

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Aspectos gerais da Amebíase:	11
	A palavra Amebíase costuma ser usada para designar a presença de <i>Entamoeba histolytica</i> no organismo de seu hospedeiro, homem e alguns primatas, com ou sem manifestações clínicas (STANLEY, 2003)	11
1.2	Mecanismos de patogenicidade	14
1.2.1	Adesinas:	15
1.2.2	Amebaporos:	16
1.2.3	Cisteína proteinases:	16
1.2.4	Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada	17
1.2.5	Proteína rica em serina (SREHP) e Peroxiredoxinas	17
1.3	Sistema complemento	18
1.4	Participação da inflamação	20
1.5	<i>Entamoeba</i> dispar:	21
1.6	A introdução de diferentes cultivos de ameba e de diferentes modelos animais	22
1.7	Justificativas:	23
2	Objetivos	24
2.1	Objetivo geral:	24
2.2	Objetivos específicos:	24
3	Metodologia	25
3.1	Animais utilizados	25
3.2	Cepas de <i>Entamoeba</i> dispar e <i>Entamoeba histolytica</i>	25
3.3	Preparo do inóculo:	26
3.3.1	Cepas de cultivo misto:	26
3.3.2	Cepa de cultivo axênico:	27
3.4	Inoculação	27
3.5	Análise quantitativa das lesões e histopatologia	27
3.6	Reação imuno-histoquímica dos trofozoítos	28
3.7	Reação imuno-histoquímica para o componente C9	28
3.8	Indução de lesão cardíaca por reperfusão	29
3.9	Análise quantitativa da área de necrose	30
3.10	Análise quantitativa dos trofozoítos e da área de antígenos	30
3.11	Análise da deposição do componente C9	30
3.12	Análise do número estimado de trofozoítos C9(-)	31
3.13	Análise estatística:	31
4	Resultados	32
4.1	Análise macroscópica das lesões hepáticas	32
4.2	Análise histopatológica	32
4.2.1	Animais inoculados com a cepa Ehax	33
		33
4.2.2	Animais inoculados com a cepa Ehm	33
4.2.3	Animais inoculados com a cepa Edm1	33
		33
4.2.4	Animais inoculados com a cepa Edm2	34
4.3	Análise qualitativa das reações imuno-histoquímicas para trofozoítos e seus antígenos	34
4.3.1	Animais inoculados com a cepa Ehax	34
4.3.2	Animais inoculados com a cepa Ehm	34
4.3.3	Animais inoculados com a cepa Edm1	35
4.3.4	Animais inoculados com a cepa Edm2	35
		35
4.4	Análise qualitativa das reações imuno-histoquímicas para o componente C9 do complemento	35
4.4.1	Animais inoculados com a cepa Ehax	35
		35
4.4.2	Animais inoculados com a cepa Ehm	36
4.4.3	Animais inoculados com a cepa Edm1	36
		36
4.4.4	Animais inoculados com a cepa Edm2	36

.....	36
4.5 Figuras.....	37
4.6 Análise quantitativa das áreas de lesão.....	44
4.7 Análise quantitativa dos trofozoítos	45
4.8 Análise quantitativa da área de antígenos.....	47
4.9 Análise quantitativa do número de trofozoítos C9(+)	48
4.10 Análise quantitativa do número de trofozoítos C9(-).....	50
4.11 Análise comparativa do percentual de trofozoítos C9(+) e C9(-)	51
4.12 Análise de correlação.....	53
5 Discussão	57
6 Conclusões.....	66
Referências.....	67
ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Amebíase:

A palavra Amebíase costuma ser usada para designar a presença de *Entamoeba histolytica* no organismo de seu hospedeiro, homem e alguns primatas, com ou sem manifestações clínicas (STANLEY, 2003).

De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), a Amebíase é a segunda causa de morte por protozoário (OMS, 1997). A simples presença da *E. histolytica* na luz intestinal, caracterizada pela eliminação de cistos, é freqüente em todo o mundo, variando sua incidência anual, segundo as regiões. Cinquenta milhões de pessoas são infectadas e cinquenta mil mortes são estimadas a cada ano devido a Amebíase (ACKERS; MIRELMAN, 2005), seja por colite amebiana ou abscesso hepático amebiano (HAQUE *et al.*, 2000; JACKSON, 1998). O abscesso hepático amebiano é a forma mais freqüente de Amebíase extra-intestinal (VELAZQUEZ *et al.*, 1998).

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

A *E. histolytica* foi descrita pela primeira vez há mais de 130 anos na Rússia por Losch (1875, citado por JACKSON, 1998) e denominada formalmente em 1903 por Schaudinn (1903, citado por CLARK, 1998). Na tentativa de explicar a grande prevalência de indivíduos infectados assintomáticos, foi proposta por Brumpt (1925, citado por WALSH, 1986) a Teoria Dualista que afirmava a existência de duas amebas. Embora morfologicamente idênticas estas amebas seriam biologicamente distintas. Considerou-se, no entanto, que apenas

a *E. histolytica* deveria ser capaz de penetrar nos tecidos e produzir Amebíase invasiva. Posteriormente, através da eletroforese de isoenzimas, a *E. histolytica* foi separada em dois grupos distintos: patogênica e não-patogênica como afirmou Brumpt (SARGEAUNT; WILLIAMS, 1978). A espécie não-patogênica poderia então realmente explicar a prevalência de assintomáticos, em torno de 90%, dos infectados no mundo (WALSH, 1986). A prova definitiva que estes dois grupos representavam espécies distintas foi conseguida através da análise do DNA (TANNICH *et al.*, 1989), sendo a nova espécie de ameba denominada *Entamoeba dispar*, como sugerido por Brumpt em 1925 (DIAMOND; CLARK, 1993). O perfil de isoenzimas, as diferenças nas seqüências gênicas e a utilização de anticorpos monoclonais reforçaram a existência das duas espécies (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1997) que foram oficialmente reconhecidas pela OMS (OMS, 1997). Hoje se estima que as duas espécies infectem cerca de 12% da população mundial, sendo a infecção pela comensal, *E. dispar*, muito mais comum podendo a *E. histolytica* representar 1% deste universo (QUE; REED, 2000).

O diagnóstico mais comum da Amebíase intestinal é pela identificação dos cistos ou trofozoítos móveis em amostras simples de fezes, não fazendo distinção entre as espécies (HAQUE *et al.*, 2003; TACHIBANA *et al.*, 2004). Para se distinguir as amebas e reduzir o uso desnecessário de agentes antiparasitários são necessários testes diagnósticos precisos (CLARK, 1998). Segundo a OMS, o tratamento com droga não é recomendado a menos que se tenha certeza da presença da *E. histolytica* devido à possibilidade de se desenvolver resistência ao Metronidazol (CLARK, 1998). O tratamento com este fármaco permanece efetivo no combate à doença, mas as taxas de re-infecção são altas (CARRERO *et al.*, 2007). Apesar de ser um tratamento disponível, a morbidade e a mortalidade à Amebíase ainda persistem (LOTTER; TANNICH, 2005). Há relatos de pacientes que não respondem ao tratamento o que pode ser devido a uma resistência dos trofozoítos expostos a múltiplas drogas ou ao aparecimento de uma cepa resistente (ABD-ALLA *et al.*, 2006).

A Amebíase intestinal não-invasiva não produz invasão da mucosa intestinal e é assintomática. Os casos sintomáticos são os de Amebíase intestinal invasiva que apresenta diferentes quadros clínicos, sendo as formas mais freqüentes as colites disentéricas e não-disentéricas, podendo haver complicações inclusive com localizações extra-intestinais. A colite amebiana disentérica é caracterizada por diarreia aquosa ou sanguinolenta com dor abdominal e perda de peso (HUSTON, 2004). A colite se apresenta também com ulceração e inflamação severas a ponto de ser confundida com “Doença Intestinal Inflamatória Idiopática” (STANLEY, 2001).

No Brasil, indivíduos sintomáticos, apresentando a forma clínica de colite não-disentérica, são freqüentes em nosso país e apresentam sorologia geralmente negativa (SILVA *et al.*, 1997). Amebas isoladas desta forma clínica foram classificadas como *E. dispar* (GOMES *et al.*, 1997b). Portadores assintomáticos de *E. histolytica* e de *E. dispar* são freqüentemente encontrados no Brasil (GOMES *et al.*, 1997a), à exceção do norte do país onde a doença apresenta formas intestinal e extra-intestinal mais graves (GOMES *et al.*, 2000).

E. histolytica e *E. dispar* se apresentam em dois estágios morfológicos: o cisto, sua forma infectante e também de resistência, e o trofozoíto, forma vegetativa que constitui a forma invasiva da *E. histolytica*. O ciclo de vida é simples e a infecção se inicia pela ingestão de água ou alimento contaminados com cistos. Estes sobrevivem ao meio ácido estomacal e se desencistam na porção terminal do íleo onde passam para o estágio de trofozoíto. No intestino grosso, os trofozoítos passam a viver junto com a microbiota residente (MIRELMAN, 1987). A reprodução é por fissão binária e, em determinado momento, alguns se encistam no colón. A excreção destes cistos para o meio ambiente, completa o ciclo de vida da ameba. Os trofozoítos de *E. histolytica* que vivem no lúmen intestinal, ao prevalecerem condições favoráveis a sua patogenicidade, podem dar início à doença invasiva. 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 penetraram (QUE; REED, 1997). Esta invasão do epitélio intestinal é caracterizada por uma extensa degradação da matriz extracelular (MEC) através da ação das 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, 1984). Na medida em que progridem as ações necrosantes da mucosa e submucosa, as úlceras aumentam de diâmetro, tornando-se confluentes e de limites irregulares (HUSTON, 2004). As lesões encontram-se com maior freqüência no ceco, no sigmóide e no reto onde normalmente ocorre uma estase mais prolongada do conteúdo intestinal. Em raras ocasiões, aparecem no intestino grosso, os amebomas, caracterizados por uma massa pseudotumoral na parede intestinal com ou sem ulceração relacionada à resposta inflamatória e formação de tecido de granulação (AGREZ *et al.*, 2004). A invasão dos trofozoítos para os vasos da submucosa intestinal permite a disseminação hematogênica da ameba para outros órgãos resultando em amebíase extra-

intestinal, principalmente hepática (TSUTSUMI *et al.*, 1984). No entanto, não são bem conhecidos os fatores responsáveis pelo aparecimento da doença invasiva intestinal, bem como das formas extra-intestinais (BEKKER-MENDEZ *et al.*, 2006).

Quando o parasito se implanta no fígado, formam-se inicialmente lesões muito pequenas e múltiplas, sugerindo sua origem hematogênica. A união destas lesões origina focos de necrose extensos que se liquefazem, denominados “abscessos hepáticos amebianos”. Sabe-se que esta lesão hepática é 10 vezes mais comum em homens do que em mulheres e é rara em crianças (AMARAPURKAR *et al.*, 2003; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; HAQUE *et al.*, 2003). Estudos pioneiros de Lafleur (1891, citado por JACKSON, 1998) e Rogers (1922, citado por TSUTSUMI, 1984) demonstraram ser esta lesão resultado da invasão do fígado pelas amebas e não de infecção bacteriana, o que talvez torna inadequada a denominação “abscesso”, sendo possivelmente mais apropriado o termo necrose liquefativa. Na ausência de tratamento, a necrose hepática pode causar mortalidade por peritonite aguda além de aderências, redução da mobilidade do hemidiafragma direito e, por contigüidade, alcançar o pulmão direito. Pela via hematogênica os trofozoítos podem alcançar localizações pleuropulmonares, pericárdicas e cerebrais originando com mais frequência, uma lesão secundária após a necrose hepática amebiana (HAQUE *et al.*, 2003).

1.2 Mecanismos de patogenicidade

O progresso da infecção depende de fatores do parasito, como a virulência das cepas, e de fatores do hospedeiro, embora os fatores desencadeadores da resposta inflamatória à ameba sejam pouco conhecidos. Ambos os fatores com certeza alteram o risco e gravidade da doença (SHARMA *et al.*, 2005). Como exemplo, existem contrastes entre as lesões da forma intestinal da Amebíase e a forma hepática indicando uma diferença na atuação da ameba ou na resposta do hospedeiro nos dois órgãos (STANLEY, 2001).

A primeira barreira na prevenção da lesão de mucosa é o muco intestinal. Este 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 nativa. São as mucinas, altamente glicosiladas, os alvos da clivagem glicosídica pelo parasito (TSE; CHADEE, 1992; VARIYAM, 2006). Para ultrapassar as mucinas e movimentar-se pelo tecido, a *E. histolytica* necessita aderir e lisar a MEC. O contato dos trofozoítos com as

proteínas da MEC resulta em rearranjos da actina que facilitam a adesão e a invasão (LABRUYÈRE; GUILLÉN, 2006; STANLEY; REED, 2001). Sabe-se que motilidade e capacidade de aderir às células do hospedeiro são essenciais à patogênese deste parasito (TAVARES *et al.*, 2000; TAVARES *et al.*, 2005). A degradação de diferentes estruturas celulares e intercelulares do hospedeiro necessita da ação consecutiva ou simultânea de diferentes moléculas amebianas (LÓPEZ-VANCELL *et al.*, 2000). A *E. histolytica* produz uma variedade de moléculas dentre: adesinas, amebaporos e proteases as quais estão relacionadas à lise da mucosa colônica (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

1.2.1 Adesinas:

A adesão dos trofozoítos de *E. histolytica* ao epitélio intestinal é mediada por uma lectina específica para resíduos de galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNac) (MANN *et al.*, 1997; MANN, 2002). A lectina Gal/GalNac é uma molécula com seqüência e reatividade antigênica semelhante ao CD59 (BRAGA *et al.*, 1992). O CD59 é uma glicoproteína de membrana das células sanguíneas e do endotélio humano que atua como agente inibidor do complexo de ataque C5b-9. A lectina Gal/GalNac atua impedindo a destruição do trofozoíto pela ação do complemento conferindo resistência a este complexo. Esta resistência foi demonstrada através da interação *in vitro* desta lectina com componentes do complemento como o C8 e o C9. Neste estudo, a lectina purificada foi identificada como o componente da membrana plasmática amebiana que inibiu a formação do complexo C5b-9. A atividade anti-complemento da lectina Gal/GalNac também foi inibida por um anticorpo monoclonal anti-lectina amebiana (BRAGA *et al.*, 1992).

A lectina Gal/GalNac funciona como importante agente imunógeno e, como tal, estimula a produção de óxido nítrico (NO), citocinas como a interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos ativados (CAMPBELL, 2000; SÉGUIN, 1995; SÉGUIN, 1997). Sua subunidade pesada (170 kD) é um antígeno imunodominante reconhecido pelo soro de 90% dos pacientes com necrose hepática amebiana (PETRI *et al.*, 1997).

Há indícios de que esta molécula amebiana induziria a apoptose através da ativação da caspase 3, independente do ligante de Fas e do TNF, mas o mecanismo exato desta morte celular é controverso (HUSTON *et al.*, 2000; HUSTON *et al.*, 2003).

1.2.2 Amebaporos:

Após a adesão dos trofozoítos nas células do hospedeiro, mediada pela lectina Gal/GalNac, ocorre ruptura celular mediada por peptídeos amebianos denominados amebaporos (LEIPPE *et al.*, 1993; LYNCH *et al.*, 1982). Amebaporos A, B e C são pequenos polipeptídeos de 77 aminoácidos, armazenados no interior de grânulos citoplasmáticos dos trofozoítos. São estrutural e funcionalmente semelhantes as perforinas das células NK (HUSTON *et al.*, 2000). No entanto, quando comparados bioquimicamente, o amebaporo demonstrou ter uma atividade formadora de poro cinco vezes maior que as perforinas (BRUHN *et al.*, 2003). Estes polipeptídeos também se assemelham as perforinas dos linfócitos TCD8⁺, as quais são capazes de formar poros nas bicamadas lipídicas das células do hospedeiro (BRACHA *et al.*, 1999; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Através destes poros ou canais de íons nas membranas, os amebaporos são inseridos sem a necessidade da interação de um receptor específico, destruindo as células (BRACHA *et al.*, 1999). A lesão induzida por estes polipeptídeos também ativa a liberação de pró-interleucina 1 β (pIL-1 β) a qual será transformada em sua forma ativa por ação das cisteína proteinases (SEYDEL *et al.*, 1997). Deste modo os trofozoítos podem destruir os neutrófilos que acabam por liberar seu conteúdo enzimático no meio extracelular e intensificar a necrose liquefativa e a resposta inflamatória, com liberação de maior quantidade de mediadores químicos (TSUTSUMI *et al.*, 1984).

1.2.3 Cisteína proteinases:

Após a adesão e destruição da mucosa colônica, os trofozoítos locomovem-se na MEC mediante liberação de cisteína proteinases (CPs). Tais enzimas clivam o colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, eliminando obstáculos mecânicos para que os trofozoítos possam praticar a invasão tecidual (QUE; REED, 1997; REED *et al.*, 1989). As CPs participam na interação entre parasita e hospedeiro, incluindo a aquisição de nutrientes, facilitação na invasão do tecido e defesa contra o ataque do sistema imunológico. A maior

parte da atividade de proteinase detectada na *E. histolytica* é atribuída à expressão dos genes ehcp1, ehcp2, ehcp3 e ehcp5 (REED *et al.*, 1993), mas somente o ehcp5 está expresso em *E. histolytica* (BRUCHHAUS *et al.*, 1996). A maior proteinase secretada por esta ameba é a CP neutra de 56 kD que cliva o componente C3, ativando o complemento (REED *et al.*, 1989).

CPs amebianas também contribuem para a indução de inflamação intestinal através da ativação proteolítica da pIL-1 β liberada pelo epitélio degenerado ou necrosado, mimetizando a atividade da enzima conversora de interleucina (ICE) e clivando-a em citocina ativa (STANLEY; REED, 2001). A IL-1 β ativada induz a expressão de fator nuclear κ B (NF- κ B) nas células vizinhas normais, ativando a secreção de mediadores químicos da inflamação como IL-1, IL-8, TNF α e ciclooxigenase (COX), promovendo a migração de maior número de macrófagos e neutrófilos (ZHANG *et al.*, 2000). Estudos visando demonstrar a presença de CPs na necrose hepática amebiana sugerem um papel importante desempenhado por estas proteases de *E. histolytica* no desenvolvimento desta lesão em ratos imunodeficientes (STANLEY *et al.*, 1995).

1.2.4 Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada

Fosfatase ácida de membrana (MAP) é uma enzima amebiana com atividade fosfotirosina fosfatase. Esta atividade foi descrita em *E. histolytica* através do bloqueio *in vitro* desta enzima por inibidores da atividade de proteínas fosfotirosina fosfatases. Estas proteínas têm sido descritas como fatores de virulência em diferentes microorganismos patogênicos, por participarem nos processos de transdução de sinal envolvendo rearranjo do citoesqueleto. Isto sugere a possibilidade da MAP de desfosforilar proteínas do citoesqueleto de células de defesa do hospedeiro, contribuindo para a evasão do parasito. A fosfatase ácida secretada (SAP) para o meio extracelular também foi descrita, mas ao contrário da MAP não foi encontrada em *E. dispar* (AGUIRRE-GARCIA *et al.*, 2003).

