nossos achados por mostrarem que, em diferentes linhagens de camundongos, a resistência contra a *E. histolytica* é conferida nos primeiros dias após a infecção, através da imunidade inata e independente de linfócitos T (Asgharpour *et al*, 2005).

Ao observarmos que os camundongos C57BL/6WT tinham uma área corada pelo PAS maior em relação aos camundongos C57BL/6CD1^{-/-},

decidimos avaliar a expressão imuno-histoquímica da mucina MUC-2 na mucosa cecal de todos os grupos de animais. Estudos *in vitro* utilizando células de adenocarcinoma de intestino grosso, mostraram que os trofozoítos de *E. histolytica* secretam uma família de CP's capazes de perturbar a produção de MUC-2, que é o principal componente do muco colônico humano (Moncada *et al*, 2003). Nos camundongos de ambos os grupos CTRL-CD1^{-/-} e Eh-CD1^{-/-} foi verificada redução significativa da área de marcação para MUC-2 em relação aos grupos CTRL-WT e Eh-WT. Tal resultado era esperado, pois MUC-2 é a principal mucina presente no muco intestinal e a análise quantitativa de muco corado pelo PAS demonstrou que os camundongos C57BL/6CD1^{-/-} possuem uma menor área de mucosa e de muco que os camundongos C57BL/6WT.

Alguns estudos demonstraram que a ativação de linfócitos NK T murinos isolados do timo, baço, medula óssea e fígado, sofrem aumento de sua atividade citotóxica e produzem citocinas tanto do tipo Th1, como o IFN- γ e o TNF- α , quanto do tipo Th2, como IL 4, IL 10 e IL 13 (Bendelac *et al*, 1992; Bendelac; Schwartz, 1991). Camundongos deficientes em linfócitos NK T ativados podem apresentar redução significativa na produção de citocinas, incluindo IL 10. Já foi verificado que camundongos deficientes em CD1d possuem níveis moderadamente baixos de mRNA para IL 10 (Smiley *et al*, 2005). Foi demonstrado que camundongos deficientes em IL 10 apresentam reduzida síntese de MUC-2 e, com isso, uma menor barreira de defesa entre os trofozoítos e as células intestinais do hospedeiro (Hamano *et al*, 2006). Nos animais inoculados com *E. histolytica* foi observada correlação positiva entre a área de MUC-2⁺ e o número de linfócitos NK1.1⁺, demonstrando que a redução do número de linfócitos NK T também reduziu a expressão de MUC-2⁺. A correlação negativa encontrada entre a área de MUC-2 e a extensão de necrose nos animais infectados demonstra que esta mucina é importante mecanismo de imunidade inata contra a *E. histolytica*.

Corroborando com a hipótese acima discutida, nos camundongos do grupo Eh-WT foi observada uma área positiva de MUC-2 significativamente superior a encontrada nos camundongos do grupo CTRL-WT. É possível que este aumento tenha ocorrido em resposta à infecção pela *E. histolytica*, e do consequente processo inflamatório desencadeado. As células do epitélio intestinal agredidas pelos produtos amebianos, tais como amebaporos e

cisteína proteinases, são estimuladas a produzirem grande quantidade de mediadores químicos da inflamação, incluindo a IL 8, IL 1, GMCSF, TNF- α e ciclooxigenase (Stanley; Reed, 2001). Assim, nos camundongos do grupo Eh-WT, a correlação negativa entre a área MUC-2 e a extensão de necrose sugere que a maior área de MUC-2 pode ter favorecido a menor frequência de lesões, reforçando as observações de outros autores sobre o papel protetor desta mucina na colite amebiana (Hamano *et al*, 2006).

Os resultados mostraram que a deficiência de linfócitos NK1.1⁺ nos camundongos do grupo Eh-CD1^{-/-} correlacionou-se com a menor produção de muco, especialmente de MUC-2, ambas reduzindo a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção e, conseqüentemente, levando à colite amebiana significativamente mais grave. Além disso, a atuação dos linfócitos NK T e a presença de uma mucosa normal para responder à infecção nos camundongos selvagens, demonstrou a importância destes dois mecanismos da imunidade inata no controle da infecção amebiana em suas fases iniciais (Espinosa-Cantellano; Martínez-Palomo, 2000).

7. CONCLUSÃO

7.1 A deficiência da molécula CD1 favorece o surgimento de colite experimental amebiana grave.

7.2 A mucosa cecal mais delgada e com menor produção de MUC-2 em camundongos C57BL/6CD1^{-/-} favorece a infecção amebiana e o surgimento de lesões intestinais.

7.3 A molécula CD1 está envolvida na resistência contra os trofozoítos de *Entamoeba histolytica*, possivelmente pela apresentação de antígenos para linfócitos NK T e pela estimulação à produção de MUC-2.