1.2.5 Proteína rica em serina (SREHP) e Peroxiredoxinas

A SREHP é uma proteína de membrana, fosforilada, localizada na superfície da ameba que funciona como molécula antigênica e parece servir de quimioatratante para outros trofozoítos. Uma SREHP recombinante tem sido estudada como vacina efetiva na prevenção da necrose hepática amebiana em gerbils (STANLEY *et al.*, 1995a).

As peroxiredoxinas são uma importante classe de enzimas antioxidantes. É uma proteína rica em cisteína de 29 kDa, capaz de inativar o hidroperóxido. É uma molécula 50 vezes mais abundante em *E. histolytica* do que em *E. dispar* (CHOI *et al.*, 2005).

1.3 Sistema complemento

O sistema imunológico dos vertebrados providencia proteção mediante mecanismos coordenados entre a imunidade inata e a adaptativa. A imunidade inata se refere à primeira linha de defesa do hospedeiro e serve para limitar a infecção nas primeiras horas após a exposição aos microorganismos e envolve, por exemplo, macrófagos e neutrófilos. Estas células reconhecem os chamados “padrões moleculares associados aos patógenos” que se encontram exclusivamente em parasitos, fungos, bactérias e vírus. Estes padrões são reconhecidos através de uma família de receptores, denominados receptores tipo *Toll* (TLRs) (RAMIREZ-EMILIANO *et al.*, 2007). Os padrões moleculares implicam na expressão de vários genes incluindo os de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF α , IL1 α , IL1 β e IL6. A superfície externa da *E. histolytica* e da *E. dispar* contém padrões moleculares, tais como o lipofosfoglicano (LPG) e o lipofosfopeptidoglicano (LPPG) que são encontrados respectivamente na *E. histolytica* e na *E. dispar* (CAMPOS-RODRIGUES; JARILLO-LUNA, 2005; MOODY *et al.*, 1997).

Um importante componente do sistema imunológico inato é o complemento, que gera fragmentos responsáveis pelo início de uma resposta inflamatória local recrutando leucócitos, opsonizando e facilitando a remoção dos patógenos (BOHLSON *et al.*, 2007). Os trofozoítos estão continuamente expostos ao complemento em geral ativando-o pela via alternativa através da clivagem da cadeia alfa de C3 pelas CPs e não pela deposição de C3 na superfície (HULDT *et al.*, 1979; REED; GIGLI, 1990). Embora esta ativação ocorra através das CPs, a superfície da ameba pode promover a ativação do complemento pela via clássica sem a participação de anticorpos específicos. Ambas as vias podem então participar no controle do desenvolvimento da Amebíase em hospedeiros não imunizados. Estudo feito com

a cepa HM1 de *E. histolytica in vitro* avaliou a ativação das vias alternativa e clássica do complemento na ausência de anticorpos reativos a ameba e os resultados sugerem que a *E. histolytica in vitro*, na ausência de bactéria, ativa ambas as vias em um soro humano não imune (CALDERON; SCHREIBER, 1985).

A *E. histolytica* ativa o sistema complemento, mas resiste à morte pelo complexo de proteínas C5b9 (BRAGA *et al.*, 1992; CAMPOS-RODRIGUES; JARILLO-LUNA, 2005) através da lectina Gal/GalNac. O C5b9 é naturalmente inibido nas células sanguíneas e do endotélio humano, caso o complemento seja ativado em suas membranas. O CD59, assim como outra glicoproteína conhecida como fator homólogo de restrição, atua para impedir a formação do complexo de ataque C5b-9 ou complexo de ataque à membrana (MAC) e conseqüente formação de um poro hidrofílico que lisa a célula (BRAGA *et al.*, 1992). A ativação do complemento leva a geração e inserção do MAC na membrana. O CD59 atua ligando-se ao complexo C5b8 e prevenindo a ligação do C9 ou ligando-se ao próprio C9 (HUANG *et al.*, 2006; NINOMIYA; SIMS, 1992).

Não está completamente esclarecido o papel desempenhado pelo complemento, citocinas e anticorpos na Amebíase (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). Tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células estão envolvidas na patogênese desta doença (BANSAL *et al.*, 2005). Anticorpos anti-ameba são regularmente produzidos na Amebíase sintomática e invasiva, mas com frequência variável na Amebíase assintomática. Esta ativação da imunidade humoral não possui, no entanto, relação com o estado clínico ou intensidade da infecção (CARRERO *et al.*, 2007), pois os anticorpos persistem por anos, mesmo com a infecção erradicada (VINAYAK *et al.*, 1986). Anticorpos IgA são encontrados no soro e colostro das lactantes em áreas endêmicas de Amebíase. A atuação destes anticorpos e das células presentes no leite materno em diferentes concentrações, provavelmente foi a responsável pela morte dos trofozoítos de *E. histolytica* demonstrada *in vitro* (AKISU *et al.*, 2004). A IgA secretada é considerada a primeira linha de defesa específica contra infecções nas superfícies mucosas. A infecção intestinal com a *E. histolytica* induz a uma resposta imune local com anticorpos IgA detectáveis em vários níveis da mucosa (CARRERO *et al.*, 2007).

Soro de pacientes tratados de lesão hepática amebiana reconheceu e inibiu a função de aderência da lectina amebiana *in vitro*, demonstrando a presença de anticorpos anti-lectina (PETRI *et al.*, 1987). Uma experiência em Dhaka, Bangladesh, envolvendo pacientes suspeitos de lesão hepática amebiana, sugeriu que esta lesão pode ser diagnosticada pela detecção da lectina Gal/GalNac no soro (HAQUE *et al.*, 2000). Contudo, a identificação de

antígenos é de alto custo e o uso de testes sorológicos para diagnóstico em áreas de infecção endêmica é pouco utilizado devido a alta prevalência de anticorpos anti-ameba na população em geral (ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

1.4 Participação da inflamação

A geração das anafilatoxinas C3a e C5a durante a ativação do complemento é um componente crítico da resposta inflamatória do hospedeiro. No entanto, uma relativa escassez de neutrófilos é observada ao redor das zonas de necrose liquefativa o que talvez seja explicado pela clivagem das anafilatoxinas C3a e C5a realizada pelas CPs da *E. histolytica* (REED *et al.*, 1995). Apesar da extensa destruição tecidual, a Amebíase invasiva é caracterizada por inflamação moderada. A fagocitose ou a indução da apoptose de células do hospedeiro pelos trofozoítos poderia limitar a inflamação e possibilitar ao parasito sua evasão da resposta imunológica (HUSTON *et al.*, 2003). A inflamação e a necrose são necessárias para a sobrevivência da ameba e para a progressão da Amebíase experimental em hamsters, embora em outros modelos experimentais, as lesões amebianas sejam produzidas na ausência de polimorfonucleares (OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004).

Ao contrário do observado com *E. dispar*, as células epiteliais respondem a lectina Gal/GalNac de *E. histolytica* com um aumento na expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias IL2, IL6, IL8, quimiocina (C-C) ligante 3 (CCL3), quimiocina (C-C) ligante 2 (CCL2), quimiocina (C-C) ligante 5 (CCL5), oncogene relacionado ao crescimento (GRO- α) e fator estimulador da colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) (SHARMA *et al.*, 2005). Recentes evidências sugerem a presença e a contribuição de células inflamatórias durante os estágios iniciais das lesões amebianas para o estabelecimento de necrose nas lesões intestinal e hepática. Uma análise das mudanças ultraestruturais que aparecem durante os estágios iniciais da lesão hepática em hamster, demonstrou o recrutamento de grande número de polimorfonucleares (PMNs) ao redor das amebas. Em consequência ao dano mediado por contato, estes leucócitos acabam por liberar suas toxinas o que poderia desempenhar papel importante na extensão desta lesão (SEYDEL *et al.*, 1997b; TSUTSUMI; MARTINEZ-PALOMO, 1988; OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004).

O estudo da necrose hepática amebiana em camundongos BALB/c e C3H/Hej mostrou indução de resposta imune inespecífica eficaz contra os trofozoítos, envolvendo os

PMNS e o NO (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). Em camundongos com imunodeficiência combinada grave (SCID), a infecção amebiana induziu inflamação e produção intestinal de IL1 β , IL8 e COX-2. A participação do TNF α na lesão amebiana intestinal foi avaliada através de enxertos de intestino humano infectado com *E. histolytica* neste modelo animal. Concluiu-se que esta citocina medeia a resposta inflamatória, mas seu bloqueio não suprime a lesão completamente (ZHANG *et al.*, 2003).

1.5 *Entamoeba dispar*:

A infecção por *E. dispar* resulta em colonização assintomática do intestino grosso sendo considerada não-invasiva e está geralmente associada a casos assintomáticos ou sintomáticos de colite não-disentérica (COSTA, A. *et al.*, 2000). Desde que o tratamento da infecção por *E. dispar* não é necessário, o diagnóstico apurado para discriminar as duas espécies é muito importante (TACHIBANA *et al.*, 2004). Considera-se ainda a presença em *E. dispar* de moléculas importantes à patogenicidade da *E. histolytica*, como a lectina Gal/GalNac (CAMPOS-RODRIGUES; JARILLO-LUNA, 2005). A análise genética de *E. dispar* identificou pelo menos dois membros de cadeia pesada desta lectina de *E. histolytica* e quatro da cadeia leve (DODSON *et al.*, 1997). A conformação diferenciada da lectina Gal/GalNac de *E. dispar* poderia explicar as reduzidas aderência e citotoxicidade já observadas *in vitro* e a menor virulência desta ameba em modelos animais (PILLAI *et al.*, 2001). O amebaporo desta ameba tem cerca de 1/3 da atividade do que o encontrado na *E. histolytica* (DODSON *et al.*, 1997), no entanto, possui uma homologia de 95% com os amebaporos produzidos por esta espécie (LEIPPE *et al.*, 1993). Algumas CPs podem ser produzidas por *E. dispar*, em quantidade 100 a 1000 vezes menor do que o produzido pela *E. histolytica* (STANLEY, 2003). Acrescenta-se ainda a similaridade entre as MAPs, a ausência de SAP e de SREHP. Além das diferenças de secreção das peroxiredoxinas citadas anteriormente, a *E. dispar* possui lipofosfopeptidoglicano (LPPG) ao invés de lipofosfoglicano (LPG) (MOODY *et al.*, 1997).

Neste contexto, a similaridade morfológica entre *E. histolytica* e *E. dispar* torna importante uma adequada diferenciação entre as duas espécies (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1999).

1.6 A introdução de diferentes cultivos de ameba e de diferentes modelos animais

Losch (1875) deu origem a Amebíase experimental produzindo lesões intestinais em um dos cães inoculados com fezes de pacientes com disenteria. O uso de modelos animais *in vivo* em Amebíase tem contribuído para o conhecimento desta parasitose humana. Embora não exista modelo que reproduza todo o ciclo da doença, o uso de diferentes animais de laboratório susceptíveis ou resistentes e a disponibilidade de cultivo da *E. histolytica* em ausência de bactéria (axênico) tem permitido um melhor entendimento do parasito e de sua relação com o hospedeiro (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1997).

No ambiente intestinal, os trofozoítos de *E. histolytica* e de *E. dispar* vivem junto com a microbiota residente, composta de uma mistura complexa de bactérias em sua maioria anaeróbicas ou microaerófilas. Os trofozoítos só permitiam o cultivo em presença de bactérias da microbiota intestinal do indivíduo do qual foram isolados (cultivo xênico ou misto), mas a pesquisa de Leon Jacobs (1947, citado por MIRELLMAN, 1987) abriu uma nova era no cultivo desta ameba pela introdução de penicilina para inibir o crescimento associado à bactéria. Este experimento demonstrou pela primeira vez que o metabolismo da bactéria não era necessário para o crescimento da ameba. Em extensão ao trabalho de Jacobs, Shaffer (1948, citado por MIRELLMAN, 1987) desenvolveu a cultura monoxênica.

Historicamente, hamsters e gerbils têm sido utilizados mais freqüentemente para o estudo da lesão hepática amebiana (SEYDEL *et al.*, 1997b). No entanto, a inoculação direta no fígado de camundongos causa lesões com características como as encontradas em humanos (STANLEY, 2001). No intestino, a susceptibilidade a infecção com *E. histolytica* é dependente do parasito e da linhagem de camundongo (HOUPPT *et al.*, 2002). Em camundongos BALB/c foi reproduzida reação inflamatória granulomatosa na parede intestinal de camundongo inoculado com amebas cultivadas axenicamente (RIVERO-NAVA *et al.*, 2002). A presença de granulomas em hamsters inoculados intrahepaticamente com amebas nestas mesmas condições já havia sido descrita (TANIMOTO *et al.*, 1971). Em outro estudo, uma análise imuno-citoquímica das diversas populações celulares foi realizado nas lesões hepáticas produzidas em C3H/Hej (HUSTON *et al.*, 2000). Conclui-se que a introdução de novos modelos animais na pesquisa da Amebíase, como as diversas linhagens de

camundongos, tem permitido uma análise mais adequada dos mecanismos da patogênese (TSUTSUMI; SHIBAYAMA, 2006).

1.7 Justificativas:

E. histolytica e *E. dispar* são semelhantes em sua base genética, na morfologia da célula e por utilizarem o homem como hospedeiro, sendo, portanto muito importante uma comparação entre ambas às espécies. Tal comparação pode fornecer informações para melhor compreender a virulência da *E. histolytica* e os mecanismos de sua patogenicidade (ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 1999; ZAKI *et al.*, 2006).

Com base no contexto exposto, se torna relevante avaliar a patogênese das lesões induzidas pela *E. histolytica* em cultivo misto e em cultivo axênico, em comparação com cepas de *E. dispar* de cultivo misto. A avaliação da expressão do sistema complemento *in vivo*, em animal de susceptibilidade intermediária à Amebíase como o camundongo, tem a intenção de contribuir para uma melhor compreensão a respeito da resposta do hospedeiro contra o parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Comparar a patogenicidade de cepas mista e axênica de *E. histolytica* entre si e entre as cepas mistas de *E. dispar* utilizadas.

2.2 Objetivos específicos:

- Fazer análise histopatológica das lesões induzidas no fígado de camundongos inoculados com cepas mista e axênica de *E. histolytica* e cepas mistas de *E. dispar*
- Quantificar as áreas de lesão induzidas pelas diferentes cepas
- Identificar e quantificar os trofozoítos encontrados nestas áreas de necrose
- Identificar e quantificar a deposição do componente C9 do sistema complemento sobre os trofozoítos
- Quantificar a área de antígenos derivados dos trofozoítos das diferentes cepas

3 METODOLOGIA

3.1 Animais utilizados

Foram utilizados no experimento 32 camundongos BALB/c fêmeas com idade aproximada entre oito a dez semanas, com peso em torno de 24 gramas. Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Protocolo do CETEA: 177/2006 em anexo.

3.2 Cepas de *Entamoeba dispar* e *Entamoeba histolytica*

Foram utilizadas as cepas VEJ e ADO adquiridas de pacientes com suave desconforto intestinal. A análise do perfil de isoenzimas e o PCR identificaram as amostras como sendo de *E. dispar* (GOMES *et al*, 1997b). Também foram utilizadas as cepas EGG xênica e EGG axênica. A cepa EGG foi isolada em 1988 de paciente apresentando colite disenterica e necrose hepática amebiana. A amostra foi identificada como *E. histolytica*, através das mesmas análises (GOMES *et al*, 1997b) e posteriormente axenizada em 2005 (FREITAS, 2007). Todas as cepas foram isoladas no Laboratório de Amebíases do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. As cepas usadas neste trabalho serão referidas por sua espécie e tipo de cultivo (TAB. 1)

TABELA1 Cepas de *E. histolytica* e de *E. dispar* e suas respectivas siglas

Cepas de <i>E. histolytica</i>	EGGax = Ehax (<i>E. histolytica</i> axênica)	EGGx = Ehm (<i>E. histolytica</i> mista)
Cepas de <i>E. dispar</i>	ADO = Edm1 (<i>E. dispar</i> mista nº 1)	VEJ = Edm2 (<i>E. dispar</i> mista nº 2)

3.3 Preparo do inóculo:

3.3.1 Cepas de cultivo misto:

As cepas foram descongeladas em banho-maria à 37°C, por aproximadamente cinco minutos, colocadas em tubos com meio PAVLOVA modificado (SILVA, 1972) e foram para estufa a 37° C. Sua viabilidade foi analisada ao microscópio óptico sempre que realizado o repique, ou seja, a cada 48h. Ao alcançarem crescimento exponencial, as amebas foram transferidas para as garrafas, retornaram para estufa até atingirem novamente crescimento exponencial. A inoculação de cada cepa foi preparada isoladamente em datas distintas.

No dia da inoculação as culturas foram observadas em microscópio invertido para confirmação da qualidade das amebas para o inóculo. Assegurando a boa qualidade das culturas desprezava-se o meio antigo e se acrescentava 10 ml de meio novo. Após aproximadamente duas horas de incubação a 37° C iniciava-se a preparação das amebas para a efetiva inoculação dos animais. Desprezou-se o meio de cultura das garrafas e foi acrescentado aproximadamente 5 ml de tampão fosfato (PBS) gelado. As garrafas foram colocadas em banho de gelo para que as amebas se destacassem do plástico.

Para concentração das células, o conteúdo das garrafas foi distribuído em tubos com cerca de 6 ml cada que foram então centrifugados por cinco minutos e novamente desprezado o sobrenadante. Os *pelets* foram agrupados em um tubo e ressuspensos em meio de cultivo para contagem dos trofozoítos. Trofozoítos viáveis, capazes de excluir corante de vitalidade, foram quantificados em câmara de *Newbauer*. Na determinação da concentração de células por ml utilizou-se o cálculo: número de amebas X fator de diluição (geralmente 2) X fator de correção da câmara de *Newbauer* (2500). Os inóculos foram ajustados com salina para a concentração de 100000 trofozoítos/ml que foram contidos em 0,1 ml do inóculo.

3.3.2 Cepa de cultivo axênico:

A cepa EGG axênica foi cultivada em tubos com meio TYI-S-33 (DIAMOND *et al.*, 1995) em estufa à 37°C e sofreu repique 48 hs antes do preparo. No dia da inoculação, os tubos foram colocados no gelo para que as amebas se desprendessem e só depois centrifugados para concentração das células. Para a contagem dos trofozoítos e posterior inoculação procedeu-se como descrito para as cepas de cultivo misto.

3.4 Inoculação

Os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina 2% (10 mg/Kg) e ketamina 5% (150mg/Kg). Após devidamente anestesiados foi feita uma incisão abdominal de aproximadamente 2 cm para visualização do fígado (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). Quatro grupos de 8 animais cada foram inoculados diretamente no lobo esquerdo do órgão com 100.000 trofozoítos de sua respectiva cepa contidos em 0,1 ml de solução salina (GHADIRIAN; MEEROVITCH, 1982; STANLEY *et al.*, 1995).

Em cada inoculação observou-se um halo amarelado na região do inóculo indicando que não houve perda da solução inoculada. Em seguida, os animais foram devidamente suturados e observados diariamente. Foram inoculados 3 animais com a microbiota bacteriana das cepas de *E. dispar* com o mesmo volume de inóculo e sob as mesmas condições.