8. ABSTRACT

Entamoeba histolytica is a protozoan that causes amoebiasis, disease that produce around of 50 millions of cases and 100 thousands of deaths per year all over the world. Recent studies demonstrated that Natural Killer T lymphocytes (NK T) constitute an important barrier against the development of amoebae hepatic abscesses in its initial stages. The action of lymphocytes in the protection of invasive infection is still a controversy issue and has to be better evaluated. In this context, NK T lymphocytes are especially attractive due to the scarce relevance of studies in the area. C57BL/6 wild-type and C57BL/6CD1^{-/-} mice were inoculated with *E. histolytica* intracecal and sacrificed 48 hours after infection to collect spleen, cecal lymph nodes(LC) and caecum. Cells suspensions of spleen and from LC were analyzed by flow cytometry using staining for NKT+, CD4+,CD8+ and CD19+CD69+. The caecum was used for quantitative analyses of lesions, trophozoites, NK T lymphocytes and MUC-2 trough immune-histochemistry reaction. Quantitative analyses of LC NK T lymphocytes frequency showed significant reduction in CTRL-CD1^{-/-} and Eh-CD1^{-/-} groups when compared with Eh-WT and CTRL-WT. We also noted a considerable reduction in the frequency of CD19+CD69+ and CD8+CD69+ in the LC from CTRL-CD1^{-/-} and Eh-CD1^{-/-} groups when compared with Eh-WT and CTRL-WT. In addition, there was a noteworthy increase in the frequency of B cells from LC in Eh-WT group in comparison to CTRL-WT but reduction in spleen of Eh-WT group when compared with CTRL-CD1^{-/-}, Eh-CD1^{-/-} and CTRL-WT. The extension of necrotic mucosal as well as number of trophozoites was higher in Eh-CD1^{-/-} compared to Eh-WT mice. The quantitative analyses showed that NK T lymphocytes were significantly less frequent in mice from CTRL-CD1^{-/-} and Eh-CD1^{-/-} groups. We also observed a significant increase in the number of NK T lymphocytes in Eh-WT mice in relation to the other groups. The mucosal area of CTRL-WT group was bigger than that observed in CTRL-CD1^{-/-}. In mice from both groups, CTRL-CD1^{-/-} and Eh-CD1^{-/-}, was verified a reduction in the stained area for MUC-2 in comparison with CTRL-WT and Eh-WT. However, in Eh-WT mice the area stained for MUC-2 was significantly superior to that observed in CTRL-WT mice. Our results showed that NK T lymphocytes are efficient in the resistance against *Entamoeba histolytica* trophozoites and that its deficiency favors the appearance of severe amoebae experimental colitis. Moreover, the thinner cecal mucosa with smaller production of MUC-2 in C57BL/6CD1^{-/-} mice favors amoebae infection and intestinal lesions emergence. NK T lymphocytes are related with production of MUC-2 and the linked action of these two mechanisms of innate immunity act in the resistance against amoebae infection in its initial stage.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; 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.; SARGEANT.; WILLIAMS, P.; *Entamoeba histolytica* as a commensal intestinal parasite in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 315: 353-356, 1986.

ALI, I.K.; HOSSAIN, M.B.; ROY, S.; AYEK-KUMI, P.F.; PETRI JR, W.A.; HAQUE, R.; CLARK, C.G.; *Entamoeba moshkovskii* infections in children, Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 580-584, 2003.

AMPREY, J.L.; IM, J.S.; URCO,S. J.T.; MURRAY, H.W.; ILLARIONOV, P. A.; BESRA, G.S.; PORCELLI, S.A.; SPATH, G. F.; A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 200: 895-904, 2004.

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.

ARASE, H.; ARASE, N.; OGASAWARA, K.; GOOD, R.A.; ONOE, K.; An NK1.1⁺ CD4⁺8⁻ single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T cell antigen receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6506-10, 1992.

ASGHARPOUR, A.; GILCHIRIST, 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.

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

BECKMAN, E.M.; S.A. PORCELLI, C.T.; MORITA, S.M.; BEHAR, S.T.; FURLONG, M.B.; BRENNER.; Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted $\alpha\beta$ +T cells. *Nature*. 372: 691, 1994.

BECKMAN, E.M.; A. MELIAN, S.M.; BEHAR, P.A.; SIELING, D.; CHATTERJEE, S.T.; FURLONG, R.; MATSUMOTO, J.P.; ROSAT, R.L. MODLIN.; S.A. PORCELLI.; CD1c restricts responses of mycobacteria-specific T cells: evidence for antigen presentation by a second member of the human CD1 family. *J. Immunol.* 157: 2795, 1996.

BENDELAC, A.; SCHWARTZ, R.H.; CD4C and CD8C T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature*. 353: 68-71,1991.

BENDELAC, A.; KILLEEN, N.; LITTMAN, D.; SCHWARTZ, R.H.; A subset of CD4⁺ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263: 78-1774, 1994.

BENDELAC, A.; MATZINGER, P.; SEDER, R.A.; PAUL, W.E.; SCHWARTZ, R.H.; Activation events during thymic selection. *J.Exp. Med.* 175: 42-731, 1992.

BENDELAC, A.; Positive selection of mouse NK1C T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp.Med.* 182: 96-2091, 1995.

BENDELAC, A.O.; LANTZ, M.E.; QUIMBY, J.W.; YEWDELL, J.R.; BENNINK, R.R.; BRUTKIEWICZ. CD1 recognition by mouse NK1_ T lymphocytes. *Science* 268: 863-865, 1995.

BENDELAC, A.; RIVERA, M.N.; PARK, S.H.; ROARK, J.H.; Mouse CD1-specific NK1 t cells: development, specificity, an function. *Annu Rev Immunol.*15: 535-562, 1997.

BLEICHER, P.A.; BALK, S.P.; HAGEN, S.J.; BLUMBERG, R.S.; FLOTTE, T.J.; TERHORST, C.; Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium. *Science* 250: 679-82, 1990.

BLUMBERG, R.S.; TERHORST, C.; BLEICHER, P.; MCDERMOTT, F.V.; ALLAN, C.H.; LANDAU, S.B.; TRIER, J.S.; BALK, S.P.; Expression of a non-polymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 147: 24-2518,1991.

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.

BORG, N.A.; WUN, K.S.; KJER-NIELSEN, L.; WILCE, M.C.; PELLICCI, D.G.; KOH, R.; BESRA, G.S.; BHARADWAJ, M.; GODFREY, D.I.; MCCLUSKEY, J.; ROSSJOHN, J.; CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 448: 44-49, 2007.

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.

BRADBURY, A.; CALABI, F.; MILSTEIN, C.; Expression of CD1in the mouse thymus.*Eur. J. Immunol.* 20: 183-36, 1990.

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.

BRIGL, M.; BRY, L.; KENT, S.C.; GUMPERZ, J.E.; BRENNER, M.B.; Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. Nat Immun. 4: 1230-1237, 2003.

BRIGL, M.; BRENNER, M.B.; CD1: antigen presentation and T cell function. Annu. Rev. Immunol. 22: 817-890, 2004.

BROSSAY, L. D.; JULLIEN, S.; CARDELL, B.C.; SYDORA, N.; BURDIN, R. L.; MODLIN, M.; KRONENBERG.; Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. J. Immunol. 159: 1216-1224, 1997.

BRUMPT, E.; Étude 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. 78:336-340,1992.

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.

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

CAMPBELL, D.; CHADEE, K.; Interleukin (IL)-2, IL4, and tumor necrosis factor- α responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. J. Infect. Dis. Chicago.175: 1176-1183, 1997.

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

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

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.

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

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

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.

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.

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. Immunol.* 177: 1208-13, 2006.

HANKE, T.; MITNACHT, R.; BOYD, R.; HUNIG, T.; Induction of interleukin 2 receptor β chain expression by self recognition in the thymus. *J. Exp. Med.* 180: 36-1629, 1994.

HAQUE, R.; NEVILLE, L.M.; HAHN, P.; PETRI JR, W.A.; 1995. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2558-2561, 1995.

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.; ALI, I.K.; AKTHER, S.; PETRI JR, W.A.; Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J. Clin. Microbiol. 36: 449-452, 1998.

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.; HOUPPT, E.; PETRI JR, W.A.; Amebiasis. N Engl J Med. 348:156-1573, 2003.

HOUPPT, 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.

ICHIMIYA, S.; KIKUCHI, K.; MATSUURA, A.; Structural analysis of the rat homologue of CD1. Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by T cells. J. Immunol. 153: 1112-23,1994.

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.

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.

KHAIRNAR, K.; PARIJA, S.C.; A novel nested multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay for differential detection of *Entamoeba histolytica*. *E. moshkovskii* and *E. dispar* DNA in stool samples. *BMC Microbiol.* 7: 47, 2007.

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

KRONENBERG, M.; Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol.* 23: 877-900, 2007.

LACASSE, J.; MARTIN, L.H.; Detection of CD1mRNA in Paneth cells of the mouse intestine by in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 1527-34, 1992.

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.

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.

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.

LOTTER, H.; JACOBS, T.; GAWORSKI, I.; TANNICH, E.; Sexual dimorphism in the control of amebic liver abscess in a mouse model of disease. *Infect Immun* 74: 118-124, 2006.

LOTTER, H.; GONZÁLEZ-ROLDÁN N.; LINDNER B.; WINAU F.; ISIBASI A.; MORENO-LAFONT M.; ULMER. J A.; HOLST O.; TANNICH E.; JACOBS T. Natural Killer T Cells Activated by a Lipopeptidophosphoglycan from *Entamoeba histolytica* Are Critically Important To Control Amebic Liver Abscess. *PLoS Pathog.* 5: 1-11,2009

MACDONALD, H.R.; NK1.1 + T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *J Exp Med.* 182: 633-638, 1995.

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.

MEEROVITCH, E.; CHADEE K.; In vivo models for pathogenicity in amebiasis. In: Ravidin, J.I, ed. *Amebiasis. Human Infection by Entamoeba histolytica.* New York: John Wiley e Sons. 177-190, 1998.

MICHEL, M.L.; KELLER, A.C.; PAGET, C.; FUJIO, M.; TROTTEIN, F.; SAVAGE, P.B.; WONG, C.H.; SCHNEIDER, E.; DY, M.; LEITE-DE-MORAES, M.C.; Identification of an IL-17-producing NK11(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Méd.* 204: 995-1001, 2007.