3.5 Análise quantitativa das lesões e histopatologia

Dois dias após a inoculação de cada grupo os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado removido *in totum* (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002; RIGOTHIER *et al.*, 2002). Foram feitas três fatias sequenciais de aproximadamente 2mm, sempre da borda livre em direção ao hilo hepático, e em seguida digitalizadas para posterior cálculo da área acometida.

As fatias foram fixadas em formol tamponado 10% pH 7,2. Após o período de fixação, os fragmentos foram desidratados, diafanizados, infiltrados e incluídos em parafina. Foram obtidos cortes com 4 μ m de espessura, para coloração com hematoxilina e eosina (H&E) e para a realização de reações imuno-histoquímicas. As lesões foram descritas quanto a sua intensidade e a do processo inflamatório, sua topografia e a presença de parasitos.

3.6 Reação imuno-histoquímica dos trofozoítos

Os cortes para processamento em imuno-histoquímica foram desparafinados, 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 os cortes com soro de cabra diluído 1:40 por 30 minutos. Os cortes foram incubados com soro policlonal anti-*E. dispar* ou anti-*E. histolytica* diluídos 1:1000 (produzido nos laboratórios de Amebíases e Protozooses); em seguida, incubados com IgG biotinizada diluída 1:200 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) também 1:200. A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controle positivo foram usados cortes histológicos obtidos de lesões amebianas ricas em trofozoítos. Como controle negativo, o antisoro primário foi substituído por PBS em alguns destes cortes. Todos os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris por 20 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

3.7 Reação imuno-histoquímica para o componente C9

Utilizando outros cortes dos mesmos fragmentos foram realizadas reações para identificação imuno-histoquímica do componente C9. Os cortes foram desparafinados e hidratados. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 40vv à 0,2%. Os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados incubando os cortes com soro de cabra diluído 1:40 por 30 minutos. Os cortes foram incubados por 16 a 18 horas a 4°C com soro monoclonal anti-complemento C9 (produzido em laboratório e gentilmente cedido pelo Prof. Álvaro Cantini Nunes) diluído 1:2000; e posteriormente incubados com IgG biotinizada de cabra anti-coelho 1:50 (Pharmlingen, California, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase diluída 1:100 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA). A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controle positivo foram utilizados cortes de miocárdio submetido à lesão por reperfusão sanguínea, como descrito logo abaixo. Como controle negativo, o antisoro primário foi substituído por PBS em alguns cortes de miocárdio e de fígado. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris diluída a 75% por 5 segundos, hidratados e diafanizados para montagem em entelan.

3.8 Indução de lesão cardíaca por reperfusão

Sob anestesia com ketamina 10% e xilasina 2% (4:3, 0,1ml/100 gramas, i.p.), um rato foi colocado em posição supina sobre uma mesa operatória, traqueostomizado, entubado e ventilado com ar ambiente utilizando-se um respirador para pequenos animais. O tórax foi aberto por toracotomia lateral esquerda no quarto ou quinto espaço intercostal. Para a exposição do coração, foi utilizado um pequeno afastador para manter as costelas separadas. Após incisão do pericárdio, o coração foi rapidamente removido da cavidade torácica e rotacionado para a esquerda, possibilitando acesso à artéria descendente anterior esquerda (DAE). Com o uso de um clips a DAE foi ocluída e, imediatamente após, o coração foi reintroduzido na cavidade torácica. A isquemia ocorreu durante 15 minutos, e após este período o clips foi removido permitindo a reperfusão do miocárdio por mais 5 minutos. Em seguida o coração foi removido e fixado em formol tamponado 10%, pH 7,2 para obtenção de cortes histológicos.

3.9 Análise quantitativa da área de necrose

As áreas de necrose foram calculadas através do software KS300 contido no analisador de imagens *Carl Zeiss*, a partir das fatias do fígado previamente digitalizadas através da câmera digital Sony, modelo MVC-CD400/CD250. A distância entre as fatias e a câmera foi a mesma em todas as amostras digitalizadas, padronizada através de margens próximas às fatias. Todas as áreas de necrose foram delimitadas com o auxílio de um cursor e os resultados em μm^2 enviados para uma planilha. As medidas das áreas de necrose dos diferentes grupos estudados foram submetidas aos testes *ANOVA* seguido do *LSD* (Least Significance Difference).

3.10 Análise quantitativa dos trofozoítos e da área de antígenos

Todos os trofozoítos identificados pela imuno-histoquímica foram quantificados interativamente através do mesmo analisador de imagens. Com o uso da microcâmera JVC-TK 1270 e da objetiva de 40X, foram digitalizadas 40 imagens a partir de 01 corte de fígado de cada animal, perfazendo $21,3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de fígado analisado e um total de 1000 imagens. Os métodos utilizados para digitalização, definição de condições de medida e obtenção de resultados são os descritos por Caliari (1997). Os números de trofozoítos obtidos foram submetidos aos testes de *Kruskal Wallis* seguido do *ANOVA*.

Através das mesmas 40 imagens digitalizadas acima descritas foi quantificada a área de antígenos de trofozoítos (restos de trofozoítos mortos e/ou seus produtos de secreção) marcados pela imuno-histoquímica, também totalizando 1000 imagens analisadas. Todos os pixels das regiões marcadas foram selecionados para criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total de marcação. Os eventuais ruídos nas imagens foram eliminados utilizando algoritmos do software (CALIARI, 1997). As medidas destas áreas foram submetidas ao teste de *Kruskal Wallis* sem teste de comparações múltiplas.

3.11 Análise da deposição do componente C9

Todos os trofozoítos positivos para o componente C9 foram contados interativamente em 40 imagens digitalizadas através da objetiva de 40x, utilizando o mesmo analisador de imagens e totalizando 1000 imagens. Os números de trofozoítos C9⁽⁺⁾ obtidos foram submetidos aos testes *ANOVA* seguido do *LSD*.

3.12 Análise do número estimado de trofozoítos C9(-)

O número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ foi estimado de maneira semelhante à utilizada para calcular o número de neutrófilos CD4⁺ na miocardite chagásica (CALIARI *et al.*, 2002). Através da subtração do número total de trofozoítos pelo número de trofozoítos C9⁽⁺⁾, obteve-se o número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ que foi analisado estatisticamente através dos testes *ANOVA* seguido do *LSD*.

3.13 Análise estatística:

As análises foram realizadas utilizando-se o SPSS 15.0, empregando-se *ANOVA* para dados paramétricos e *Kruskal-Wallis* para os não-paramétricos ambos seguidos do teste *LSD* para comparações múltiplas de pequenas amostras. O teste de Wilcoxon foi utilizado na análise de dados pareados e não-paramétricos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. O coeficiente de *Spearman* foi utilizado para avaliar provável correlação entre os parâmetros analisados.

O cálculo do tamanho das amostras e as análises estatísticas mais adequadas foram realizados conforme orientação dos Professores da Consultoria em Planejamento e Análises de Experimentos, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária-UFMG.

4 RESULTADOS

4.1 Análise macroscópica das lesões hepáticas

De 32 animais inoculados, 25 sobreviveram e sete morreram antes de completar 48h de infecção. Em todos os 25 animais sobreviventes foram encontradas lesões na face externa do lobo inoculado, branco-amareladas, lisas, firmes ao corte e delimitadas por parênquima hepático não-necrosado (FIG. 1). A TAB. 2 relaciona a frequência das lesões nas fatias, permitindo uma análise da extensão da necrose em profundidade. Os animais inoculados com as microbiotas das cepas de *E. dispar* não apresentaram lesões.

TABELA 2 Frequência das lesões nas fatias do fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax, Ehm, Edm1 e Edm2

Cepas	Animais com lesão em 1 fatia	Animais com lesão em 2 fatias	Animais com lesão em 3 fatias
Ehax	0	1	5
Ehm	0	0	7
Edm1	0	3	3
Edm2	1	3	2

4.2 Análise histopatológica

4.2.1 Animais inoculados com a cepa Ehax

Foram observadas lesões nodulares circunscritas de necrose contendo freqüentes trofozoítos e grande quantidade de restos celulares (FIG. 2 a, b). O infiltrado inflamatório foi de intensidade discreta e constituído por neutrófilos e macrófagos. Às vezes, notava-se a confluência de nódulos parcialmente delimitados por regiões do parênquima hepático não necrosadas. Foram encontrados alguns granulomas epitelióides em fase inicial de formação, constituídos por poucas células epitelióides, neutrófilos, macrófagos, trofozoítos e restos celulares (FIG. 2c).

4.2.2 Animais inoculados com a cepa Ehm

A inoculação destes trofozoítos produziu áreas extensas de necrose, com moderado número de trofozoítos em sua borda e, em meio à necrose (FIG. 2d, e). O infiltrado inflamatório e o parênquima hepático não-necrosado foram escassos. Massas basófilas de calcificação foram muito freqüentes junto à necrose. Poucas áreas de nódulos de necrose foram encontradas em alguns animais, com freqüentes trofozoítos (FIG. 2f).

4.2.3 Animais inoculados com a cepa Edm1

As áreas de necrose encontradas em todos os animais foram semelhantes às produzidas pela cepa Ehm, apesar de sua intensidade ser menor. As áreas de necrose nodulares foram muito freqüentes, tanto isoladas, quanto na borda da lesão principal. Foi observado infiltrado inflamatório moderado ou intenso, predominantemente neutrofílico e, freqüentemente associado à grande quantidade de restos celulares (FIG. 3 a, b). Trofozoítos foram encontrados em pequena quantidade nas diferentes regiões descritas acima. Calcificações foram observadas com menor freqüência.

4.2.4 Animais inoculados com a cepa Edm2

Em relação aos grupos anteriores, estes animais apresentaram as menores extensões de necrose que foram únicas e/ou em nódulos múltiplos. Mesmo menores, as áreas de necrose foram ricas em restos celulares e com quantidade variável de calcificação. Na borda das lesões foi observado infiltrado inflamatório discreto predominantemente neutrofílico (FIG. 3c, d) em quantidade superior ao observado nos animais inoculados com a cepa Ehm. Raros trofozoítos foram encontrados nos cortes corados com H&E. Um animal apresentou necrose semelhante à induzida pela cepa Edm1.

4.3 Análise qualitativa das reações imuno-histoquímicas para trofozoítos e seus antígenos

4.3.1 Animais inoculados com a cepa Ehax

Trofozoítos foram identificados através da visualização de coloração marrom-escuro sobre estas formas do parasito. Os mesmos foram encontrados em grande quantidade nas bordas das lesões principais e em meio à necrose. Menor quantidade foi observada no interior de focos de necrose e de granulomas (FIG. 4b).

Reação positiva para antígenos de *E. histolytica* foi observada nas regiões descritas acima e no interior de hepatócitos necrosados, indicando a presença de restos de trofozoítos e/ou seus produtos de secreção (FIG. 4c). Os antígenos derivados dos trofozoítos mostraram-se às vezes como regiões amorfas de coloração marrom de variados tons e distintas dos artefatos de *background*, indicando produtos de secreção amebiano. Os antígenos também foram visualizados como agregados granulosos de mesma coloração, o que é fortemente sugestivo de serem restos de trofozoítos mortos. Os controles negativos de todos os grupos mostraram ausência de reação para antígenos de trofozoítos (FIG. 4a).

4.3.2 Animais inoculados com a cepa Ehm

Comparando com o grupo anterior, menor número de trofozoítos estava presente, principalmente na borda das grandes áreas de necrose. Menor quantidade foi encontrada nas

áreas de necrose. Reações positivas para antígenos de *E. histolytica* foram detectadas na borda e no interior da necrose (FIG. 4d, e) frequentemente em associação com trofozoítos.

4.3.3 Animais inoculados com a cepa Edm1

Foi encontrada quantidade moderada de trofozoítos junto às áreas de necrose e nas bordas das lesões. Grandes regiões positivas para antígenos de *E. dispar* foram observadas, principalmente na área necrosada e regiões de parênquima hepático íntegro. Grande quantidade de agregados granuloso de marcação foram observados junto ao infiltrado inflamatório. (FIG. 5a, b)

4.3.4 Animais inoculados com a cepa Edm2

Escassos trofozoítos foram encontrados. Como observado no grupo anterior, regiões positivas para antígenos de *E. dispar* estavam presentes nas áreas de necrose e no infiltrado inflamatório (FIG. 5c).

4.4 Análise qualitativa das reações imuno-histoquímicas para o componente C9 do complemento

4.4.1 Animais inoculados com a cepa Ehax

Vários trofozoítos C9⁽⁺⁾ foram encontrados na borda das lesões, no interior da necrose e nos granulomas. Também foram observados muitos trofozoítos C9⁽⁻⁾ nas mesmas regiões, às vezes, próximos aos trofozoítos C9⁽⁺⁾ (FIG. 6d). Reação⁽⁺⁾ foi observada também nas áreas de necrose, em hepatócitos normais e lesados, próximos ou não a estas áreas. Também estavam presentes restos de trofozoítos C9⁽⁺⁾. O controle positivo para componente C9 do complemento mostrou grandes áreas de positividade no miocárdio (FIG. 6b). Não foi

observada marcação nos controles negativos, tanto no miocárdio quanto no fígado (FIG. 6a, c).

4.4.2 Animais inoculados com a cepa Ehm

A quantidade de trofozoítos C9⁽⁺⁾ encontrados parece ser bem próxima à observada na reação específica para identificação dos trofozoítos. Raros trofozoítos⁽⁻⁾ foram encontrados (FIG. 6e, f).

Trofozoítos e restos de trofozoítos C9⁽⁺⁾ foram encontrados nas mesmas regiões descritas no grupo anterior. Reações ⁽⁺⁾ também foram observadas nas áreas de necrose e em hepatócitos normais e lesados.

4.4.3 Animais inoculados com a cepa Edm1

Com exceção de um animal, pequena quantidade de trofozoítos C9⁽⁺⁾ estavam presentes nas bordas das áreas de necrose e nas lesões nodulares. Em geral, as áreas de marcação positivas foram menores do que as observadas nos dois grupos anteriores. Restos de trofozoítos C9⁽⁺⁾ foram encontrados com facilidade. Trofozoítos C9⁽⁻⁾ foram raramente encontrados (FIG. 7a, b).

4.4.4 Animais inoculados com a cepa Edm2

Raríssimos trofozoítos C9⁽⁺⁾ foram encontrados. Nos outros aspectos, a descrição é semelhante à do grupo anterior (FIG. 7c).

4.5 Figuras

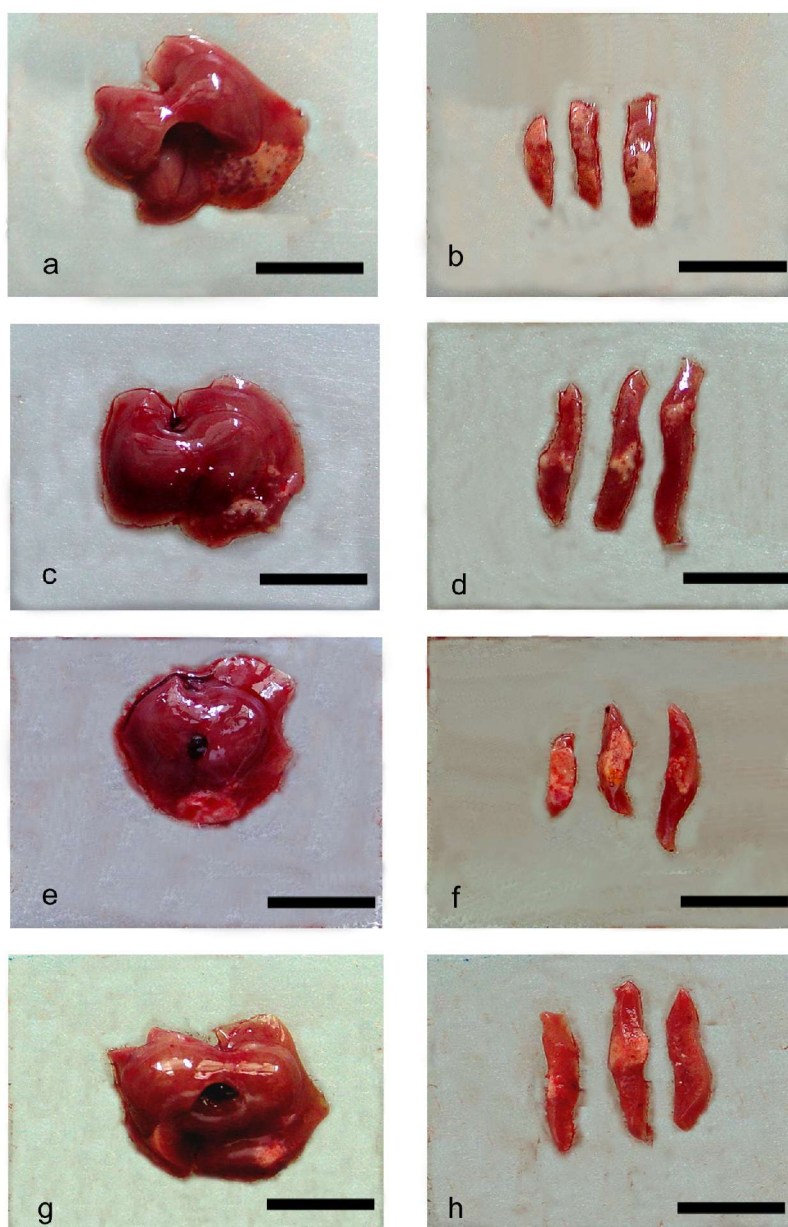


FIGURA 1- Macroscopia do fígado dos camundongos inoculados com *Entamoeba histolytica* ou *Entamoeba dispar*.

Notar no lobo esquerdo e nas fatias do órgão; lesões branco-amareladas, lisas, delimitadas por parênquima hepático normal:

- (a) e (b) Fígado e fatias do órgão inoculado com a cepa Ehax.
- (c) e (d) Fígado e fatias do órgão inoculado com a cepa Ehm.
- (e) e (f) Fígado e fatias do órgão inoculado com a cepa Edm1.
- (g) e (h) Fígado e fatias do órgão inoculado com a cepa Edm2.

Barra: 1 cm

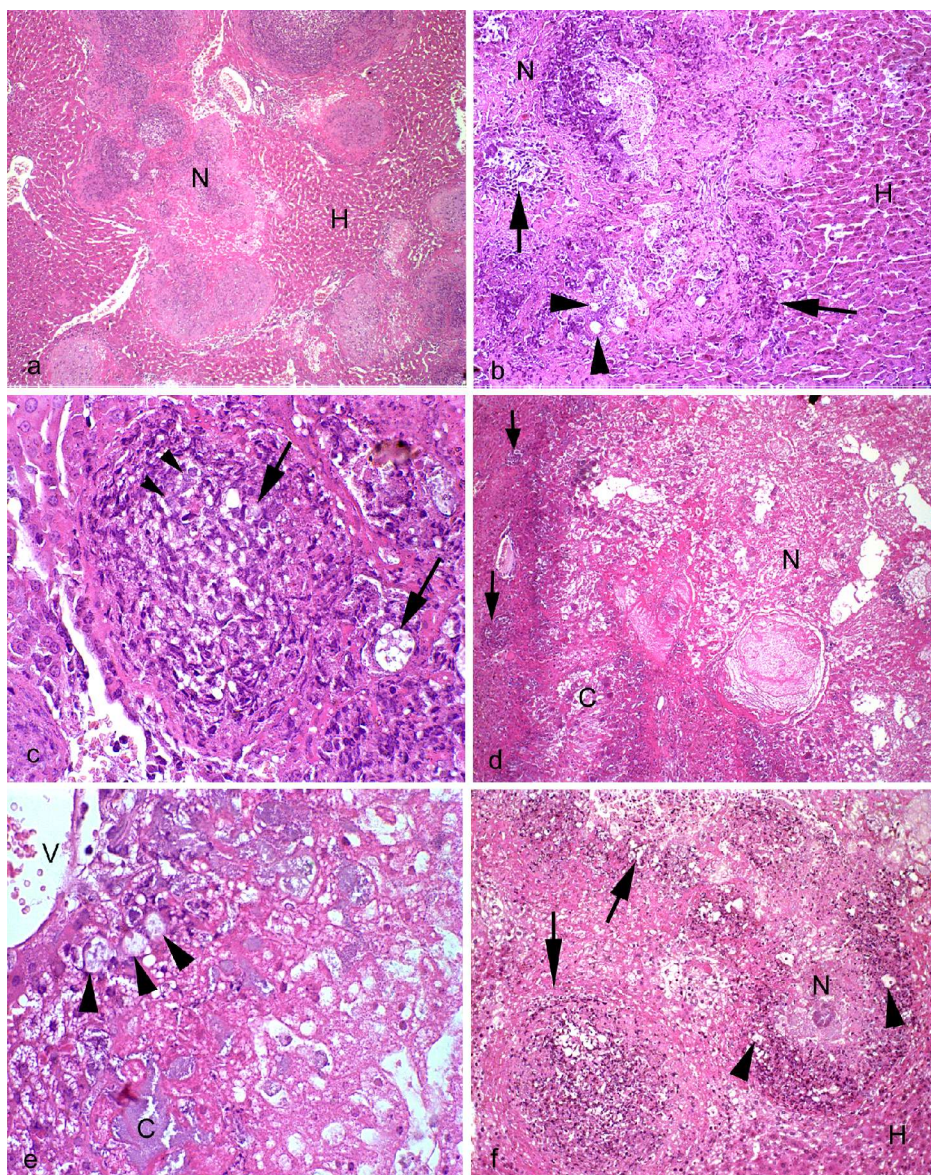


FIGURA 2. Fígado de camundongo inoculado com *E. histolytica*:

Fígado de camundongo inoculado com Ehax.(a) Lesões nodulares circunscritas de necrose (N) delimitadas por parênquima hepático normal (H). H&E. X100

(b) Necrose amebiana (N) delimitada por parênquima hepático normal (H). Escasso infiltrado inflamatório e restos celulares (setas). Trofozoítos (cabeças de seta). H&E. X200

(c) Trofozoítos (setas) são observados no interior de granuloma. Células epitelióides (cabeças de seta). H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Ehm. (d) Extensas áreas de necrose hepática (N), calcificações (C), restos celulares e infiltrado inflamatório discreto (setas). H&E. X100

(e) Detalhe de necrose amebiana mostrando trofozoítos (cabeças de seta) e massas basófilas de calcificação (C). Ramo da veia porta (V). H&E. X600

(f) Presença de trofozoítos (cabeças de seta) associados a agregados nodulares de restos celulares e leucócitos (setas). Necrose (N). Parênquima hepático normal (H). – H&E. X200

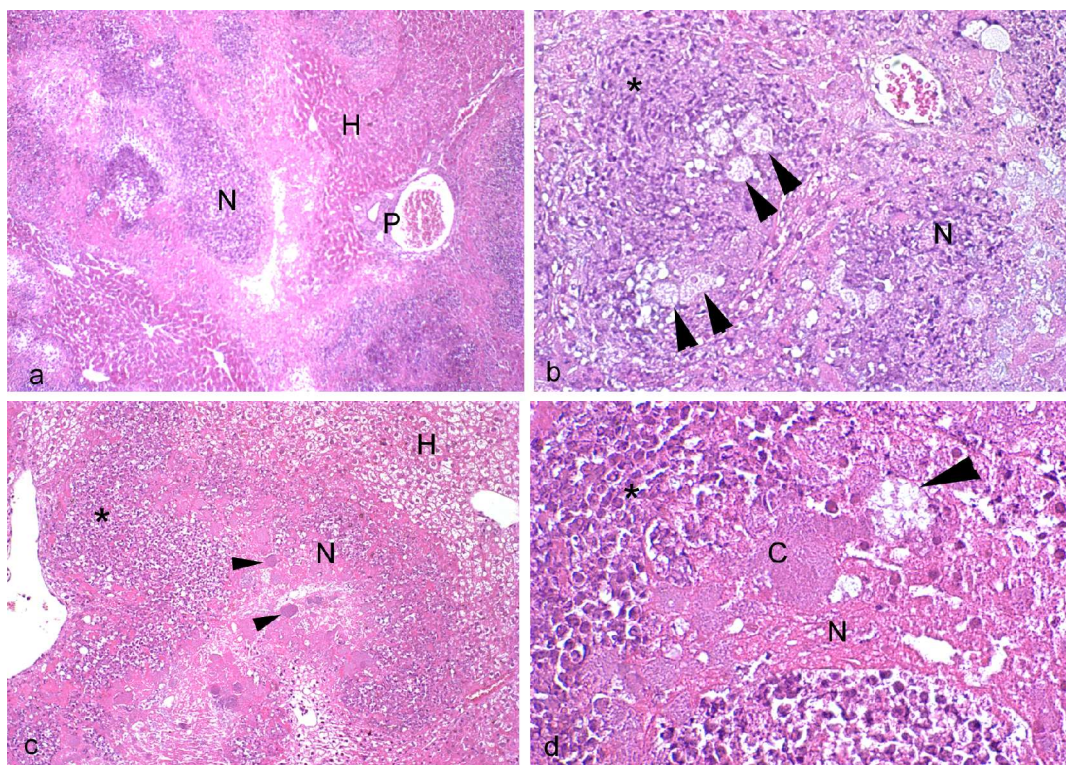


FIGURA 3. Fígado de camundongo inoculado com *E. dispar*:

Fígado de camundongo inoculado com Edm1. (a) Grandes áreas de necrose (N) ao lado de parênquima hepático normal (H). Espaço porta (P). H&E. X100

(b) Aglomerados de trofozoítos (cabeças de seta) associados a restos celulares e discreto infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos (*). Necrose (N). H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Edm2. (c) Parênquima hepático degenerado (H) próximo a grande zona de necrose amebiana (N). Calcificação (cabeças de seta). Restos celulares e infiltrado inflamatório moderado (*).H&E. X200

(d) Zona de necrose (N) contendo um trofozoíto (cabeça de seta), infiltrado predominantemente neutrofilico (*) e calcificação (C). H&E. X600

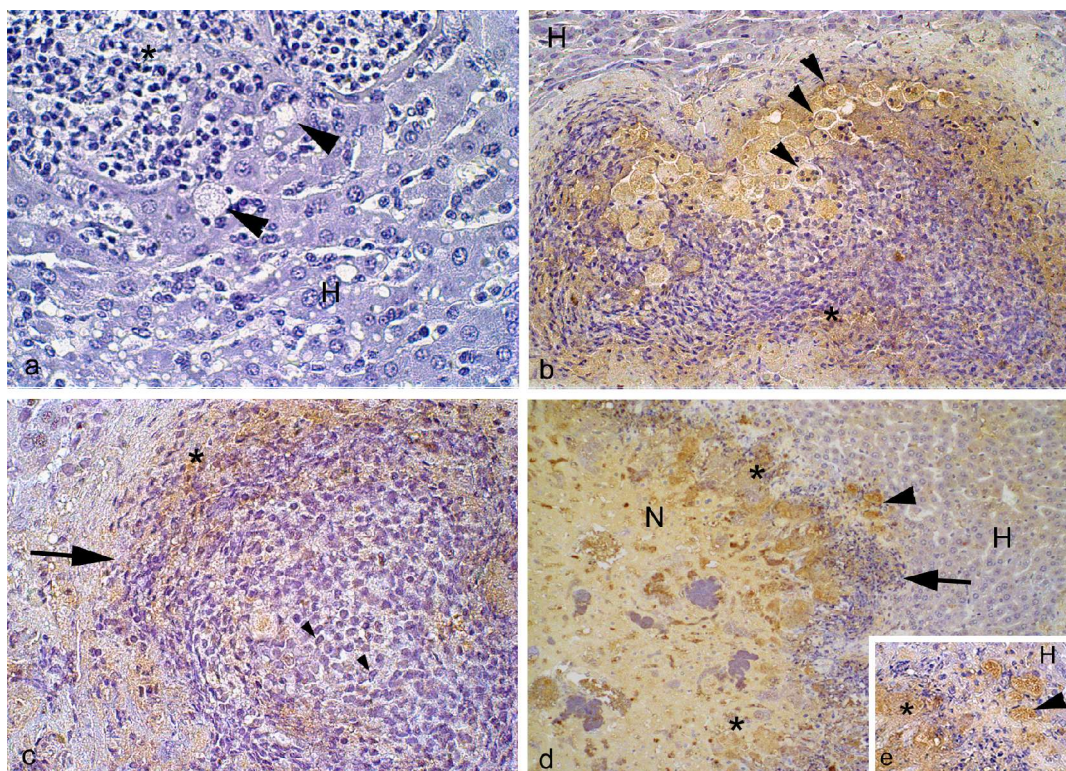


FIGURA 4. Reação Imuno-histoquímica para trofozoítos de *E. histolytica*:

Controle negativo de reação imuno-histoquímica para trofozoítos. (a) Trofozoítos sem marcação (cabeças de seta). Infiltrado inflamatório (*) e parênquima hepático degenerado (H). H&E. X600

Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de Ehax. (b) Notar a presença de vários trofozoítos positivos (cabeças de setas) nas bordas e no interior de um granuloma epitelióide. Presença de material amorfo marrom-escuro indicando marcação positiva para antígenos de *E. histolytica*, distribuído difusamente no granuloma (*). Parênquima hepático normal (H). Contra-coloração H&E. X400

Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de Ehax. (c) Granuloma (seta) contendo células epitelióides (cabeças de seta). Marcação positiva indicando a presença de antígenos de *E. histolytica* no interior e ao redor do granuloma (*). Contra-coloração H&E. X600

Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de Ehm. (d) Parênquima hepático normal (H) próximo à necrose amebiana (N) contendo trofozoítos de *E. histolytica* positivos (cabeça de seta) e antígenos derivados dos trofozoítos, difusamente distribuídos (*). Infiltrado inflamatório e restos celulares (seta). Contra-coloração H&E. X400. (e) Detalhe da figura anterior mostrando trofozoítos positivos (cabeça de seta) próximos a restos celulares e a marcações difusas de antígenos de *E. histolytica* (*). Parênquima hepático normal (H). Contra-coloração H&E. X600

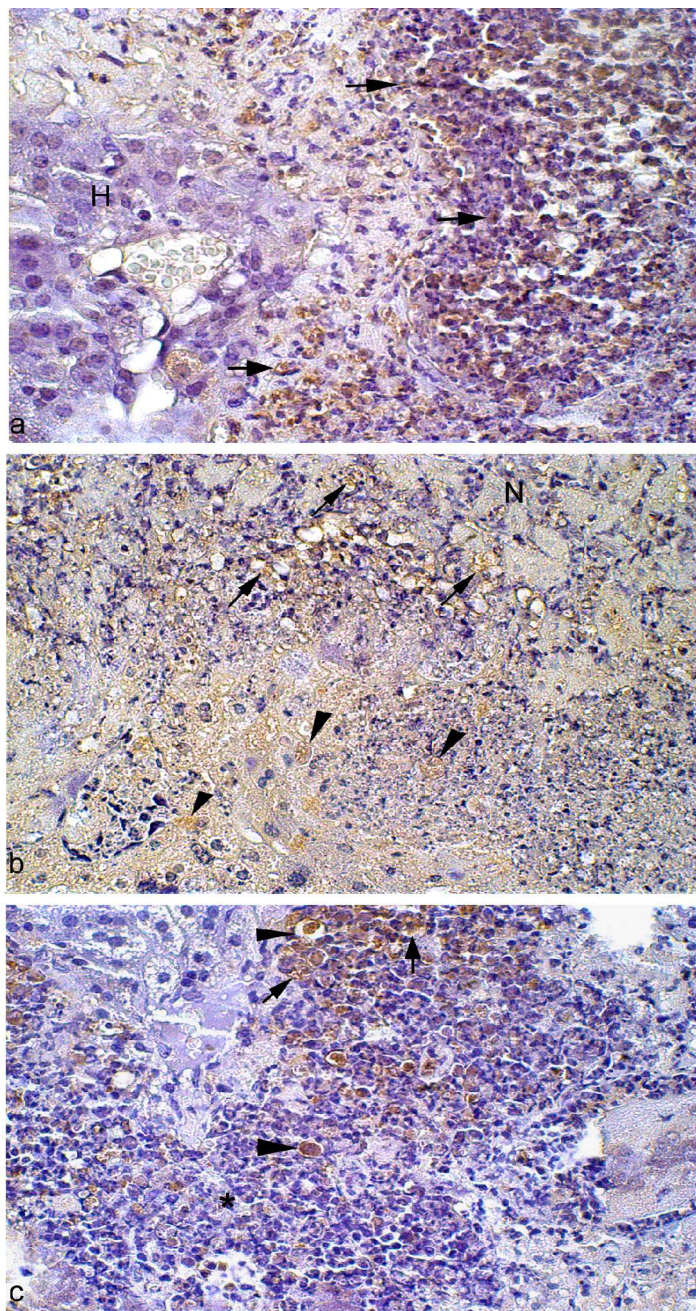


FIGURA 5. Reação Imuno-histoquímica para trofozoítos de *E. dispar*:

Fígado de camundongo inoculado com Edm1. (a) Reação imuno-histoquímica para trofozoítos de *E. dispar*. Restos celulares, infiltrado neutrofílico e material marrom-escuro granuloso indicativo da presença de antígenos de *E. dispar* (setas). Parênquima hepático normal (H). Contra-coloração H&E. X600. (b) Trofozoítos (cabeças de seta) e marcação positiva para antígenos de *E. dispar* (setas) no interior de necrose rica em restos celulares (N). Contra-coloração H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Edm2. (c) Escassos trofozoítos degenerados (cabeças de setas) e material marrom-escuro granuloso indicando a presença de antígenos de *E. dispar* (setas). Presença de infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico (*). Contra-coloração H&E. X600

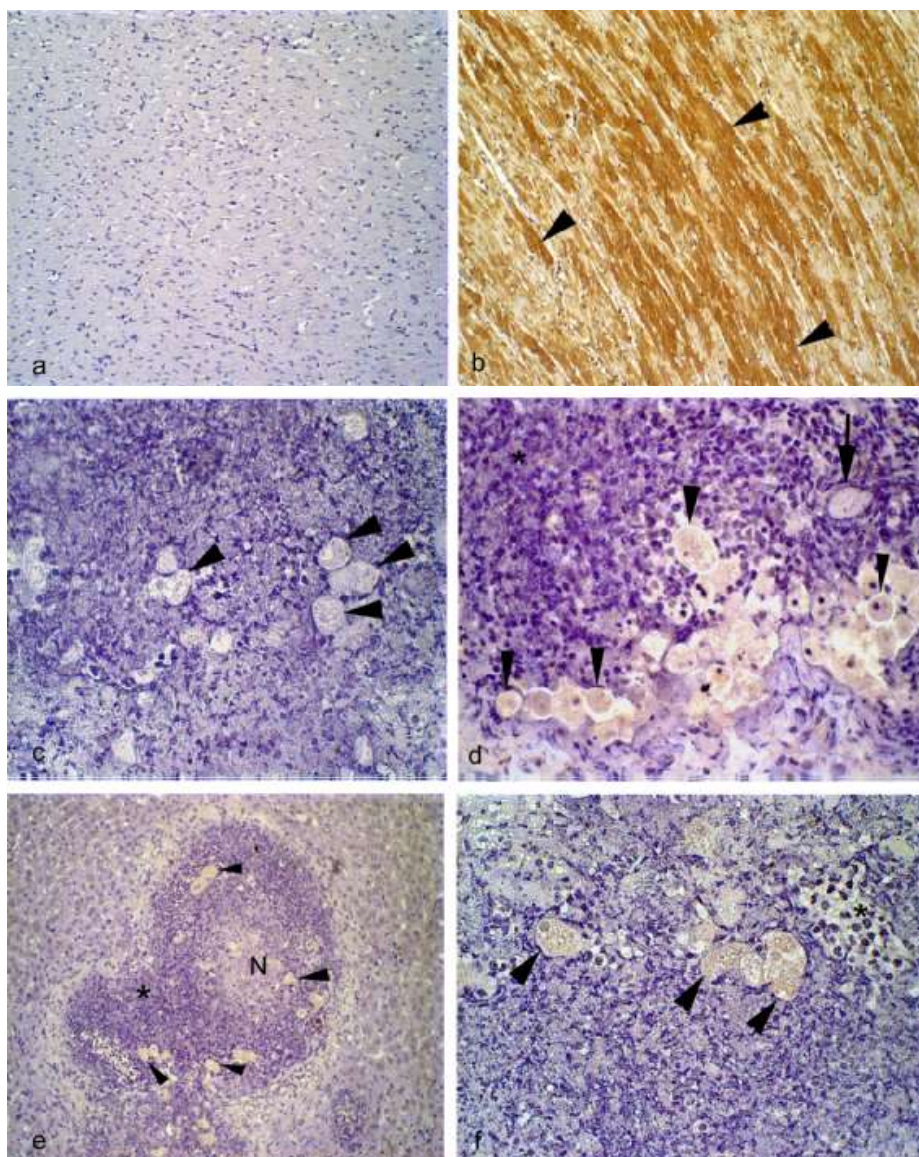


FIGURA 6. Reação imuno-histoquímica para componente C9 do complemento em trofozoítos de Ehax e Ehm:

Controles da reação para componente C9 do complemento (a) Controle negativo. Miocárdio reperfundido de rato. Contra-coloração H&E. X200. (b) Controle positivo. Miocárdio reperfundido de rato. Notar material amorfo de coloração marrom-escuro sobre as fibras cardíacas (cabeças de seta). Contra-coloração H&E. X200

(c) Controle negativo em fígado de camundongo inoculado com *Entamoeba histolytica*. Notar a ausência de reação positiva em todas as estruturas da figura. Trofozoítos negativos (cabeças de seta). Contra-coloração H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Ehax (d) Notar muitos trofozoítos C9⁺ (cabeças de seta) e um trofozoíto C9⁻ (seta). Restos celulares e infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos e neutrófilos (*). Contra-coloração H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Ehm (e) Trofozoítos C9⁺ (cabeças de seta) em meio a restos celulares e infiltrado inflamatório (*). Necrose (N). Contra-coloração H&E. X200. (f) Detalhe da figura anterior mostrando trofozoítos C9⁺ (cabeças de seta), restos celulares e infiltrado inflamatório (*).Contra-coloração H&E. X600