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.; Identification of significant variation in the composition of lipophosphoglycan-like molecules of *E. histolytica* and *E. dispar*. *J Eukaryot Microbiol.* 45: 9-12, 1998.

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.

NIEUWENHUIS, E.E.; MATSUMOTO, T.; LINDENBERGH, D.; WILLEMSEN, 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.

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

OMS, 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.

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.

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.

PRATHAP, K. M.D.; GILMAN, R. M.D.; The Histopathology of Acute Intestinal Amebiasis: A Rectal Biopsy Study. *American Journal of Pathology*. 60: 229-244, 1970.

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

QVARNSTROM, Y.; JAMES, C.; XAYAVONG, M.; HOLLOWAY, B.P.; VISVESVARA, G.S.; SRIRAM, R.; DA SILVA, A.J.; Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J. Clin. Microbiol*. 43: 5491-5497, 2005.

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.

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.

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.

ROY, S.; KABIR, M.; MONDAL, D.; ALI, I.K.; PETRI JR, W.A.; HAQUE, R.; Real time PCR assay for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. J. Clin. Microbiol. 43: 2168-2172, 2005.

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.

SALLES, J.M.; SALLES, M.J.; MORAES, A.L.; SILVA, M.C.; Invasive amebiasis: an update on diagnosis and management. Anti Infect Ther. Oct. 5: 893-901,2007.

SCHOFIELD, L.; MCCONVILLE M.J.; HANSEN, D.; CAMPBELL, A.S.; FRASER-REID, B.; GRUSBY, M.J.; TACHADO, S.D.; CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 283: 225-229,1999.

SEYDEL, K.B.; ZHANG, T.; STANLEY, J.R.; S.L.; Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic 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 amebic infection of human intestine. Gastroenterology 115: 1446-1453, 1998.

SELING, P.A., CHATTERJEE, D. ; PORCELLI, S.A.; PRIGOZY, T.I.; MAZZACCARO, R.J.; Soriano, T.; Bloom, B.R.; Brenner, M.B.; Kronenberg, M. ; Brennan, P.J.; Modlin, R.I.; CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan.*Science*. 269: 227, 1995.

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.

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.

SMILEY, S.T.; LANTHIER, P.A.; COUPER, K.N.; SZABA, F.M.; BOYSON, J.E.; CHEN, W.; JOHNSON, L.L.; Exacerbated Susceptibility to Infection-Stimulated Immunopathology in CD1d-Deficient Mice. *The Journal of Immunology*. 174: 7904-7911, 2005.

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. *The Lancet.*361:1025-1034, 2003.

STANLEY JR, S.L.; Pathophysiology of amoebiasis. *Trends in Parasitology.* 17: 280-285, 2001.

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.

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

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

TUPIN, E.; KINJO, Y.; KRONENBERG, M.; The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 5: 405-417, 2007.

UEDA, N.; KUKI, H.; KAMIMURA, D.; SAWA, S.; SEINO, K.; TASHIRO, T.; FUSHUKU, K.; TANIGUCHI, M.; HIRANO, T.; MURAKAMI, M.; CD1d-restricted NKT cell activation enhanced homeostatic proliferation of CD8⁺ T cells in a manner dependent on IL-4. *International Immunology.* 18: 1397-1404, 2006.

VAN RIJN, I.D.C.; YOUNG, J.S.; IM, S.B.; LEVERY, P.A.; ILLARIONOV, G. S.; BESRA, S.A.; PORCELLI, J.; GUMPERZ, T.Y.; CHENG, D.B.; MOODY.; CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13578-13583, 2004.

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.

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.

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.

WINGENDER, G.; KRONENBERG, M.; Role of NKT cells in the digestive system. IV. The role of canonical natural killer T cells in mucosal immunity and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 294: 1-8, 2005.

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.

YOSHIMOTO, T.; BENDELAC, A.; WATSON, C.; HU-LI, J.; PAUL, W.E.; Role of NK1.1C T cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science*. 270: 47-1845, 1995.

10. ANEXOS

10.1 Figuras do modelo experimental

Figura 1: Ceco de Camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6CD1^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Grupo CTRL-WT: ceco de aspecto normal; (b) Grupo CTRL-CD1^{-/-}: ceco com aspecto normal; (c) Grupo Eh-WT: ceco com hiperemia; (d) Aspecto da mucosa cecal da figura 1c após secção longitudinal, mostrando algumas regiões hiperêmicas; (e) Grupo Eh-CD1^{-/-}: úlcera (setas delimitam a úlcera) de coloração esbranquiçada, visível na superfície serosa hiperêmica; (f) Aspecto da mucosa cecal da figura 1e após secção longitudinal, permitindo a visualização da úlcera (seta) na superfície mucosa com áreas de hiperemia.