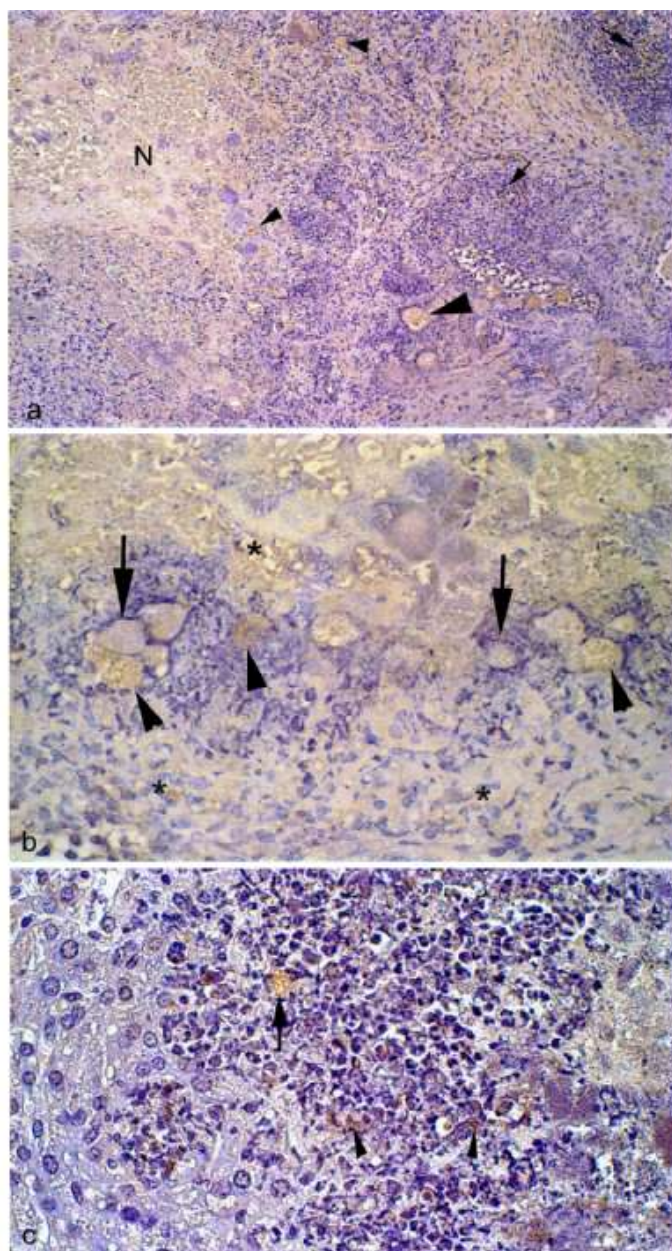


FIGURA 7. Reação imuno-histoquímica para componente C9 do complemento em trofozoítos de Edm1 e Edm2:

Fígado de camundongo inoculado com Edm1. (a) Reação positiva para complemento em trofozoítos (cabeças de seta), no infiltrado inflamatório (setas) e na necrose (N). Contra-coloração H&E. X200. (b) Detalhe da figura anterior. Trofozoítos C9⁺ (cabeças de setas) e trofozoítos C9⁻ (setas). Reação positiva para C9 é observada em meio à necrose e, mais discretamente, no infiltrado inflamatório (*). Contra-coloração H&E. X600

Fígado de camundongo inoculado com Edm2. (c) Trofozoítos C9⁺ (seta) e reação positiva no infiltrado inflamatório e na necrose (cabeças de seta). Contra-coloração H&E. X400

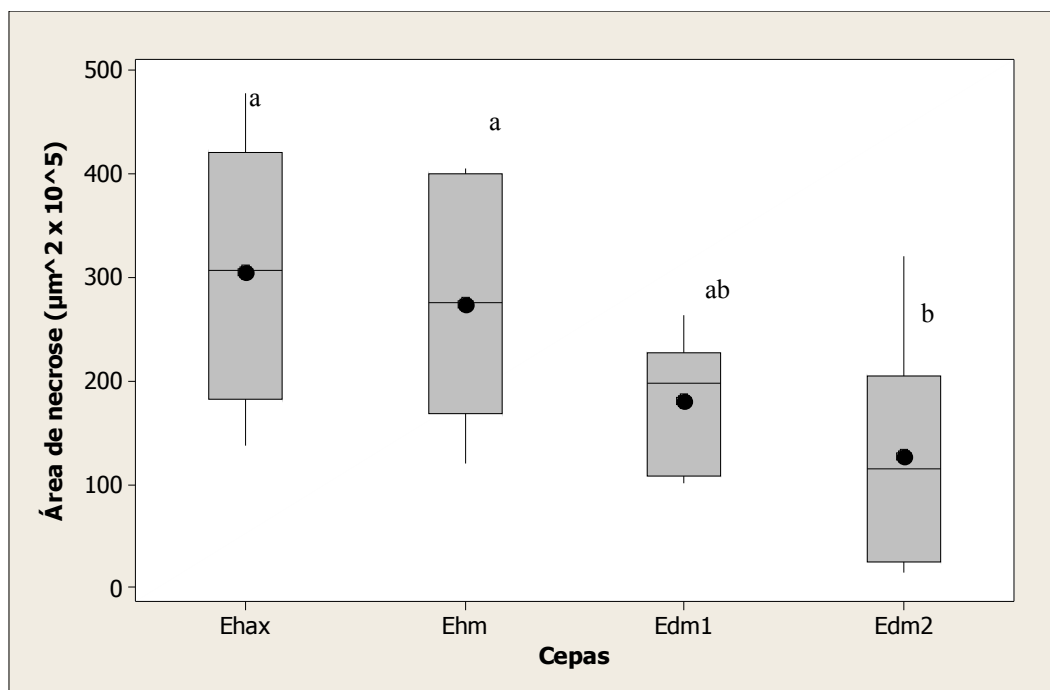
4.6 Análise quantitativa das áreas de lesão

As médias das áreas de lesão dos diferentes grupos estão discriminadas na TAB. 3 e no GRAF. 1. Apesar das cepas Ehax e Ehm terem produzido necroses qualitativamente maiores do que as promovidas pela cepa Edm1, não foi verificada diferença estatística da área de lesão entre estes três grupos de animais ($p > 0,05$). O mesmo se observou entre os grupos de animais inoculados com as cepas Edm1 e Edm2 ($p > 0,05$). Entretanto, quando foi comparada à área de lesão entre os animais inoculados com as cepas de *E. histolytica* (Ehax e Ehm) com os inoculados com Edm2, foi comprovada área de lesão significativamente menor produzida por esta cepa de *E. dispar* ($p < 0,05$).

TABELA 3 Área de lesão hepática ($\mu\text{m}^2 \times 10^5$) produzida em camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

Animais	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
BALB 1	197,4	168	186,9	14,1
BALB 2	136,3	400,1	208,5	319,7
BALB 3	261,3	404,7	100,1	26,9
BALB 4	350,8	276,2	263,5	63,3
BALB 5	478,5	361,2	109,7	166,5
BALB 6	400,9	189,8	213,7	165,6
BALB 7	—	120,4	—	—
Médias	304,2	274,3	180,4	126,0
	$\pm 129,1$	$\pm 117,3$	$\pm 63,7$	$\pm 115,8$

GRÁFICO 1 Áreas de lesão hepática ($\mu\text{m}^2 \times 10^5$) produzidas em camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste *LSD* ($p < 0,05$)

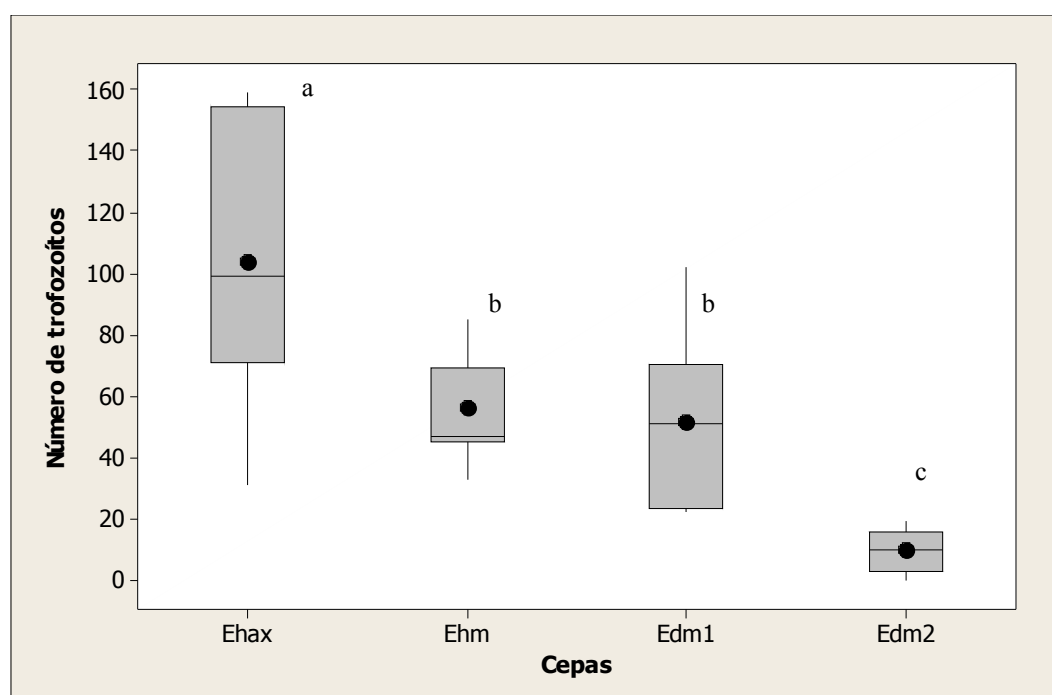
4.7 Análise quantitativa dos trofozoítos

As médias do número de trofozoítos dos diferentes grupos estão discriminadas na TAB. 4 e no GRAF. 2. Os animais inoculados com a cepa Ehax apresentaram os maiores números de trofozoítos quando comparados com os resultados obtidos nos animais inoculados com as demais cepas ($p < 0,05$). Houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de trofozoítos de ambas as cepas de *E. dispar* e os de Ehm e de Edm2, cujo número de trofozoítos foi bem inferior aos demais grupos ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre a cepa Ehm e a cepa Edm1 ($p > 0,05$).

TABELA 4 Número de trofozoítos encontrados no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

Animais	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
BALB 1	159	66	60	15
BALB 2	31	33	57	4
BALB 3	107	45	22	7
BALB 4	91	47	102	0
BALB 5	153	69	45	19
BALB 6	84	85	24	13
BALB 7	..	47
Médias	104,2	56	51,7	9,7
	± 47,6	±17,9	± 29,4	± 7,2

GRÁFICO 2 Número de trofozoítos no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste ANOVA ($p < 0,05$)

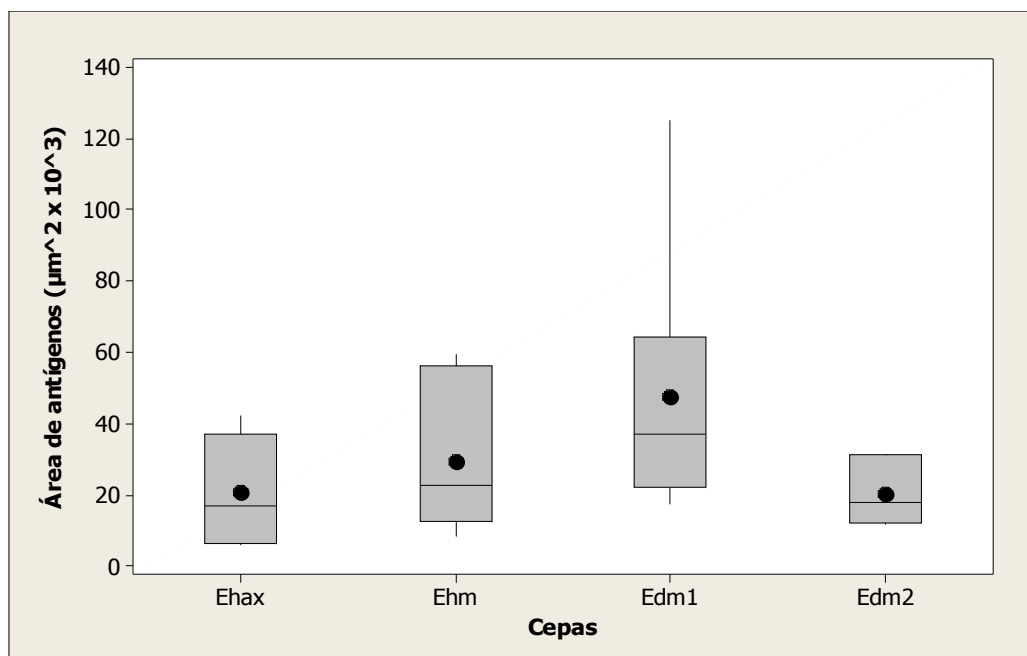
4.8 Análise quantitativa da área de antígenos

As médias das áreas de antígenos de trofozoítos dos diferentes grupos estão discriminadas na TAB. 5 e no GRAF. 3. Apesar de ter sido quantificada maior área de antígenos nos animais inoculados com a cepa Edm1 de *E. dispar* em relação as demais cepas, não foi verificada diferença estatística desta área entre nenhum dos grupos de animais ($p > 0,05$).

TABELA 5 Área de antígenos ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$) de trofozoítos no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

Animais	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
BALB 1	42,3	18,9	31,4	30,9
BALB 2	6,7	8,3	125,3	11,6
BALB 3	24,4	27,8	43,8	17,9
BALB 4	35,2	12,3	23,6	12,3
BALB 5	8,9	59,3	42,6	17,1
BALB 6	5,7	55,9	17,1	31,4
BALB 7		22,7		
Médias	20,5	29,3	47,3	20,2
	$\pm 15,8$	$\pm 20,4$	$\pm 39,6$	$\pm 8,8$

GRÁFICO 3 Áreas de antígenos ($\mu\text{m}^2 \times 10^3$) de trofozoítos no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



Médias não diferem pelo teste de *Kruskall-Wallis* ($p > 0,05$)

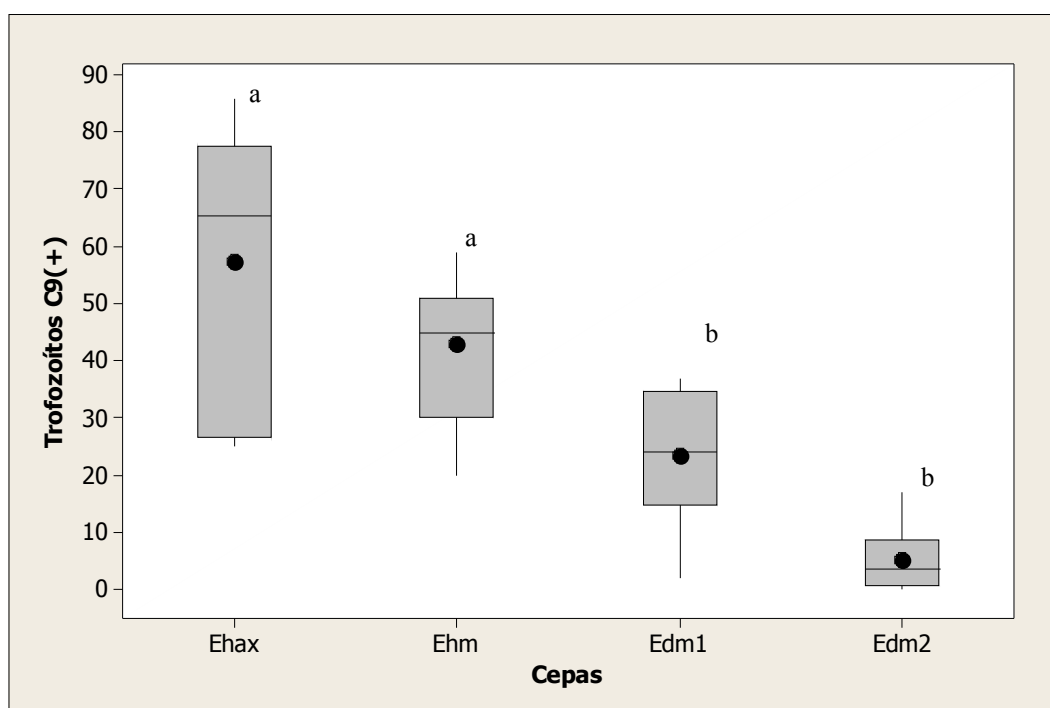
4.9 Análise quantitativa do número de trofozoítos C9⁽⁺⁾

As médias do número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ dos diferentes grupos estão discriminadas na TAB. 6 e no GRAF. 4. Diferença estatística no número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ foi encontrada entre os grupos de animais inoculados com as cepas de *E. histolytica* (Ehax e Ehm) em comparação com as cepas de *E. dispar* (Edm1 e Edm2) ($p < 0,05$). Comparando-se os números de trofozoítos C9⁽⁺⁾ encontrados nos animais inoculados com as cepas de *E. histolytica* entre si não houve diferença estatística ($p > 0,05$). O mesmo foi observado na comparação entre as cepas de *E. dispar* ($p > 0,05$).

TABELA 6 Número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

Animais	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
BALB 1	86	51	34	6
BALB 2	25	20	23	2
BALB 3	75	44	19	1
BALB 4	63	45	25	0
BALB 5	27	51	37	7
BALB 6	68	59	2	5
BALB 7	..	30
Médias	57,3 ± 25,45	44,7 ± 10,3	23,3 ± 12,5	5,2 ± 6,2

GRÁFICO 4 Números de trofozoítos C9⁽⁺⁾ no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste *LSD* ($p < 0,05$)

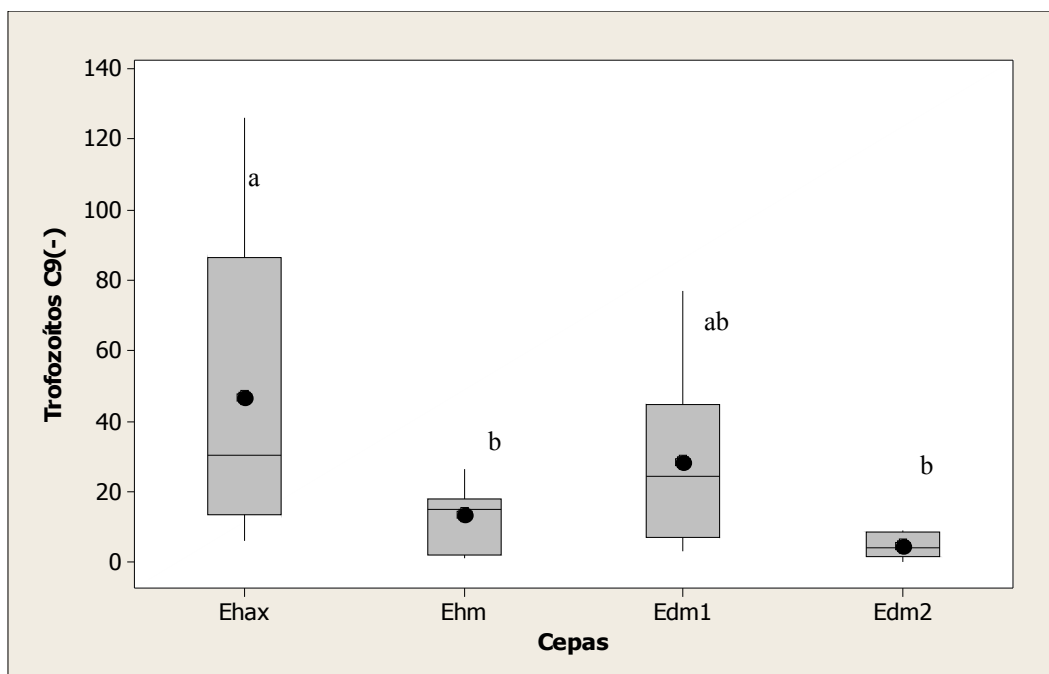
4.10 Análise quantitativa do número de trofozoítos C9⁽⁻⁾

As médias do número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ nos diferentes grupos estão discriminadas na TAB. 7 e no GRAF. 5. Diferença estatística no número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ foi encontrada entre os grupos de animais inoculados com a cepa Ehax de *E. histolytica* em comparação com a cepa mista desta ameba e com a cepa Edm2 de *E. dispar* ($p < 0,05$). Comparando-se os números de trofozoítos C9⁽⁻⁾ encontrados nos animais inoculados com a cepa Ehax e a cepa Edm1 de *E. dispar* não houve diferença estatística ($p > 0,05$). O mesmo foi observado na comparação entre Ehm e as cepas de *E. dispar* e estas cepas entre si ($p > 0,05$).

TABELA 7 Número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

Animais	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
BALB 1	73	15	26	9
BALB 2	6	13	34	2
BALB 3	32	1	3	6
BALB 4	28	2	77	0
BALB 5	128	18	8	2
BALB 6	16	26	22	8
BALB 7	..	17
Médias	46,83 ± 45,04	13,14 ± 8,93	28,3 ± 26,46	4,5 ± 3,67

GRÁFICO 5 Número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ na necrose hepática induzida em camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



Médias seguidas de letras distintas diferem pelo teste *LSD* ($p < 0,05$)

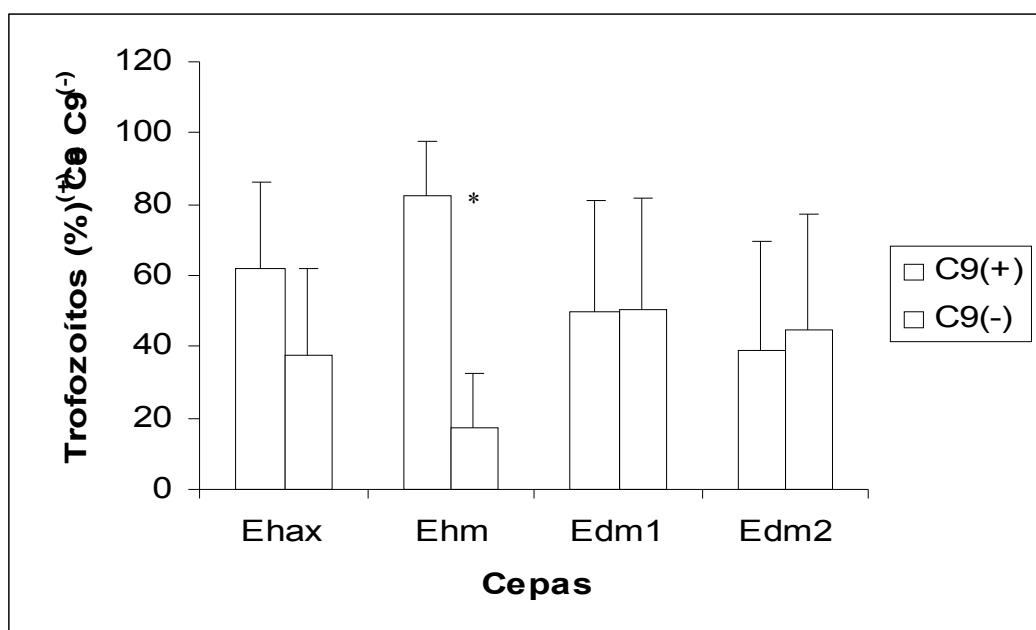
4.11 Análise comparativa do percentual de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾

O percentual médio do número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ nos diferentes grupos está discriminado na TAB. 8 e no GRAF. 6. Diferença estatística foi avaliada em cada grupo sendo encontrada nos animais inoculados com a cepa Ehm de *E. histolytica* ($p < 0,05$). Nos outros grupos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$).

TABELA 8 Percentual do número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ no fígado de camundongos inoculados com as cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*

	% C9 (+)				% C9 (-)			
	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2	Ehax	Ehm	Edm1	Edm2
Médias	62	83	50	39	38	17	50	45
	±24	±17	±31	±31	±24	±15	±31	±33

GRÁFICO 6 Médias do percentual de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ das cepas Ehax e Ehm de *E. histolytica*, Edm1 e Edm2 de *E. dispar*



* Médias diferem pelo teste de Wilcoxon ($p < 0,05$)

4.12 Análise de correlação

Todos os dados foram estatisticamente analisados entre si através da Correlação de *Spearman* para dados não-paramétricos. As correlações foram realizadas por cepa e estão

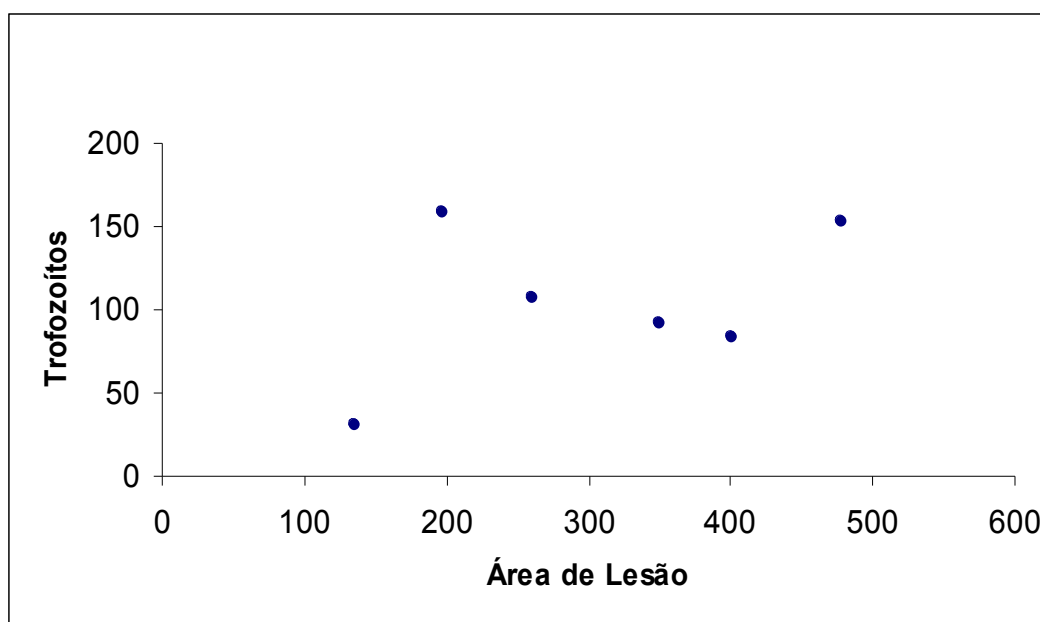
determinadas nas TAB. 9, 10, 11 e 12. Os GRAF. de 7 a 10 representam correlações significativas .

TABELA 9. Correlação entre os resultados quantitativos obtidos com a cepa Ehax de *E. histolytica*

		Cepa Ehax				
		Área de lesão	Número de trofozoítos	Trofozoítos C9(+)	Trofozoítos C9(-)	Área de antígenos
Área de Lesão	correlação	—	0,54 *	0,44 *	0,33	—
	valor-p		0,01	0,03	0,10	
Área de antígenos	correlação	-0,21	0,24	0,26	0,31	—
	valor-p	0,31	0,26	0,20	0,13	

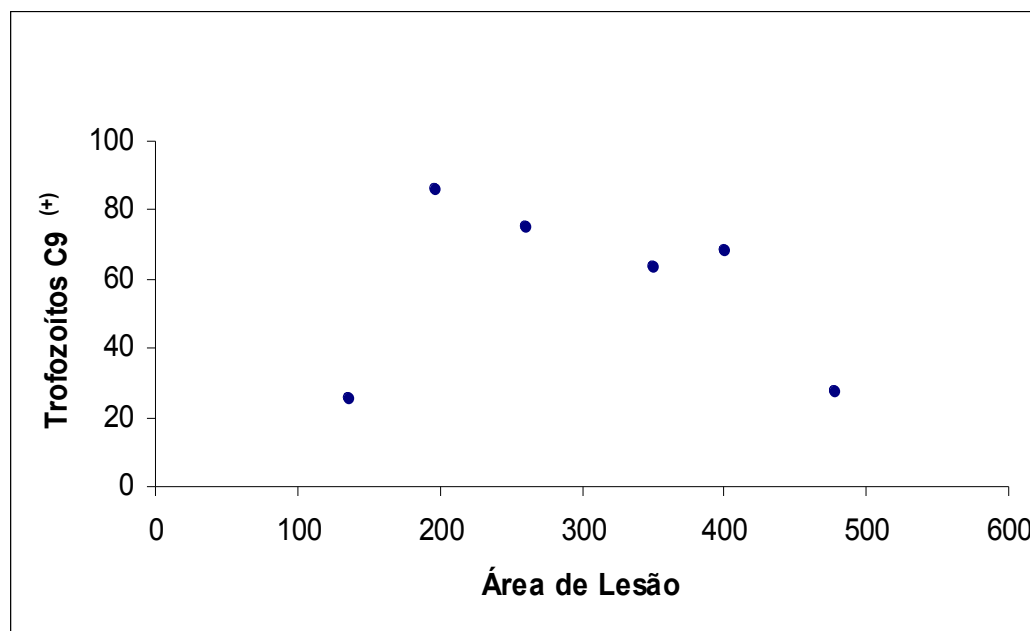
* Correlações estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

GRÁFICO 7 Correlação entre o número de trofozoítos e a área de lesão hepática induzida em camundongos inoculados com a cepa Ehax de *E. histolytica*



Correlação de *Spearman* positiva ($\rho = 0,54$)

GRÁFICO 8 Correlação entre o número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e a área de lesão hepática produzidas em camundongos inoculados com a cepa Ehax de *E. histolytica*



Correlação de *Spearman* positiva ($\rho = 0,44$)

TABELA 10 Correlação entre os resultados quantitativos obtidos com a cepa Ehm de *E. histolytica*

Cepa Ehm						
		Área de lesão	Número de trofozoítos	Trofozoítos C9 ⁽⁺⁾	Trofozoítos C9 ⁽⁻⁾	Área de antígenos
Área de lesão	correlação	—	-0,49	-0,27	-0,54	—
	valor-p		0,27	0,56	0,22	
Área de antígenos	correlação	0,00	0,68	0,61	0,57	—
	valor-p	1,00	0,09	0,14	0,18	

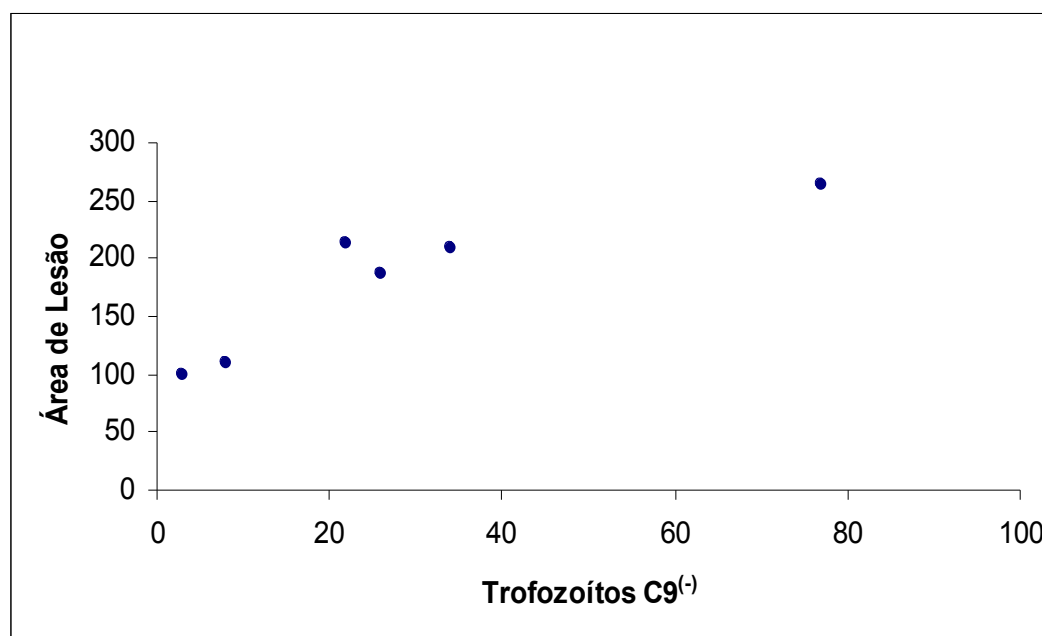
Correlações não significantes ($p > 0,05$)

TABELA 11 Correlação entre os resultados quantitativos obtidos com a cepa Edm1 de *E. dispar*

		Cepa Edm1				
		Área de lesão	Número de trofozoítos	Trofozoítos C9 ⁽⁺⁾	Trofozoítos C9 ⁽⁻⁾	Área de antígenos
Área de lesão	correlação	—	0,60	- 0,20	0,83 *	—
	valor-p		0,21	0,70	0,04	
Área de antígenos	correlação	-0,60	-0,20	0,11	-0,20	—
	valor-p	0,21	0,70	0,70	0,70	

*Correlação estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

GRÁFICO 9 Correlação entre o número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ e as áreas de lesão hepática produzidas em camundongos inoculados com a cepa Edm1 de *E. dispar*



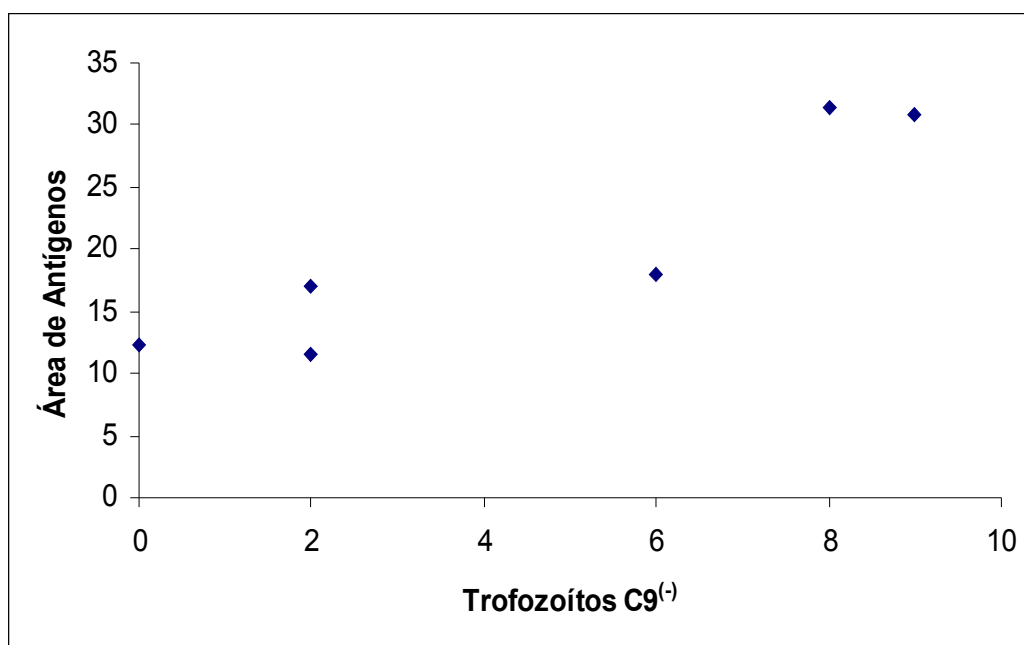
Correlação de *Spearman* positiva ($\rho = 0,83$)

TABELA 12 Correlação entre os resultados quantitativos obtidos com a cepa Edm2 de *E. dispar*

Cepa Edm2						
		Área de lesão	Número de trofozoítos	Trofozoítos C9 ⁽⁺⁾	Trofozoítos C9 ⁽⁻⁾	Área de antígenos
Área de lesão	correlação	—	-0,09	0,14	-0,52	—
	valor-p		0,87	0,79	0,29	
Área de antígenos	correlação	-0,54	0,54	0,37	0,84*	—
	valor-p	0,27	0,27	0,47	0,04	

*Correlação estatisticamente significantes ($p < 0,05$)

GRÁFICO 10 Correlação entre o número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ e as áreas de antígenos de trofozoítos identificadas no fígado de camundongos inoculados com a cepa Edm2 de *E. dispar*



Correlação de *Spearman* positiva ($\rho = 0,84$)

5 DISCUSSÃO

A necrose hepática amebiana é a forma extra-intestinal mais comum da Amebíase que é uma doença tipicamente humana, não existindo um modelo animal que desenvolva todo o ciclo da doença, da ingestão do cisto à forma invasiva (VELAZQUEZ *et al.*, 1998). No entanto, sua reprodução experimental em modelos animais, principalmente no hamster, contribui significativamente para o estudo da Amebíase (TSUTSUMI; SHIBAYAMA, 2006). Outros modelos animais alternativos ao hamster, como o camundongo, têm obtido sucesso na indução da necrose hepática e de lesões intestinais, apesar da susceptibilidade à infecção depender da cepa amebiana e da linhagem do camundongo (HOUPPT *et al.*, 2002). A produção de lesões hepáticas e intestinais nestes animais contraria a afirmação de alguns autores de que os trofozoítos produzem lesão apenas em hamsters e gerbils, mas não em outras espécies de roedores (CAMPOS-RODRÍGUEZ; JARILLO-LUNA, 2005).

O trabalho apresentado objetivou estudar a necrose hepática amebiana reproduzindo-a em camundongo, considerado um modelo de susceptibilidade intermediária entre o hamster/gerbil e o rato/porquinho-da-índia (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). A fim de comparar diferentes níveis de intensidade das lesões, foram utilizadas cepas de *E. histolytica* de cultivo misto e axênico e, cepas de *E. dispar* de cultivo misto. Embora morfologicamente idênticas *E. histolytica* e *E. dispar* diferem geneticamente e somente *E. histolytica* é considerada patogênica (OMS, 1997). A *E. dispar* não causa Amebíase invasiva em humanos, mas pode causar lesão em modelos animais como se observou neste estudo e anteriormente em hamsters (COSTA, A. *et al.*, 2000; COSTA, C. *et al.*, 2007¹; FURST *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2000).

No estudo atual, lesões branco-amareladas no lobo inoculado foram observadas macroscopicamente nos animais inoculados com *E. histolytica* ou *E. dispar*. As lesões de todos os grupos se mostraram firmes ao corte e delimitadas por parênquima hepático não-necrosado. A distribuição das lesões nas fatias de fígado obtidas permitiu uma análise da extensão da necrose em profundidade. Em todos os animais inoculados com a cepa mista de *E. histolytica* foi observada lesão nas três fatias de fígado seccionadas, seguida dos animais da cepa axênica de *E. histolytica* e, por último, daqueles inoculados com as cepas de *E. dispar*. Este dado nos confirma o potencial virulento desta cepa de *E. histolytica*, independente da presença ou ausência de bactéria, e das cepas de *E. dispar*. A indução de lesões hepáticas com

¹ Trabalho de autoria de Cássia Abadia Xavier Costa e outros, UFMG, 2007 (em fase de pré-publicação)

o uso destas cepas de *E. dispar* mostra que, embora não-patogênica em humanos, esta espécie de ameba também é capaz de produzir Amebíase hepática experimental murina, guardadas as proporções da intensidade da necrose produzida pela espécie patogênica. Há poucos relatos de trabalhos que tenham obtido êxito na produção de lesões hepáticas murinas através da inoculação de *E. dispar* (COSTA, C., 2005).

A chegada dos trofozoítos ao fígado leva à formação de pequenas zonas de destruição tecidual nodulares, envoltas por pequena quantidade de infiltrado inflamatório e restos celulares, que tendem a aumentar de tamanho e se fundirem até a formação de grandes lesões cavitárias (AMARAPURKAR *et al.*, 2003; ESPINOSA-CANTELLANO; MARTÍNEZ-PALOMO, 2000; HAQUE *et al.*, 2003). Áreas de necrose nodulares foram observadas em quase todos os grupos de animais, especialmente com o uso das cepas Edm1 e Ehx. Aspectos histopatológicos observados no camundongo são semelhantes ao descrito na doença humana e mostra a eficácia deste modelo experimental (STANLEY, 2001).

A extensa necrose com raridade de lesões nodulares no grupo inoculado com a cepa Ehm pode ter sido produzida devido a uma maior virulência desta cepa. É possível que a presença de bactérias no cultivo possa ter influenciado a virulência desta cepa de *E. histolytica* fazendo com que, histologicamente, a lesão observada se diferenciasse da cepa axênica. Na literatura, é descrito que a patogenicidade da *E. histolytica* está em parte relacionada com sua associação com certas espécies bacterianas sendo os trofozoítos desta ameba seletivos com respeito a suas interações, atacando e ingerindo somente as bactérias por eles reconhecidas. Esta seletividade é aparentemente importante para o crescimento do parasito e sua patogenicidade (GHOSH *et al.*, 1998; MIRELMAN, 1987).

Também é discutida a participação de produtos dos leucócitos mortos na ampliação da destruição tecidual na Amebíase. Na infecção amebiana em hamsters foi sugerido que a morte dos hepatócitos pode ter sido produzida por produtos difundidos oriundos da lise de neutrófilos, uma vez que durante a formação da necrose, o contato direto dos hepatócitos com os trofozoítos é observado ocasionalmente (RIGOTHIER *et al.*, 2002). Diferentes autores têm demonstrado que o infiltrado inflamatório na Amebíase é muito discreto em comparação com a intensa necrose, sugerindo que as células inflamatórias são destruídas, liberando seu conteúdo enzimático sobre o parênquima hepático (HUSTON *et al.*, 2003). Este fenômeno parece ter ocorrido no grupo Ehm, pois foi o que apresentou menor intensidade do infiltrado inflamatório e extensas áreas de necrose. O mesmo foi observado em hamsters inoculados com a mesma cepa de *E. histolytica* (COSTA, C. *et al.*, 2007). Da mesma maneira, animais irradiados apresentaram redução do tamanho das lesões hepáticas devido a

leucopenia, mostrando que os leucócitos foram importantes para o desenvolvimento de abscesso hepático nos animais controle (OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004). Em contrapartida, camundongos infectados com *E. histolytica* e previamente tratados com anticorpos monoclonais anti-neutrófilos, desenvolveram necrose hepática de dimensões iguais às do grupo controle, sendo estas lesões provavelmente produzidas por produtos secretados pela própria ameba (VELAZQUEZ *et al.*, 1998). A lectina Gal/GalNac é capaz de induzir apoptose (HUSTON *et al.*, 2003) e as CPs digerem componentes da matriz extracelular, facilitando a aquisição de nutrientes e a invasão tecidual, além de contribuir para a evasão do parasito contra a resposta imunológica (PÉREZ-TAMAYO *et al.*, 2006; QUE; REED, 1997; REED *et al.*, 1989). A *E. histolytica* também é capaz de destruição celular através dos amebaporos (BRACHA *et al.*, 1999).

A produção de lesões intestinais em camundongos normais e tratados com anticorpo anti-neutrófilo também não resultou em diferenças de tamanho e profundidade das lesões, mas sim, na freqüência com a qual elas apareceram, sendo mais freqüentes nos neutropênicos (RIVERO-NAVA *et al.*, 1997; RIVERO-NAVA *et al.*, 2002). Este mesmo grupo de autores verificou maior freqüência de granulomas em camundongos neutropênicos após inoculação intracecal de trofozoítos. Os granulomas surgiram em menos de 24hs e continham trofozoítos, demonstrando que os neutrófilos são células importantes na resistência intestinal contra os trofozoítos (RIVERO-NAVA *et al.*, 2002). Granulomas hepáticos amebianos também foram observados no gerbil e hamster inoculados com *E. histolytica* (CHADEE e MEEROVITCH, 1984; GUTIÉRREZ-ALARCÓN *et al.*, 2006; TSUTSUMI *et al.*, 1984) e hamster inoculado com *E. dispar* (COSTA, C., 2005), entre o 2º e o 4º dia de infecção. O surgimento de granulomas indica a persistência do parasito no hospedeiro, bem como a ineficácia da imunidade inata em eliminar completamente os trofozoítos.

No presente estudo, alguns granulomas epitelióides em fase inicial também foram encontrados nos animais inoculados com a cepa axênica de *E. histolytica*, associados a um infiltrado inflamatório geralmente discreto, constituído por neutrófilos e macrófagos. Há poucos relatos da observação de granulomas na Amebíase experimental murina (RIVERO-NAVA *et al.*, 2002). Os mecanismos e citocinas envolvidos na gênese dos granulomas amebianos são completamente desconhecidos. Neste modelo experimental, maior número de granulomas de diferentes estágios de amadurecimento poderá ser observado em períodos de infecção mais longos. Aliado à maior oferta de anticorpos monoclonais específicos para camundongo, o modelo oferece boas condições de estudo das citocinas e leucócitos envolvidos na inflamação granulomatosa amebiana.

Através das reações imuno-histoquímicas, trofozoítos foram identificados em todos os animais inoculados com as cepas de *E. histolytica* e de *E. dispar*. Os trofozoítos foram encontrados no interior da necrose e de granulomas, nos capilares sinusóides e, especialmente na borda da necrose principal. Não foram observadas diferenças quanto à distribuição dos trofozoítos entre os diferentes grupos, limitando-se apenas à quantidade de trofozoítos. Qualitativamente observou-se maior quantidade de trofozoítos nos animais inoculados com Ehax, que foi comprovada estatisticamente na comparação com todos os outros grupos de animais. Mesmo com maior número de trofozoítos e com uma correlação positiva entre este número e a área de lesão, este grupo não apresentou lesão significativamente superior aos animais inoculados com Ehm. Isto sugere que grandes quantidades de trofozoítos não seriam fundamentais para a ampliação da área de necrose. Os animais inoculados com as cepas Ehm e Edm1 apresentaram números estatisticamente semelhantes de trofozoítos. Seguindo o mesmo raciocínio, apesar da proporcionalidade do parasitismo entre estes dois grupos, a Ehm produziu qualitativamente necrose mais expressiva que a Edm1. Diante destes resultados e, quando mencionamos novamente a comparação entre a intensidade de inflamação e a área de necrose nos grupos Ehax, Ehm e Edm1, surgem indícios de que a inflamação é importante na gênese da necrose. Diferentes autores têm demonstrado que, a despeito da rápida progressão da lesão hepática, o número de trofozoítos vivos presentes na área de lesão não está relacionado à extensão da necrose. Grandes áreas de necrose hepática podem conter números abundantes ou baixos de trofozoítos. Mesmo um pequeno número de trofozoítos poderia liberar grande quantidade de produtos de secreção e ativar a resposta inflamatória do hospedeiro de maneira suficiente a produzir lesão intensa (STANLEY, 2003). Isto sugere que além dos produtos de secreção das amebas, enzimas secretadas pelas células inflamatórias vivas e as liberadas de leucócitos destruídos podem estar envolvidas no desenvolvimento da necrose amebiana (PACHECO-YÉPEZ *et al.*, 2001; VENTURA-JUÁREZ *et al.* 1997).

Regiões positivas para antígenos de trofozoítos foram observadas na necrose e próximas a regiões íntegras, no infiltrado inflamatório e em hepatócitos lesados, em todos os grupos de animais inoculados com as cepas de *E. histolytica* e de *E. dispar*. Trabalhos anteriores relataram que a lectina Gal/GalNac secretada pela *E. histolytica* foi detectada no interior e na superfície de células lesadas, tanto humanas quanto de hamsters, na superfície de trofozoítos e no meio extracelular (PACHECO *et al.*, 2004; VENTURA-JUAREZ *et al.*, 1997). Também são liberadas pelos trofozoítos de *E. histolytica* as CPs, especialmente a CP neutra de 56 kD, para que possam destruir componentes da MEC e invadir os tecidos (REED

et al., 1989). A marcação contra antígenos de trofozoítos, observada nos hepatócitos lesados e áreas de necrose, foi de aspecto morfológico semelhante ao obtido pelos autores descritos acima. Estes aspectos imuno-histoquímicos sugerem a presença de material amebiano secretado no parênquima hepático de todos os grupos de animais. Com relação à marcação imuno-histoquímica de aspecto granuloso, seu aspecto morfológico sugere fortemente ser originada de trofozoítos destruídos.

Diante da impossibilidade de quantificar separadamente as áreas de aspecto amorfo e granuloso, não foi possível realizar análises estatísticas a fim de obter conclusões concretas. A quantificação em conjunto destas marcações não mostrou diferença estatística entre todos os grupos de animais. Apesar disso, qualitativamente foram observadas maiores áreas de marcações granulosas nos animais inoculadas com *E. dispar*. A menor capacidade de evasão desta espécie de ameba justificaria a sua destruição mais eficaz, por um infiltrado inflamatório visivelmente maior nestes dois grupos, gerando maior quantidade de marcação granulosa.

Associado à necrose amebiana, frequentemente é encontrado um escasso infiltrado inflamatório constituído de neutrófilos e macrófagos e, poucos linfócitos (VENTURA-JUAREZ *et al.*, 2003). Alguns estudos mostraram que o neutrófilo não é uma célula primordial na resistência contra os trofozoítos. Camundongos BALB/c neutrófilo-depletados apresentaram redução do número de trofozoítos viáveis no conteúdo fecal (RIVERO-NAVA *et al.*, 2002). Isso indica que outros agentes foram responsáveis pela eliminação dos trofozoítos neste modelo experimental. Por outro lado, a inoculação de *E. histolytica* em camundongos CBA, produziu resultado oposto mediante depleção de neutrófilos, com maior quantidade de trofozoítos na mucosa e lesões mais graves (ASGHARPOUR *et al.*, 2005). A utilização de camundongos tratados com anticorpo anti-neutrófilo produziu alta frequência de lesões, sugerindo um importante papel dos neutrófilos na imunidade contra os trofozoítos (RIVERO-NAVA *et al.*, 1997).

Perfis elevados de citocinas Th1 parecem estar relacionados a mecanismos eficientes de cura dos abscessos hepáticos (CAMPBELL; CHADEE, 1997). Macrófagos ativados após estimulação via interferon-gama (IFN- γ) mostraram capacidade de destruir trofozoítos através da produção de NO (DENIS; GHADIRIAN, 1992) e quando estimulados com proteínas amebianas, macrófagos isolados de abscessos hepáticos produziram grandes concentrações de TNF (WANG, 1992). Estudos relataram que IFN γ , TNF α e MCSF-1 aumentam o efeito amebicida de monócitos, macrófagos peritoneais e células de Kupffer de camundongos. A morte da ameba seria contato-dependente, envolvendo a produção de

radicais livres do O₂ e N₂ (SEYDEL *et al.*, 2000), ou contato-independente (VENTURA-JUAREZ *et al.*, 2003). Outros estudos em animais deficientes em IL-12, IFN- γ e NO demonstraram a mesma intensidade de parasitismo e inflamação encontrados nos animais controles (HOUPY, 2002).

A imunidade do hospedeiro contra as amebas no fígado e no epitélio do cólon é provavelmente dependente de muitos fatores e pode envolver a interação tanto de produtos amebianos quanto das citocinas e os componentes do complemento (REED *et al.*, 1995). Imunoglobulinas e componentes do complemento de ambas as vias clássica e alternativa foram mensurados no soro de pacientes com necrose hepática amebiana. Os resultados mostraram que a via alternativa é estimulada durante toda a progressão da necrose (OYEYINKA; ONYEMELUKWE, 1983).

Também foi objetivo deste estudo, avaliar a deposição do componente C9 do complemento, especialmente nos trofozoítos, através da contagem do número de parasitos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾. Dentre os produtos tóxicos produzidos pelos trofozoítos, destacam-se as CPs que são capazes de ativar a via alternativa do complemento através da clivagem do componente C3 (REED *et al.*, 1989). Diante da maior capacidade da *E. histolytica* em secretar quantidades significativamente superiores de CPs em relação à *E. dispar* (QUE; REED, 2000), espera-se que a espécie patogênica seja mais eficiente em ativar o complemento. Por outro lado, sua capacidade de destruir os componentes C3a e C5a, bem como a de impedir a atuação do complexo de ataque à membrana, mostra que esta espécie seria eficiente em escapar dessa modalidade de imunidade inata (BRAGA *et al.*, 1992; REED *et al.*, 1995). Nos dois grupos de animais inoculados com *E. histolytica* foram observadas maiores áreas de marcação C9⁽⁺⁾ na necrose e, no parênquima hepático normal e lesado, quando comparada com os grupos inoculados com *E. dispar*. É provável que a diferença seja devida a uma menor capacidade de secreção de CPs pela *E. dispar*, apesar de alguns autores terem verificado que o componente C3 do complemento é altamente sensível à clivagem promovida por estas proteases. Isso significa que, mesmo produzindo baixas concentrações desta enzima, a ativação da via alternativa ocorreria em elevada magnitude (REED; GIGLI, 1990).

A maior atividade das CPs da *E. histolytica* também poderia explicar o maior número percentual de trofozoítos C9⁽⁺⁾ nos animais inoculados com esta espécie, principalmente com a cepa Ehm, onde 83% dos trofozoítos eram positivos para componente C9. Apesar desta grande positividade, os animais destes grupos não apresentaram áreas significativas de marcações granuladas anti-trofozoítos, o que indicaria destruição dos parasitos. De fato, correlação positiva foi encontrada entre a área de necrose e o número de

trofozoítos C9⁽⁺⁾ nos animais inoculados com a Ehax, indicando que a maioria destes trofozoítos não foi destruída. Tal observação está de acordo com outros estudos que mostram a resistência à lise pelo complemento *in vivo* (JARILLO-LUNA *et al.*, 2002). Por outro lado, um estudo usando isolados frescos de pacientes infectados com amebas de ambas as espécies mostrou que não há muitas diferenças no comportamento destas amebas frente ao complemento, sendo as duas destruídas *in vitro* (WALDERICH *et al.*, 1997). Outros isolados de amebas de pacientes com colite ou necrose hepática foram resistentes à lise “*in vitro*”, apesar de promoverem a ativação do complemento (REED *et al.*, 1986).

A correlação positiva verificada nos animais inoculados com a cepa Edm1 em relação ao número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ e a área de lesão mostra que, quanto mais trofozoítos C9⁽⁺⁾ forem destruídos, proporcionalmente maior será o número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ e maior a liberação de produtos tóxicos amebianos que ampliarão a zona de destruição. Seguindo o mesmo raciocínio, também houve indício da maior destruição de trofozoítos pela ação do complemento nos animais inoculados com a cepa Edm2, devido à correlação positiva entre o número de trofozoítos C9⁽⁻⁾ e a área de antígenos. Ou seja, a destruição de trofozoítos C9⁽⁺⁾ elevaria o número de C9⁽⁻⁾ e a área de antígenos. A menor capacidade de evasão da *E. dispar* em relação ao complemento parece estar relacionada à menor concentração da lectina Gal/GalNac específica e às mudanças em sua conformação, comparada com a lectina da *E. histolytica* (PILLAI *et al.*, 2001). O infiltrado inflamatório mais expressivo nestes animais, aliado ao pequeno número de trofozoítos, ressalta a importância das células inflamatórias na eliminação dos parasitos.

Diferentes autores têm demonstrado que o complemento não é fundamental na imunidade contra a Amebíase. A indução de isquemia hepática focal e de hipocomplementenemia mediante uso de veneno de cobra mostrou que, em ausência do complemento, as lesões foram semelhantes às produzidas nos controles (OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004). Entretanto, os resultados não se mostraram consistentes pelo fato dos autores não terem mensurado as lesões e nem contado os trofozoítos. Quando os trofozoítos são inoculados parece haver uma seleção dos parasitos menos resistentes à ação do complemento. A inoculação intra-portal de trofozoítos marcados com radioatividade mostrou que a maioria deles é destruído entre 6 e 12 horas após a inoculação (RIGOTHIER *et al.*, 2002). Neste intervalo de tempo, a maioria dos focos inflamatórios não possuía parasitos e, os sobreviventes seriam os responsáveis pela evolução da lesão. É provável que as cepas de amebas sejam constituídas de populações mistas de trofozoítos, contendo parasitos resistentes e sensíveis (WALDERICH *et al.*, 1997). Paradoxalmente, a infecção de hamsters

leucopênicos não resultou em abscesso hepático e, os trofozoítos somente foram encontrados até 6 horas após a infecção, demonstrando que os supostos parasitos resistentes ainda dependeriam da presença de processo inflamatório para manter a infecção (OLIVOS-GARCIA *et al.*, 2004).

Apesar das diferenças qualitativas observadas entre os grupos de animais inoculados e o número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾, diferença estatística foi verificada apenas nos animais inoculados com a cepa Ehm. Conforme comentado anteriormente, a presença das bactérias aumenta a virulência da cepa e, provavelmente, pode aumentar a secreção de CPs, levando a uma maior ativação do complemento. Diante de sua capacidade de evadir da ação do complexo de ataque, a quantidade de trofozoítos destruídos seria menor. De fato, este grupo de animais não apresentou grandes áreas de marcação granulosa anti-trofozoíto.

Além das diferentes possibilidades acima discutidas sobre a patogênese da Amebíase, há autores que relacionam a capacidade do hospedeiro em reconhecer ou não os padrões moleculares amebianos com o surgimento das lesões amebianas (CAMPOS-RODRÍGUEZ; JARILLO-LUNA, 2005). A doença assintomática seria resultante do não-reconhecimento destas moléculas. Dependendo da espécie infectada, o reconhecimento e subsequente atuação da imunidade inata poderiam ou não evoluir para a Amebíase sintomática.

6 CONCLUSÕES

- A *E. dispar* é capaz de produzir necrose hepática em camundongos com aspectos morfológicos semelhantes à produzida por *E. histolytica*.
- O tipo de cultivo não interferiu na virulência da cepa de *E. histolytica*.
- A resposta inflamatória pode contribuir para aumentar a área de necrose amebiana.
- A *E. histolytica* foi mais eficaz em ativar o complemento *in vivo* do que a *E. dispar*.
- O complemento foi mais eficaz em destruir a *E. dispar in vivo* do que a *E. histolytica*.

REFERÊNCIAS

ACKERS, J.; MIRELMAN, D. Report on the 2nd EMBO workshop on “Pathogenesis of Amoebiasis: from genomics to disease” held at Ein Gedi, Israel, nov 16-20, 2004. *Exp. Parasitol.*, New York, v. 110, p. 170-172, 2005.

ABD-ALLA *et al.* Mucosal immunity to asymptomatic *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection is associated with a peak intestinal anti-lectin immunoglobulin A antibody response. *Infect Immun.*, v. 74, p. 3897-3903, 2006.

AGREZ, M. *et al.* Rectal cancer masquerading as an amoeboma: case report and review of the literature. *ANZ. J. Surg.*, Carlton, v. 74, p. 812-815, 2004.

AGUIRRE-GARCÍA, M.M., ANAYA-RUIZ, M., TALAMÁS-ROHANA, P. Membrane-bound acid phosphatase (MAP) from *Entamoeba histolytica* has phosphotyrosine phosphatase activity and disrupts the actin cytoskeleton of host cells. *Parasitology*, London, v. 126, p. 195-202, 2003.

AKISU, C. *et al.* Effect of human milk and colostrum on *Entamoeba histolytica*. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v.10, p. 741-742, 2004.

AMARAPURKAR, D.N., PATEL, N., AMARAPURKAR, A.D. Amoebic Liver Abscess. *J. Hepatol.*, Amsterdam, v. 39, p. 291-296, 2003.

ASGHARPOUR, A. *et al.* Resistance to *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. *Infect. Immun.*, Washington, v. 73, n 8, p. 4522-4529, aug. 2005.

BANSAL, D. *et al.* Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 27, p. 37-43, 2005.

BEKKER-MENDEZ, V.C. *et al.* Downregulation of selected cytokines in Amebiasis. *Arch. Med. Res.*, México, v. 37, p. 556-558, 2006.

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.*, Oxford, v. 44, p. 33-43, 2007.

BRACHA, R. *et al.* Antisense inhibition of amoebapore expression in *Entamoeba histolytica* causes a decrease in amoebic virulence. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v.34, p. 463-472, 1999.

BRAGA, L.L. *et al.* Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 90, p. 1131-1137, sept. 1992.

BRUCHHAUS, I., RICHTER, S., TANNICH, E. Removal of hydrogen peroxide by the 29-kDa protein of *Entamoeba histolytica*. *Biochem. J.*, London, v. 326, p. 785-789, 1997.

BRUHN, H. *et al.* Amoebapores and NK-lisin, members of a class of structurally distinct antimicrobial and cytotoxic peptides from protozoa and mammals: a comparative functional analysis. *Biochem. J.*, London, v. 375, p. 737-744, 2003.

BRUMPT, E. Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp., amibe a kystes quadrinuclées, Parasite de l'homme. *Bull. Acad. Natl. Med.*, Paris, v. 44, p. 943, 1925 *apud* WALSH, J. A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v. 8, p. 228-238, 1986.

CALDERON, J., SCHEREIBER, RD. Activacion of the Alternative and Classical Complement Pathways by *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, Washington, v. 50, p. 560-565, 1985.

CALIARI, M.V. *Principios básicos de morfometria digital: KS 300 para iniciantes*. 1 ed, Belo Horizonte, Ed. UFMG, 1997. 149p.

CALIARI, M. V. *et al.* Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy *Virchows Arch.*, Berlin, v. 441, p. 69-76, 2002.

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, v.175, p. 1176-1183, 1997.

CAMPBELL, D., MANN, B.J., CHADEE K. A subunit vaccine candidate region of the *Entamoeba histolytica* galactose-adherence lectin promotes interleukin-12 gene transcription and protein production in human macrophages. *Eur. J. Immunol.* Weinheim, v. 30, p. 423-430, 2000.

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

CARRERO, J.C. *et al.* The role of the secretory immune response in the infection by *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 29, p. 331-338, 2007.

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

CHOI, M-H. *et al.* An usual surface peroxirredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attack. *Mol. Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 143, p. 80-89, 2005.

CLARK, C.G. Amoebic disease: *Entamoeba dispar*, an organism reborn. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 92, p. 361-364, feb. 1998.

COSTA, A.O. *et al.* Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch. Med. Res.*, México, v. 31, S247-S248, 2000.

COSTA, C.A.X. *Análise histopatológica, imuno-histoquímica e morfométrica de lesões hepáticas experimentais induzidas pela Entamoeba histolytica e Entamoeba dispar.* 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Patologia) Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

COSTA, C.A.X. *et al.* Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*, Paris, v.14, 2007. In press

COUNCILMAN, W. T.; LAFLEUR, H. A. Amebic dysentery. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, Baltimore, v. 2, p. 395-548, 1891 *apud* JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 28, p. 181- 186, 1998.

DENIS, M., GHADIRIAN, E. Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.*, London, v. 12, p. 193-198, march, 1992.

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

DIAMOND, L.S., CLARK, C.G.; CUNNICK, C.C. YI-S, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, Lawrence, v. 42, p. 277-278, 1995.

DODSON, J.M. *et al.* Comparison of adherente, citotoxicity, and Gal/GalNac lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitol. Int.*, Ámsterdam, v. 46, p. 225-235, 1997.

ESPINOSA-CANTELLANO, M., GUTIERREZ, G. C., MARTINEZ-PALOMO, A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. *Arch. Med. Res.*, México, v. 28, S204-S206, 1997.

ESPINOSA-CANTELLANO, M. *et al.* *Entamoeba dispar*: ultraestrutura, surface properties and cytopathic effect. *J.Euk.Microbiol.*, Lawrence, v. 45, n 3, p. 265-272, 1998.

ESPINOSA-CANTELLANO, M., MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of Intestinal Amebiasis: from molecules to disease. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 13, p. 318-331, apr. 2000.

FREITAS, M. A. R. *Análise da Expressão diferencial de genes possivelmente envolvidos com a virulência em cepas de Entamoeba histolytica isoladas de diferentes casos clínicos.* 2007. ? f.Tese (Doutorado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FURST, C. *et al.* Biological aspects of a brazilian strain of *Entamoeba dispar*. *Pathologica*, Genova, v. 94, p. 22-27, 2002.

GHADIRIAN, E., MEEROVITCH, E. *In vitro* amoebicidal activity of immune cells. *Infect. Immun.*, Washington, v. 36, p. 243-246, apr. 1982.

GHOSH, PK. *et al.* Effect of bacterial association on virulence of *Entamoeba histolytica* to baby hamster kidney cell monolayers *Indian J. Exp. Biol.*, New Delhi, v. 36, p. 911-915, 1998.

GOMES, MA. *et al.* Virulence parameters in the characterization of strains of *Emtamoeba histolytica*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 39, p. 65-69, 1997a.

GOMES, MA. *et al.* LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. *Parasitology*, London, v. 114, p. 517-520, 1997b.

GOMES, M.A. *et al.* An improved method to distinguish *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Parasitology*, London, v. 119, p. 359-362, 1999.

GOMES M.A. *et al.* Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, and Molecular Parameters. *Arch. Méd. Res.*, México, v. 31, S249- S250, 2000.

GUTIÉRREZ-ALARCÓN, A. *et al.* *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2-expression in macrophages and trophozoites. *Exp. Parasitol.*, New York, v. 114, p. 154-159, 2006.

HAQUE, R. *et al.* Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the techlab *Entamoeba histolytica* II: antigen detection and antibody tests. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, p. 3235-3239, sept. 2000.

HAQUE, R. *et al.* Amebiasis. *N. Engl. J. Méd.*, Boston, v. 348, p. 1565-1573, mar. 2003.

HOUPT, E.R. *et al.* The mouse model of amebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4⁺ T cells. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 169, p. 4496-4503, 2002.

HUANG, Y. *et al.* Defining the CD59-C9 binding interaction. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 281, p. 27398-27404, sept. 2006.

HULDT, G. *et al.* Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature*, London, v. 277, p. 214-216, jan. 1979.

HUSTON, C.D. *et al.* Caspase 3-dependent killing of host cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.*, Oxford, v. 2, p. 617-625, 2000.

HUSTON, C.D. *et al.* Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the Parasite *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.*, Washington, v. 71, p. 964-972, 2003.

HUSTON, C.D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 20, n 1, jan. 2004.

JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 28, p. 181- 186, 1998.

JACOBS, L. The elimination of viable bacteria from cultures of *Entamoeba histolytica* and subsequent maintenance of such cultures. *Am. J. Hyg.*, Baltimore v. 46, p. 172-176, 1947 *apud* MIRELMAN, D. Ameba-bacterium relationship in Amebiasis. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 51, p. 272-284, 1987.

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, v. 101, p. 40-56, 2002.

LABRUYÈRE, E., GUILLÉN, N. Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch. Med. Res.*, México, v. 37, p. 253-258, 2006.

LEIPPE, M. *et al.* Comparison of pore forming peptides from pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Mol. and Biochem. Parasitol.*, Amsterdam, v. 59, p. 101-110, 1993.

LYNCH, E.C., ROSENBERG, I.M., GITLER, C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. *EMBO J.*, Oxford, v. 1, p. 801-804, 1982.

LÓPEZ-VANCELL, R., MONTFORT, I., PÉREZ-TAMAYO, R. Galactose-specific adhesion and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica*. *Parasitol. Res.*, Berlin, v. 86, p. 226-231, 2000.

LOSH, F.D. Massenhafte entwicklung von amoben im dikkarm. *Anat Physiol*, v. 65, p. 196-211, 1875 *apud* JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 28, p. 181- 186, 1998.

LOTTER, H., TANNICH, E. The current status of an Amebiasis vaccine. *Arch. Med. Res.*, México, v. 37, p. 292-296, 2006.

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

MANN, B.J. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Int. Rev. Cytol.*, New York, v. 216, p. 59-80, 2002.

MIRELMAN, D. Ameba-bacterium relationship in Amebiasis. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 51, p. 272-284, june, 1987.

MOODY, S. *et al.* Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology*, London, v. 114, p. 95-104, 1997.

NINOMYA, H., SIMS, P.J. The human complement regulatory protein CD59 binds to the α -chain of C8 and to the "b" domain of C9. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, p. 13675-13680, July. 1992.

OLIVOS-GARCÍA, A. *et al.* Inflammation, complement, ischemia and amebic survival in acute experimental amoebic liver abscess in hamsters. *Exp. Mol. Pathol.*, New York, v. 77, p. 66-71, 2004.

OMS (WHO). Report of a consultation of experts on Amoebiasis (México), Weekly Epidemiological Record, Geneva, v. 72, p. 97-100, Apr. 1997.

OYEYINKA, G.O., ONYEMELUKUWE, G.C. Amoebic liver abscess: serum immunoglobulins and complement in Northern Nigerian patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, Liverpool, v. 77, p. 293-296, 1983.

PACHECO, J. *et al.* *In vitro* and *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol Int.*, Amsterdam, v. 53, p. 35-47, Mar. 2004.

PACHECO-YÉPEZ, J. *et al.* *Entamoeba histolytica* production of nitric oxide and *in situ* activity of NADPH diaphorase in amebic liver abscess of hamsters. *Parasitol. Res.*, Amsterdam, v. 87, p. 49-56, 2001.

PÉREZ-TAMAYO, R. *et al.* Pathogenesis of acute experimental liver Amebiasis. *Arch. Med. Res.*, México, v. 37, p. 203-209, 2006.

PETRI JR, W.A. *et al.* Recognition of the galactose or N-Acetylgalactosamine-binding lectin of *Entamoeba histolytica* by human immune sera. *Infect. Immun.*, Washington, v. 55, p. 2327-2331, Oct. 1987.

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

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

QUE, X., REED, S. L. Cysteine Proteinases and the pathogenesis of Amebiasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 13, p. 196-206, Apr. 2000.

RAMIREZ-EMILIANO, J. *et al.* Participación del óxido nítrico durante el desarrollo del absceso hepático amebiano. *Medicina (B. Aires)*, Buenos Aires, v. 67, p. 167-176, 2007.

REED, S.L. *et al.* Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 136, p. 2265-2270, mar. 1986.

REED, S.L. *et al.* Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 143, p. 189-195, july. 1989.

REED, S.L., GIGLI, I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by activated terminal complement components. *J. Clin. Invest.*, New Haven, v. 86, p. 1815-1822, dec. 1990.

REED, S.L. *et al.* The extracellular neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* degrades anaphylatoxins C3a and C5a. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 155, p. 266-274, 1995.

RIGOTHIER, M.C. *et al.* Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infect. Immun.*, Washington, v. 70, p. 3208-3215, june. 2002.

RIVERO-NAVA, L., AGUIRRE-GARCÍA, J., CALDERON, J. Production of amebic intestinal lesions in BALB/c mice. *Arch. Méd. Res.*, México, v. 28, S220-S222, 1997.

RIVERO-NAVA, L. *et al.* *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Exp. Parasitol.*, New York, v. 101, p. 183-192, 2002.

ROGERS, L. Amoebic liver abscess: its pathology, prevention, and cure. *Lancet*, London, v.1, p. 463-469, 1922 *apud* TSUTSUMI, V. *et al.* Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 117, p. 81-91, 1984.

SARGEAUNT, P. G., WILLIAMS, J. E., GRENE, J. D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 72, p. 519-521, 1978.

SÉGUIN, R. *et al.* Identification of the galactose-adherence lectin epitopes of *Entamoeba histolytica* that stimulate tumor necrosis factor- α production by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 92, p. 12175- 12179, 1995.

SÉGUIN, R. *et al.* The tumor necrosis factor alpha-stimulating region of galactose-inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* activates gamma interferon-primed macrophages for amebicidal activity mediated by nitric oxide. *Infect. Immun.*, Washington, v. 65, p. 2522-2527, 1997.

SEYDEL, K.B. *et al.* Human intestinal epithelial cells produce pro-inflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect. Immun.*, Washington, v. 65, p. 1631-1639, may. 1997a.

SEYDEL, K.B., ZHANG, T., STANLEY JR, S.L. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscess in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.*, Washington, v. 65, p. 3951-3953, sept. 1997b.

SEYDEL, K.B., SMITH, S.J., STANLEY, J.R. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infect. Immun.*, Washington, p. 400-402, jan. 2000.

SCHAUDIN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden (Vorläufige mittheilung). *Arbeiten der Kaiserlichen*, v. 19, p.547-576, 1903 *apud* JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. *Int. J. Parasitol.*, Oxford, v. 28, p. 181- 186, 1998.

SHAFFER, J. G., FRYE, W. W. Studies on the growth requirements of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Hyg.*, Baltimore, v. 47, p. 214-221, 1948 *apud* MIRELMAN, D. Ameba-bacterium relationship in Amebiasis. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 51, p. 272-284, 1987.

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

SILVA, E.F. *Entamoeba moshkovskii* TSHALAI, 1941: *Novos focos na América do Sul; aspectos da morfologia e biologia em comparação com a Entamoeba histolytica* SCHAUDIN, 1903 e *Entamoeba ranarum* GRASSI, 1879. 1972. 142f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1972.

SILVA, EF, GOMES, MA, MARTINEZ, AMB. *Entamoeba histolytica*: Axenization and characterization of isolated samples from symptomatic and asymptomatic patients from different regions of Brazil. *Arch. Med. Res.*, México, v. 28, p. 288-289, 1997.

STANLEY JR, S.L. *et al.* The serine-rich *Entamoeba histolytica* protein is a phosphorylated membrane protein containing O-linked terminal N-Acetylglucosamine residues. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 270, p. 4121-4126, 1995a.

STANLEY JR, S.L. *et al.* Role of the *Entamoeba histolytica* cysteine proteinase in amebic liver abscess formation in severe combined immunodeficient mice. *Infect. Immun.*, Washington, v. 63, p. 1587-1590, apr. 1995.

STANLEY JR, S.L. Patophysiology of Amoebiasis. *Trends Parasitol.*, Oxford, v. 17, p. 280-285, june. 2001.

STANLEY JR., S.L., REED, S.L. *Entamoeba histolytica*: Parasite-host interactions. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, Bethesda, v. 280, G1049-G1054, 2001.

STANLEY JR, S.L. Amoebiasis. *Lancet*, London, v. 361, p. 1025-1032, mar. 2003.

TACHIBANA, H. *et al.* Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, v. 11, p. 216-218, jan. 2004.

TANIMOTO, M. *et al.* Lesiones producidas en el hígado de hamster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada em medio axénico. *Arch. Invest. Méd. (Mex 2)*, México, Suppl. 1, 275-284, 1971.

TANNICH, E. *et al.* Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, Washington, v. 86, p. 5118-5122, 1989.

TAVARES, P., SANSONETTI, P., GUILLÉN, N. Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin. *Microbes Infect.*, Paris, v. 2, p. 643-649, 2000.

TAVARES, P. *et al.* Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. *Infect. Immun.*, Washington, v. 73, p. 1771-1778, mar. 2005.

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

TSUTSUMI, V. *et al.* Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 117, p. 81-91, 1984.

TSUTSUMI, V., MARTINEZ-PALOMO, A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis an ultrastructural study. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 103, p. 112-119, jan. 1988.

TSUTSUMI, V., SHIBAYAMA, M. Experimental Amebiasis: a selected review of some *in vivo* models. *Arch. Med. Res.*, México, v. 37, p. 210-220, 2006.

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

VELÁQUEZ, C. *et al.* Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 20, p. 255-262, 1998.

VENTURA-JUÁREZ, J. *et al.* Early *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* trophozoites with hepatic parenchymal and inflammatory cells of hamster. *Arch. Med. Res.*, México, v. 28, S211-S213, 1997.

VENTURA-JUÁREZ, J. *et al.* Human amoebic hepatic abscess: *in situ* interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 25, p. 503-511, 2003.

VINAYAK, V.K. *et al.* Specific Circulating immune complexes in amebic liver abscess. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 23, p. 1088-1090, june. 1986.

WALDERICH, B., WEBER, A., KNOBLOCH, J. Sensivity of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* patient isolates to human complement. *Parasite Immunol.*, Oxford, v. 19, p. 265-271, 1997.

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

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

ZAKI, M., ANDREW, N., INSALL, R.H. *Entamoeba histolytica* cell movement: A central role for self-generated chemokines and chemorepellents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, v. 103, n 49, p. 18751-18756, dec. 2006.

ZHANG, Z *et al.* *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases with interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) activity cause intestinal inflammation and tissue damage in amebiasis. *Mol. Microbiol.*, Oxford, v. 37, p. 542-548, 2000.

ZHANG, Z. *et al.* Tumor Necrosis Factor alpha is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse-human intestinal xenograft model of disease. *Infect. Immun.*, Washington, v. 71, p. 5355-5359, sept. 2003.