Figura 2: Fotomicrografia de ceco de Camundongos C57BL/6 WT e C57BL/6CD1^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Grupo CTRL-WT: camadas mucosa, submucosa e muscular com aspecto normal. Ácido Periódico de Schiff. Barra = 100 µm; (b) Grupo CTRL- CD1^{-/-}: ceco mostrando delgada camada mucosa. PAS. Barra = 100 µm; (c) Grupo Eh-WT: ceco com erosão (setas) da camada mucosa. H&E. Barra = 100 µm; (d) Maior aumento da figura anterior mostrando destruição parcial (*) da camada mucosa e discreto infiltrado inflamatório na submucosa. H&E. Barra = 30 µm; (e) Grupo Eh-CD1^{-/-}: necrose (N) de grande extensão em todas as camadas da parede cecal. Infiltrado inflamatório na submucosa (*). H&E. Barra = 100 µm; (f) Maior aumento da figura anterior mostrando necrose (N) e grande número de trofozoítos (cabeças de seta). H&E. Barra = 30 µm. Mucosa (M), submucosa (S), muscular (Mu) e Serosa (Se).

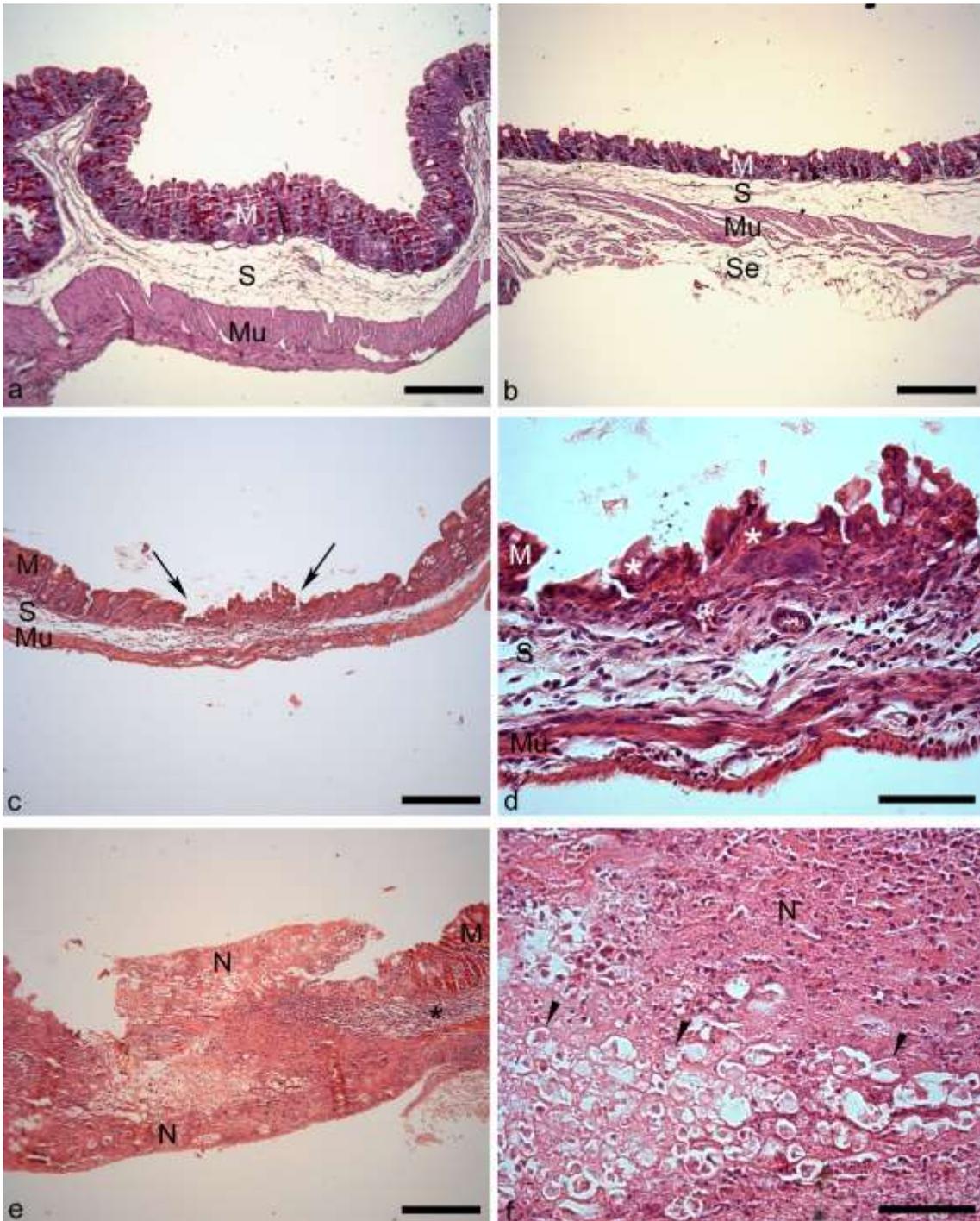


Figura 3: Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Controle positivo de reação imuno-histoquímica para trofozoítos. Parênquima hepático de hamster com grande quantidade de trofozoítos (cabeças de seta). Necrose (N); (b) Grupo Eh-WT: trofozoítos positivos (cabeças de seta) em erosão delimitada por mucosa cecal bem preservada. Necrose (N) na submucosa; (c) Grupo Eh-CD1^{-/-}: ampla região de necrose (N) com grande número de trofozoítos positivos (cabeças de setas) e infiltrado inflamatório (*); (d) Eh-CD1^{-/-}: trofozoítos positivos (cabeças de seta) na camada serosa. Necrose (N) na camada submucosa e infiltrado inflamatório (*) nas camadas muscular e serosa. Barra = 30 µm. Mucosa (M), submucosa (S), muscular (Mu) e Serosa (Se).

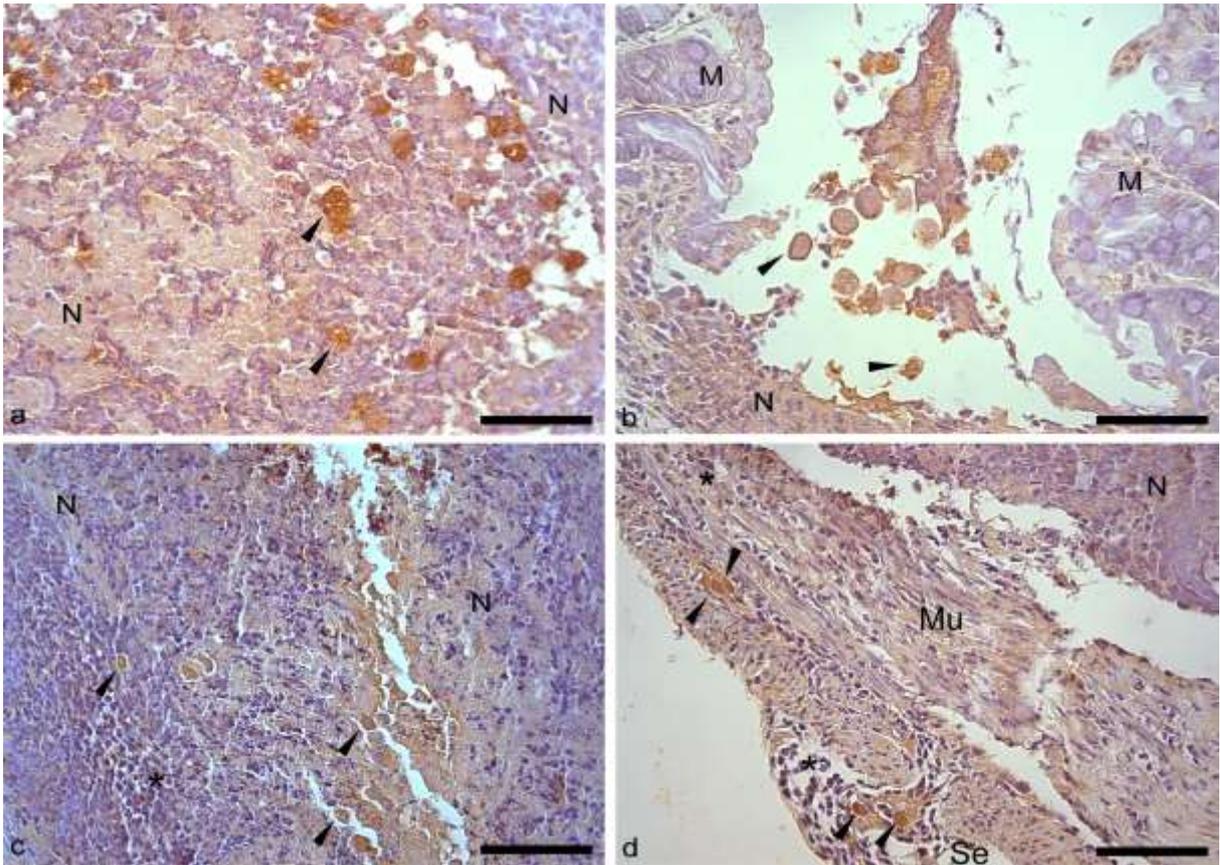


Figura 4: Reação imuno-histoquímica para linfócitos NK1.1⁺ no ceco de C57BL/6 WT e C57BL/6CD1^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Grupo CTRL-WT: linfócitos NK1.1⁺ com coloração marrom citoplasmática, indicando marcação positiva (cabeças de seta); (b) Grupo Eh-WT: notar a presença de varios linfócitos NK1.1⁺ positivos nas camadas mucosa, submucosa, muscular e serosa. Necrose (N); (c) Grupo Eh-WT: grande número de linfócitos NK1.1⁺ positivos nas camadas mucosa e submucosa íntegras; (d) Grupo CTRL-CD1^{-/-}: escassos linfócitos NK1.1⁺ positivos (cabeças de seta) na camada mucosa; (e) Grupo Eh-CD1^{-/-}: linfócito NK1.1⁺ positivo (cabeça de seta) em meio a infiltrado inflamatório na submucosa. Necrose (N); (f) Grupo Eh-CD1^{-/-}: área de mucosa preservada com escassos linfócitos NK1.1⁺ positivos (cabeças de seta). Infiltrado inflamatório (*) na camada submucosa. Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Barra = 30 µm. Mucosa (M), submucosa (S), muscular (Mu) e Serosa (Se).

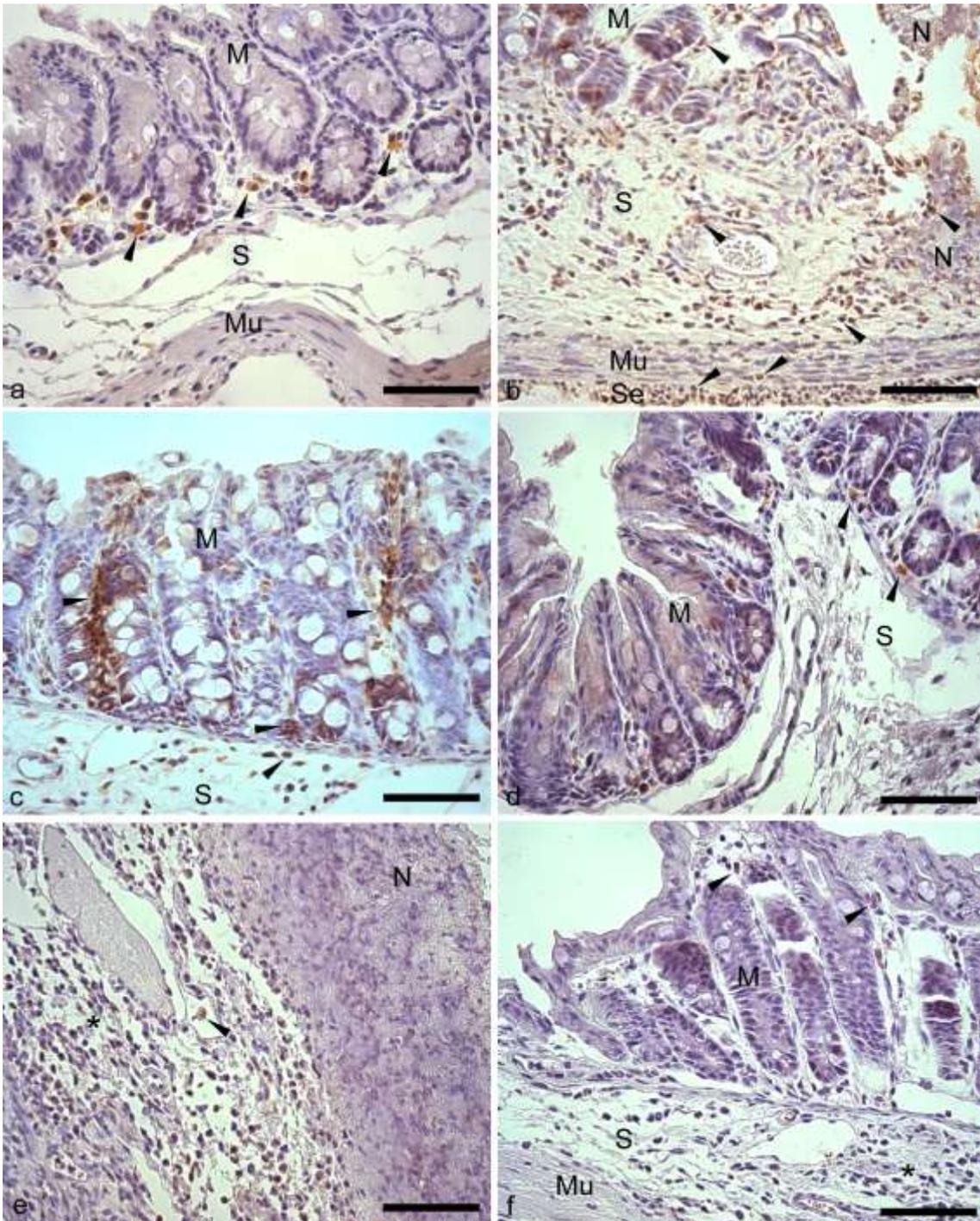
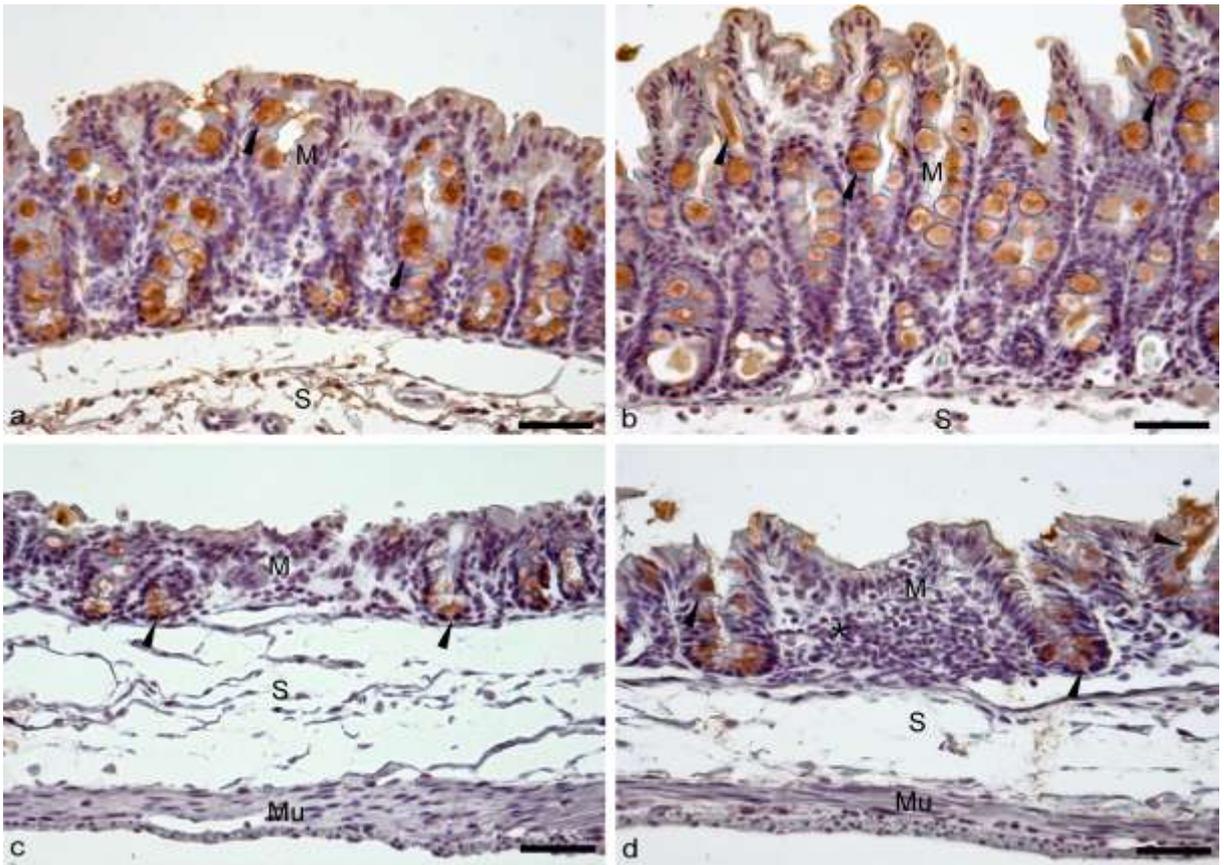


Figura 5: Reação imuno-histoquímica para a mucina MUC-2 no ceco de C57BL/6 WT e C57BL/6CD1^{-/-} controles e inoculados com trofozoítos de *Entamoeba histolytica*. (a) Grupo CTRL-WT: notar a presença de marcação positiva para MUC-2 (cabeças de seta) na camada mucosa devido a presença de coloração marrom; (b) Grupo Eh-WT: aumento da área de marcação MUC-2⁺ (cabeças de seta) na camada mucosa comparado com a figura 5a; (c) Grupo CTRL-CD1^{-/-}: pequenas áreas de marcação positiva para MUC-2 (cabeças de seta); (d) Grupo Eh-CD1^{-/-}: aumento da marcação MUC-2⁺ (cabeças de seta) na camada mucosa em relação a figura 5c; infiltrado inflamatório (*). Contra-coloração com hematoxilina de Harris. Barra = 20 µm. Mucosa (M), submucosa (S), muscular (Mu) e Serosa (Se).





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 266/2008**, relativo ao projeto intitulado "*Análise da resposta imunológica e das lesões intestinais em camundongos BALB/c e CD1 inoculados com Entamoeba histolytica*", que tem como responsável(is) **Marcelo Vidigal Caliar**, 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 **4/ 03/2009**.

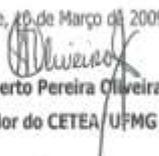
Este certificado expira-se em **4/ 03/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 266/2008**, related to the project entitled "*Immune response and intestinal lesions analysis in BALB/c and CD1 mice inoculated with Entamoeba histolytica*", under the supervisors of **Marcelo Vidigal Caliar**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the *Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)*, and was approved in **March 4, 2009**.

This certificate expires in **March 4, 2014**.

Belo Horizonte, 10 de Março de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador 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) 3489-4516 - Fax: (31) 3493-4592

10.3 Artigo Submetido

Susceptibility of C57BL/6CD1^{-/-} mice to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to NKT lymphocytes reduction

Susceptibility of C57BL/6CD1^{-/-} mice to *Entamoeba histolytica* intestinal infection is related to NKT lymphocytes reduction

Fabrcio MS Oliveira^{1,2}, Bernardo C Horta³, Luana O Prata^{1,2}, Andrezza F Santiago³, Andrca C Alves³, Ana MC Faria³, Maria A Gomes⁴, Marcelo V Caliar²

Short title: **Susceptibility of C57BL/6CD1^{-/-} mice to *E. histolytica* infection**

Author details

¹ Programa de P3s-Graduac3o em Patologia, Instituto de Ci4ncias Biol3gicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Ant4nio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

² Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ci4ncias Biol3gicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Ant4nio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Departamento de Bioqu4mica e Imnologia, Instituto de Ci4ncias Biol3gicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Ant4nio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

⁴ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ci4ncias Biol3gicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Ant4nio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil