

1 Introdução

A amebíase é causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica* que eventualmente habita o intestino grosso do homem, podendo produzir desde colonização assintomática até infecções invasivas graves com diarreia sanguinolenta e ainda disseminar para outros órgãos, sendo o abscesso hepático amebiano a forma mais freqüente de Amebíase extra-intestinal (VELAZQUEZ *et al.*, 1998, AMARAPURKAR *et al.*, 2005). Os fatores que desencadeiam essa invasão ainda são desconhecidos (WHO, 1997).

Para explicar como a maioria dos infectados eram assintomáticos, surgiram várias teorias, como a de DOBELL em 1919 que propôs ser a *E. histolytica* um parasito invasivo e obrigatório dos tecidos podendo provocar amebíase sintomática ou assintomática e, a teoria dualista de EMILE BRUMPT (1925), que sugeriu a existência de duas espécies de amebas, a *E. dysenteriae* (patogênica) e outra não-patogênica, denominada de *E. dispar*. Também foi formulada a teoria pluralista que admitia ser a *E. histolytica* composta por diferentes cepas com graus variados de virulência (HOARE, 1961). Apenas em 1993 é que foi comprovada a existência de dois organismos distintos envolvidos na amebíase: *Entamoeba histolytica* (patogênica) e *Entamoeba dispar* (não-patogênica) (DIAMOND & CLARK, 1993). Alguns autores têm demonstrado que cepas de *E. dispar* isoladas de pacientes assintomáticos ou portadores de colite não-disentérica foram capazes de produzir lesões experimentais hepáticas e intestinais em hamsters (*Mesocricetus auratus*). As lesões eram discretas ou semelhantes às produzidas pela *E. histolytica* isolada de pacientes portadores de colite disenterica ou abscesso hepático amebiano

(COSTA *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2000, FURST *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2000).

A doença ocasiona morbidade e mortalidade significativas, afetando cerca de 50 milhões de pessoas e resultando na morte de aproximadamente 100.000, anualmente. Em todo o mundo é a segunda principal causa de morte por parasitoses (OMS, 1997; STANLEY-JR, 2003; PRITT & CLARK, 2008).

A amebíase no Brasil varia muito em sua sintomatologia nas diferentes regiões e também no número de indivíduos infectados. Há uma variação na incidência de acordo com a condição sanitária e sócio-econômica, principalmente quanto à infra-estrutura de água e esgoto (SILVA, *et al.* 1972, SILVA, *et al.* 1997). 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 grave (GOMES *et al.*, 2000). Nas demais regiões do mundo a amebíase atinge cerca de 10% da população.

O ciclo de vida da *E. histolytica* é simples, iniciando pela ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos, que desencistam no lúmen do intestino delgado e originam o metacisto (ameba com quatro núcleos). O metacisto sofre divisão binária formando os trofozoítos que migram para o intestino grosso (STANLEY, 2003). Neste local, os trofozoítos aderem ao muco colônico e às células epiteliais, podendo se reencistar no lúmen do colon, e serem excretados nas fezes, dando continuidade ao seu ciclo biológico (HUSTON, 2004).

1.1 Patogênese

Os trofozoítos após lisarem as células epiteliais intestinais, atravessam a mucosa, atingem a submucosa gerando zonas de necrose liquefativa que se fundem para formar úlceras. O tecido necrosado e as células normais do local da infecção liberam mediadores químicos que estimulam a migração principalmente de neutrófilos e macrófagos, que se acumulam especialmente nas bordas da lesão.

Em vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* têm sido demonstrado que diferentes tipos de produtos amebianos induzem a destruição celular, tais como os amebaporos, a lectina ligante de galactose/NAcetilgalactosamina (GAL/GALNAc), cisteína proteinases, fosfatases, lipofosfoglicanos (LPG) e lipofosfopeptideoglicanos (LPPG).

1.1.1 Amebaporos

São peptídeos membranolíticos com estrutura e função semelhantes às perforinas das células “natural killer” (NK) e dos linfócitos TCD8⁺ capazes de formar canais de íons ou poros em membranas lipídicas e de despolarizar as células alvo do hospedeiro (HUSTON *et al.*, 2000). A *Entamoeba dispar* também é capaz de produzir amebaporos com homologia de 95% em relação às produzidas pela *E. histolytica*. Contudo, a produção ocorre em menor concentração. Estudos *in vitro* mostraram que a *E. dispar* utiliza amebaporos para destruir bactérias fagocitadas (LEIPPE, 1997).

1.1.2 Lectina GAL/GALNAc

É uma lectina específica para resíduos de galactose/N-Acetilgalactosamina que promove a adesão dos trofozoítos de *E. histolytica* ao epitélio intestinal (MANN *et al.*, 2002). É uma molécula CD59-like, que impede o agrupamento do complexo C5b-9 na membrana do trofozoíto por possuir sequência similar e reatividade cruzada antigênica com o CD59, um antígeno leucocitário humano, impedindo que o trofozoíto seja destruído pela ação do complemento (BRAGA *et al.*, 1992). Há indícios que a molécula amebiana CD59-like induziria a apoptose através da ativação da caspase 3, independente do ligante de Fas e do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (BERNINGHAUSEN *et al.*, 1997). Os índices de apoptose no epitélio intestinal de camundongos inoculados com *E. histolytica* podem ser diminuídos pela ação dos inibidores de adesão dos trofozoítos como a D-galactose (HUSTON *et al.*, 2000). Esta lectina atua também como agente imunógeno através da estimulação da produção de óxido nítrico (NO), interleucina-12 (IL-12) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) por macrófagos ativados (CAMPBELL & CHADEE, 1997, BLASQUEZ *et al.*, 2006, BLASQUEZ *et al.*, 2008). A lectina GAL/GALNAc específica é muito semelhante entre as duas espécies (entre 86 e 79% de homologia). Contudo, a quantidade de lectina na superfície da *E. dispar* é inferior, o que explicaria a sua baixa capacidade de adesão à células *in vitro*.

1.1.3 Cisteína proteinases

São enzimas que iniciam sua atividade após a adesão ao epitélio intestinal, contribuindo para a destruição da mucosa colônica. Os trofozoítos

locomovem-se na matriz extracelular mediante a liberação de cisteína proteinases (CPs), que clivam o colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, eliminando obstáculos mecânicos para que os trofozoítos possam praticar a invasão tecidual (REED *et al.*, 1989; QUE & REED, 1997). As CPs também clivam o componente C3 do complemento, promovendo a sua ativação pela via alternativa, bem como ativam a enzima convertora de IL-1, estimulando sua produção e contribuindo para o desenvolvimento da resposta inflamatória (ZHANG, *et al.*, 2000). No entanto, as CPs parecem reduzir a migração leucocitária através da clivagem de C3a e C5a e, interferem com a imunidade humoral através da destruição de IgA e IgG (HUSTON, 2004).

Com a descrição do genoma da ameba, dez novas CPs com N-terminais preditos como ancoras de membranas foram identificadas na *E. histolytica* (LOFTUS, *et al.*, 2005). Somados aos já descritos, existem mais de 40 genes presentes neste organismo (SATO, *et al.*, 2006). Pouco ainda é sabido sobre as suas posições na membrana, se são expressos em todas as cepas e em diferentes condições de cultura.

Cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência apresentam diferentes níveis de expressão de CPs (BRUCHAUS, JACOBS, LEIPPE *et al.*, 1996; QUE & REED, 1997; TANNICH, 1998). Foi demonstrado que *E. dispar* produz pelo menos 4 CPs. Não sabemos se a *E. dispar* é capaz de produzir todos as CPs descritas para *E. histolytica*, especialmente a CP₁, CP₂ e CP₅, que constituem 90% das CPs produzidas. Destaque deve, ser dado a CP₅, capaz de romper a barreira do muco colônico sobre a molécula MUC2 e invadir as células epiteliais (LIDEL, *et al.*, 2006). A CP₅ é um bom exemplo de diferença no arsenal enzimático das duas espécies. Apesar de sua posição no

genoma da *E. dispar* estar preservada, este gene não é funcional (FREITAS *et al.*, 2004, ESPINOSA-CANTELLANO *et al.*, 1997). Contudo, nem sempre estas proteases foram fundamentais para induzir lesões experimentais através da inoculação de *E. histolytica* (QUE & REED, 2000).

1.1.4 Fosfatase ácida de membrana e Fosfatase ácida secretada

Foi descrita em amebas a existência de uma fosfatase ácida de membrana (MAP) e de uma fosfatase ácida secretada para o meio extracelular (SAP), as quais tem ação PTPase, ou seja, desfosforilam resíduos de tirosina. Ao desfosforilar proteínas do citoesqueleto e da explosão respiratória em macrófagos, as fosfatases ácidas reduziram a atividade macrofágica, contribuindo para resistência do parasito (AGUIRRES-GARCIA *et al.*, 2003). A MAP foi encontrada de forma similar na *E. histolytica* e na *E. dispar*, enquanto a SAP foi encontrada somente na *E. histolytica*, sugerindo que a *E. histolytica* talvez possa utilizar este mecanismo para evadir da ação do hospedeiro.

1.1.5 Lipofosfoglicanos (LPG) e Lipofosfopeptideoglicanos (LPPG)

MOODY *et al.* (1996) isolaram LPG e LPPG de cepas virulentas e avirulentas de *E. histolytica* e de cepas de *E. dispar*. Tais glicoconjugados recobrem os trofozoítos, funcionando como barreira contra a ativação do complemento e parecem colaborar com a citotoxicidade amebiana. Estudos preliminares mostraram que essa família de moléculas apresenta considerável polimorfismo entre as cepas de *E. histolytica* e que, ao invés de LPG de superfície citoplasmática, a *E. dispar* possui somente LPPG. Recentemente foram isolados antígenos derivados de LPPG da superfície da *E. histolytica*,

capazes de ativar células natural killer T (NKT), através de apresentação por células dendríticas (CD) (LOTTER, *et al*, 2006). No mesmo trabalho, os autores verificaram que camundongos deficientes em células NKT tiveram reduzida sua capacidade em controlar a infecção amebiana, desenvolvendo abscessos hepáticos amebianos maiores que os produzidos nos camundongos selvagens. A produção precoce de INF- γ pelas células NK T parece ser responsável pela redução de trofozoítos no fígado. Além disso, as células NK T, fazem a conexão entre a imunidade inata e adaptativa, devido a sua capacidade de iniciar a produção de grandes quantidades de IFN- γ e IL-4 que podem conduzir a resposta imune em qualquer uma das vias TH1 ou TH2 (LOTTER *et al.*, 2006).

1.2 Imunidade

1.2.1 Papel do complemento e dos anticorpos na amebíase

O sistema complemento é um importante componente do sistema imunológico inato, o qual gera fragmentos responsáveis pelo início de uma resposta inflamatória local, facilitando a remoção dos patógenos (BOHLSON, FRASER & TENNER, 2007, OYEYINKA *et al* 1983). Ambas as vias alternativa e clássica, podem participar no controle ao desenvolvimento da Amebíase em hospedeiros não imunizados (CALDERON *et al.*, 1985, HULDT *et al.*, 1979, REED *et al.*, 1986). Os trofozoítos estão continuamente sendo expostos ao complemento e ativando-o pela via alternativa através das CPs (REED & GIGLI, 1990, CAPIN *et al.*, 1978). A superfície da ameba também pode promover a ativação do complemento pela via clássica sem a participação de anticorpos específicos. Estudo *in vitro* realizado com a cepa HM1 de *E.*

histolytica avaliou a ativação das vias alternativa e clássica do complemento na ausência de anticorpos reativos a ameba. Os resultados mostraram que a *E. histolytica*, na ausência de bactéria, ativa ambas as vias em um soro humano não imunizado (CALDERON & SCHREIBER, 1985). Apesar de ativado o sistema complemento, a *E. histolytica* é capaz de resistir à morte pelo complexo de proteínas C5b9 através da lectina Gal/GalNac (BRAGA *et al.*, 1992; CAMPOS-RODRIGUES e JARILLO-LUNA, 2005).

Estudo *in vitro* mostrou que 90,3% dos trofozoítos de *E. histolytica* e 68,8% dos trofozoítos de *E. dispar* sofreram lise pelo complemento através da via alternativa (WALDERICH,1997). Contudo, outros autores demonstraram também em estudo *in vitro* que a *E. dispar* é resistente à via alternativa do complemento, enquanto a *E. histolytica* é lisada completamente (HAMELMANN, 1992).

A imunidade adaptativa é aquela resposta que evolui a cada exposição ao patógeno, podendo ser classificada em imunidade humoral (mediada por anticorpos) e imunidade celular (mediada pelos linfócitos T). Tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células estão envolvidas na patogênese da Amebíase (BANSAL *et al.*, 2005). Poucos estudos têm demonstrado que os anticorpos e o complemento são capazes de destruir trofozoítos de *E. histolytica in vitro* (ASGHARPOUR *et al.*,2005). Segundo alguns autores, a imunidade humoral parece não ser muito eficaz na eliminação das amebas *in vivo* (CAMPOS-RODRIGUES *et al.*, 2000). Apesar disso, o papel da ingestão do leite materno como proteção passiva na infância parece ser muito importante. Esse efeito protetor têm sido atribuído às propriedades anti-infectantes e anti-inflamatórias do leite humano (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 na mucosa (CARRERO *et al.*, 2007).

Na Amebíase sintomática e invasiva são regularmente produzidos anticorpos anti-ameba e, 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).

A incubação de cultura de trofozoítos de *E. histolytica* com ativadores do complemento (Inulina, zimozan, fator de veneno de cobra) e o soro de indivíduos normais produziram modificações na membrana e citoplasma das amebas, seguido de sua destruição (ORTIZ, 1978). O estudo demonstrou que o efeito citopático sobre os trofozoítos induzido por soro humano normal, é dependente da ativação da via alternativa do complemento. Foi observada uma diminuição significativa do C3 e um pequeno decréscimo do C1, C4 e C2 quando o cultivo foi tratado com ativadores do complemento, principalmente com zimozan, indicando que o sistema complemento foi ativado pela *E. histolytica* através da via alternativa.

1.2.2 Papel de neutrófilos e macrófagos na amebíase

A destruição do epitélio intestinal pelos trofozoítos facilita sua invasão para a submucosa e leva a uma migração de neutrófilos 24 horas após a

infecção (STANLEY, 2001). As lesões da amebíase aguda são caracterizadas pela presença de células inflamatórias, principalmente neutrófilos, que são recrutados por sinais pró-inflamatórios produzidos pelas células epiteliais e outras células do hospedeiro em resposta a infecção. Citocinas quimioatraentes pró-inflamatórias, incluindo IL-8, GRO- α , GM-CSF, IL-1 α e IL-6 são responsáveis pelo recrutamento dos neutrófilos. Após a adesão dos trofozoítos aos resíduos de GAL/NAcGAL nas células epiteliais intestinais, há liberação dos amebaporos pelos trofozoítos que se inserem na membrana plasmática, formando um canal iônico que provoca a morte celular (BRACHA *et al.*, 1999). O amebaporo também ativa a liberação do precursor de IL-1 β (pIL-1 β) que se torna ativo por ação de cisteína proteinases amebianas. A IL-1 β ativada induz a expressão do fator transcricional nuclear K- β (NF-k β) nas células epiteliais normais e liberação de mediadores químicos da inflamação como a interleucina-1 (IL-1), interleucina-8 (IL-8) e ciclooxigenase-2 (COX-2), promovendo a migração de macrófagos e neutrófilos (ZHANG *et al.*, 2000, GUTIÉRREZ-ALARCÓN *et al.*, 2006). Através dos amebaporos os trofozoítos podem destruir leucócitos que liberam seu conteúdo enzimático no meio extracelular, intensificando a necrose e a resposta inflamatória local.

Para estudar o papel dos neutrófilos na amebíase intestinal murina, camundongos foram previamente tratados com anticorpo monoclonal anti-neutrófilo e inoculados com *E. histolytica* pela via intracecal. A intensidade das lesões foi a mesma quando comparada com os animais controles, demonstrando que os neutrófilos não são fundamentais na imunidade contra os trofozoítos na amebíase intestinal (RIVERO-NAVA, 2002). Em contraste ao observado no intestino, foi verificado que os neutrófilos são importantes na

patogênese da amebíase hepática (VELASQUEZ et al., 1998, PÉREZ-TAMAYO et al., 2006).

Em lesões intestinais e hepáticas, o infiltrado inflamatório que acompanha a necrose amebiana humana varia de discreta a moderada e é constituído por neutrófilos, macrófagos e linfócitos (VENTURA-JUAREZ, et al. 2003, DENIS et al.,1992). Os macrófagos e os linfócitos T helper predominam na borda da lesão sem, contudo terem sido observados em contato direto com os trofozoítos. Os neutrófilos são escassos e os linfócitos T citotóxicos predominam na periferia, sendo atribuído aos últimos, um provável efeito imunossupressor que facilitaria a permanência do parasita no hospedeiro. 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). Os trofozoítos são também frequentemente encontrados em zonas sem necrose e infiltrados inflamatório. A inflamação e a necrose parecem ser necessárias para a sobrevivência da ameba e para a progressão da Amebíase hepática experimental em camundongos. A inoculação de *E. histolytica* em camundongos SCID deficientes de neutrófilos produziu abscessos amebianos maiores do que os observados em camundongos normais (SEYDEL, 2000). Contudo, o contrário foi observado por outros autores no abscesso hepático experimental do hamster (OLIVOS-GARCÍA et al., 2004). Foi sugerido que as células inflamatórias contribuem para o estabelecimento de necrose nas lesões intestinal e hepática durante os estágios iniciais das lesões amebianas. 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).

ZHANG *et al.*, 2003 observaram que a redução do TNF- α diminui a intensidade das lesões por levar a uma menor migração leucocitária e, a uma menor ativação macrófágica e neutrofílica. Através do tratamento prévio de ratos portadores de imunodeficiência combinada com anticorpos anti-TNF- α , os autores observaram redução efetiva da inflamação e dos danos à permeabilidade da barreira intestinal, tendo um papel primário na mediação da inflamação desencadeada pelos trofozoítos. Já em camundongos deficientes em NO foi observado que inoculação de *E. histolytica* produziu abscessos hepáticos maiores do que nos animais selvagens, demonstrando a importância dos macrófagos ativados na destruição dos trofozoítos e na redução das lesões amebianas (SEYDEL, 2000).

As proteínas amebianas solúveis (SAP) derivadas da *E. histolytica* são capazes de inibir a ativação de macrófagos. Foi proposto que as SAP's estimulam os macrófagos a produzirem prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno C₄ (LTC₄) e leucotrieno B₄ (LTB₄) que, por efeito autócrino, reduz a apresentação de antígenos e a ativação de linfócitos T helper (LTh). Já os macrófagos periféricos, por não terem sofrido contato com as SAP's, conseguem ser ativados e talvez possam contribuir para o surgimento de granulomas epitelióides (CAMPBELL *et al.*, 1997). Tais granulomas podem ser encontrados já no segundo dia após a inoculação intra-hepática de trofozoítos

(TSUTSUMI *et al.*, 1984), onde o infiltrado de células mononucleares acumulado no primeiro dia rapidamente começa a se organizar em granulomas com predomínio de células epitelióides. Em torno do sexto dia após a infecção, os granulomas já são bem organizados, constituídos por zona de necrose central, trofozoítos, paliçada de células epitelióides, tecido conjuntivo e linfócitos.

Os corticosteróides são capazes de reduzir a resposta inflamatória do tecido conjuntivo, seja de origem química, térmica, traumática, anafilática ou infecciosa, suprimindo ou diminuindo os sinais clássicos da inflamação (calor, tumor, rubor e dor). Além disso, tais drogas antiinflamatórias reduzem a migração de neutrófilos e monócitos ao tecido irritado, diminuem sua função fagocitária e estabilizam os lisossomas, prevenindo assim que as enzimas proteolíticas lisossômicas escapem e danifiquem as células vizinhas. Os corticosteróides também aumentam o tônus capilar e a permeabilidade seletiva, diminuindo a exsudação plasmática para os tecidos (BOOTH & MACDONALD, 1992). O uso da dexametasona, um corticosteróide potente com menor efeito mineralocorticóide, foi usado nesse estudo com o intuito de avaliar se a redução do processo inflamatório interfere no desenvolvimento da lesão e na proliferação dos parasitos.

1.3 Mecanismos de escape dos trofozoítos

Graças à sua virulência e aos seus mecanismos de escape, a *E. histolytica* consegue estabelecer a infecção no hospedeiro, produzindo a colite amebiana e abscesso hepático amebiano.

A *E. histolytica* é capaz de destruir o muco colônico através da ação das cisteína proteinases, especialmente pela CP₅ que lisa a mucoproteína 2 (MUC2) (LIDELL, *et al* 2006). Tais enzimas também são capazes de exercer ação lítica contra anticorpos IgA e IgG (QUE & REED, 1997). O influxo de leucócitos para a mucosa colônica é reduzido devido a destruição dos componentes C3a e C5a do complemento pelas cisteína proteinases, favorecendo a penetração dos trofozoítos na submucosa (REED *et al.*, 1995, QUE & REED, 2000).

A mesma molécula que o trofozoíto usa para aderir ao epitélio intestinal também é utilizada para protegê-lo contra o complemento. A lectina ligante de GAL/GALNAc inibe a formação do complexo C5b-9 ligando-se ao complexo C5b8 ou diretamente ao componente C9, impedindo a ativação do complemento e a destruição do trofozoíto (NINOMIYA & SIMS, 1982; HUANG *et al.*, 2006). Outro mecanismo inibidor da ação do complemento é a cobertura citoplasmática de glicosilfosfatidilinositol ancorado ao lipofosfoglicano (LPG) ou ao lipopeptideofosfoglicano (LPPG) do trofozoíto.

A ação de macrófagos sobre os trofozoítos pode ser reduzida desfosforilando resíduos de tirosina do citoesqueleto e de proteínas da explosão respiratória mediante a ação de fosfatases ácidas secretadas (SAP) pelos trofozoítos (AGUIRRES-GARCIA *et al.*, 2003). Proteínas solúveis derivadas dos trofozoítos produzem imunossupressão reduzindo a expressão de MHC-II em macrófagos, que leva a diminuição da ativação de linfócitos T e da produção de citocinas Th1. Tais proteínas também induzem a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), leucotrieno C4 (LTC₄) e leucotrieno B4 (LTB₄) que,

por efeito autócrino, também reduzem a apresentação de antígenos via MHC-II (CAMPBELL *et al.*, 1997).

A secreção pela *E. histolytica* do fator inibitório da locomoção de monócitos (MLIF), um pentapeptídeo anti-inflamatório, diminui a migração dos macrófagos para as regiões centrais das lesões amebianas onde abundam os trofozoítos. Entretanto, tal migração não é totalmente inibida, pois são encontrados macrófagos no infiltrado inflamatório amebiano (RICO, *et al.*, 2003).

2 Objetivos e Justificativas

Diante das dúvidas acerca do papel da imunidade na patogênese do abscesso hepático amebiano, foi objetivo geral deste trabalho avaliar o papel dos anticorpos, complemento, macrófagos e neutrófilos no perfil das lesões amebianas hepáticas em dois modelos experimentais. O estudo comparativo das lesões induzidas experimentalmente pela *E. histolytica* e pela *E. dispar* poderá auxiliar numa melhor compreensão da patogênese da amebíase.

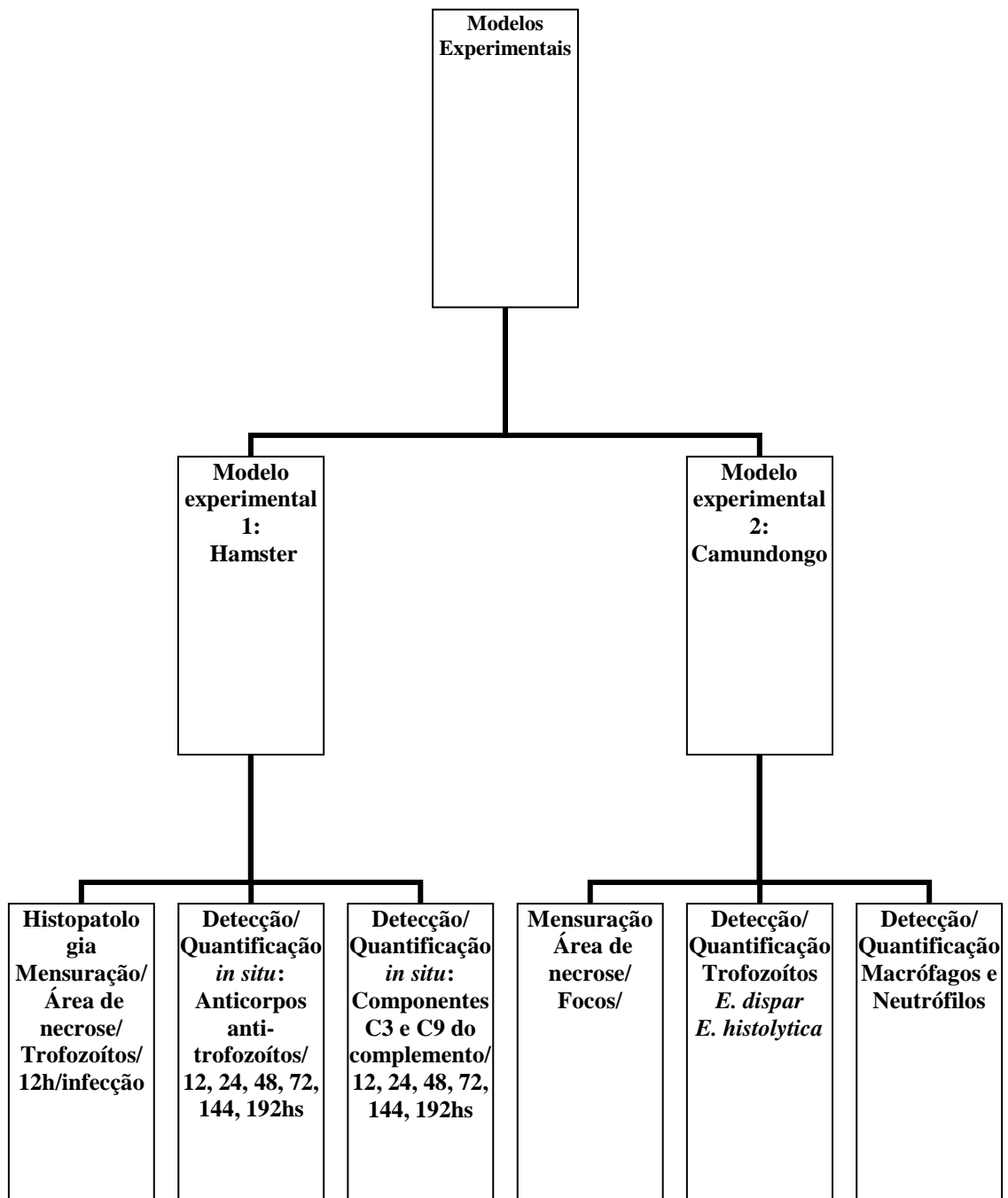
2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Modelo experimental nº 1: hamsters inoculados pela via intra-hepática com trofozoítos de *E. histolytica* ou *E. dispar* :

- Realizar análise histopatológica e quantitativa das áreas de necrose, bem como identificação imuno-histoquímica e quantificação dos trofozoítos, no fígado dos animais necropsiados com 12 horas de infecção.
- Identificação imuno-histoquímica e medida da expressão “in situ” de imunoglobulinas sobre a superfície dos trofozoítos nos períodos de 12, 24, 48, 72, 144 e 192 horas de infecção.
- Identificação imuno-histoquímica e quantificação dos trofozoítos positivos para os componentes C3 e C9 do complemento nos períodos de 12, 24, 48, 72, 144 e 192 horas de infecção.

2.1.2 Modelo experimental nº 2: camundongos Swiss tratados e não-tratados com dexametasona, inoculados pela via intra-hepática com trofozoítos de *E. histolytica* ou *E. dispar*

- Realizar análise histopatológica e quantitativa das áreas de necrose centrais e dos focos inflamatórios.
- Identificação imuno-histoquímica e quantificação dos trofozoítos de *E. histolytica* e de *E. dispar*.
- Identificação imuno-histoquímica e quantificação de macrófagos e neutrófilos nas lesões e no parênquima hepático normal.

Delineamento dos modelos experimentais:

3 Modelo experimental nº 1

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Animais utilizados

Foram utilizados no experimento 66 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos com idade aproximada de 30 dias e 1 rato para indução da lesão cardíaca por reperfusão. Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-UFMG).

3.1.2 Cepas de *Entamoeba dispar* e *Entamoeba histolytica* utilizadas.

As cepas MCR e EGG da *E. dispar* e *E. histolytica* respectivamente, foram isoladas no Laboratório de Amebíase do Departamento de Parasitologia do ICB-UFMG. A cepa MCR foi isolada em 1988 de paciente apresentando colite não disentérica e sorologia (Elisa) negativa para *E. histolytica*. O zimodema e o PCR identificaram a amostra como sendo de *E. dispar*. A cepa EGG foi também isolada em 1988 de paciente apresentando colite disentérica e necrose hepática amebiana. A sorologia (Elisa) foi positiva para *E. histolytica*. Através de PCR e da análise do zimodema a amostra foi identificada como *E. histolytica*.

3.1.3 Preparo do inóculo

Trofozoítos foram criopreservados em nitrogênio líquido pela técnica de abaixamento gradual a 1°C por minuto usando DMSO a 1% como crioprotetor.

Após o descongelamento das cepas em banho-maria à 37°C, por aproximadamente cinco minutos, estas foram colocadas em tubos com meio PAVLOVA modificado e foram para estufa à 37° C. Sua viabilidade foi analisada ao microscópio óptico sempre que realizado o repique, ou seja, a cada 48h. Quando as amebas alcançaram um crescimento próximo do ideal, foram transferidas para as garrafas e novamente voltaram para estufa até atingirem o crescimento máximo.

As garrafas foram colocadas em banho de gelo para as amebas destacarem-se do vidro, em seguida foi desprezado o sobrenadante, acrescentado PBS, centrifugado por cinco minutos e novamente desprezado o sobrenadante. 10ul do meio rico em amebas foram colocados na câmara de Newbauer onde os trofozoítos foram contados. O meio foi solubilizado com salina até atingir o inóculo de 100.000 trofozoítos/0.1ml.

3.1.4 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. Dois grupos de 30 hamsters cada foram inoculados diretamente no lobo esquerdo do órgão com 100.000 trofozoítos das cepas MCR de *E. dispar* ou EGG de *E. histolytica*.

3.1.5 Necrópsia e coleta de material

Diariamente os hamsters foram observados e 02 grupos de 05 animais cada foram sacrificados por deslocamento cervical 12 horas após a inoculação de ambas as cepas MCR ou EGG. Outros 10 grupos de 05 animais cada,

foram necropsiados 24, 48, 72, 144 e 192 horas após a infecção (COSTA *et al.*, 2007).

Foi realizada necrópsia e coletado o lobo esquerdo do fígado, onde a inoculação foi realizada. Todos os fragmentos foram fixados em formol tamponado 10% pH 7,2. Após o processamento em álcool e em xilol, os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados com 4 µm de espessura sempre na mesma posição e corados pela hematoxilina e eosina (H&E).

3.1.6 Reações imuno-histoquímicas

- Para trofozoítos;
- Para anticorpos anti-trofozoítos;
- Para componentes C3 e C9 do complemento;

Cortes histológicos das fatias de fígado foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 30 vv a 3,5% em 200ml 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 à 4°C. Os cortes foram incubados com os antisoros primários específicos (Tabela 1). Os anticorpos anti-componentes C3 e C9 do complemento de soro humano, foram produzidos em laboratório e gentilmente cedidos pelo Prof. Álvaro Cantini Nunes. Os anticorpos para detecção de trofozoítos e de anticorpos anti-trofozoítos foram produzidos e testados nos Laboratórios de Amebíase e de Protozooses.

Tabela 1: Reagentes imunológicos utilizados nas reações imunohistoquímicas do modelo 1.

Detecção	Antisoro 1 ^o	Antisoro 2 ^o	Estreptavidina
Trofozoítos	1:2000	1:200	1:200
	30min	30min	30min
	Temp.	Temp.	Temp.
	ambiente	ambiente	ambiente
Anticorpos anti-trofozoítos	1:50	1:200	1:200
	30min	30min	30min
	Temp.	Temp.	Temp.
	ambiente	ambiente	ambiente
Componente C3 do complemento	1:200	1:50	1:100
	16-18horas	30 min	30 min
	4 ^o C	4 ^o C	4 ^o C
Componente C9 do complemento	1:200	1:50	1:100
	16-18horas	30 min	30 min
	4 ^o C	4 ^o C	4 ^o C

Em seguida os cortes foram incubados com IgG biotinilada de cabra anti-IgG de rato (na detecção dos trofozoítos e anticorpos anti-trofozoítos) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA) ou IgG biotinilada de cabra anti-IgG de coelho (na detecção de C3 e C9) (Pharmingen, California, USA) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories). A marcação

foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40vv à 0,2%. Como controle positivo foram utilizados cortes de fígado ricos em trofozoítos e cortes de miocárdio submetido à lesão por reperfusão sanguínea, como descrito logo abaixo. Como controle negativo, o antisoro 1° 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.

3.1.7 Indução de lesão cardíaca por reperfusão

Sob anestesia com ketamina 10% e xilazina 2% (4:3, 0,1ml/100 gramas, i.p.), 1 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.

3.1.8 Análise morfométrica

Neste procedimento foram utilizadas as lâminas submetidas às reações imuno-histoquímicas. Todas as marcações positivas foram digitalizadas através da microcâmara JVC-TK1270 e quantificadas através do software KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss (CALIARI, 1997).

3.1.8.1 Análise quantitativa dos trofozoítos e da área de necrose

Em todos os cortes marcados para detecção específica de trofozoítos após 12 horas de infecção, 30 imagens aleatórias de cada lâmina foram digitalizadas através da objetiva de 40x (perfazendo um total de $16 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ de parênquima hepático analisado) para a contagem das amebas. Foram utilizados o teste de kruscall-wallis para avaliar diferenças no número de trofozoitos nos diferentes períodos de infecção e o teste de Spearman para avaliar uma provável correlação do número de trofozoítos com a expressão dos anticorpos anti-trofozoitos.

Nos cortes corados pela H&E as zonas de necrose foram digitalizadas através da objetiva de 10x e delimitadas interativamente com o auxílio do cursor para o cálculo da área. Os dados da contagem de trofozoítos e da medida da área de necrose após 24, 48, 72, 144 e 192 horas de infecção foram coletados em trabalho anterior (COSTA *et al.*, 2007).

3.1.8.2 Análise da expressão de anticorpos anti-trofozoítos sobre a superfície das amebas

- **Calibração do sistema óptico e de digitalização**

(a) O sinal RGB (*Red, Green, Blue*) da microcâmera CCD JVC-TK1270 foi desativado para permitir a captura em tons de cinza;

(b) O filtro de interferência GG495 (Schott, Mainz, Germany) foi usado para medir a densidade óptica no comprimento de onda de 500nm que é absorvido somente pelo produto de reação da DAB.

(c) O controle de ganho automático da microcâmera foi desativado;

(d) Os cortes foram contra-corados discretamente e as imagens foram capturadas com a objetiva de 40X;

(e) A abertura do condensador foi calibrada durante a iluminação Köhler;

- **Cálculo da densidade óptica (DO):**

Para a obtenção da DO foi utilizada uma rotina de programa constituída por uma seqüência de algoritmos chamada de macro. A macro sempre era interrompida para a seleção individual dos pixels de cada imagem e conseqüente criação de uma imagem binária. Em cada animal infectado foram analisados aleatoriamente 60 trofozoítos positivos para anticorpos anti-trofozoítos . Baseado na lei de Beer, a DO foi obtida através da razão entre a luz transmitida e a luz incidente no comprimento de onda igual a 500 nm:

$$DO = - \log I/I_0$$

Onde I_0 é a quantidade total de luz que atravessa as áreas não marcadas do espécimen e I é a quantidade de luz transmitida de cada pixel da área analisada. Na imagem digital, I é proporcional ao valor de tons de cinza dos pixels da área marcada. Como cada célula marcada é composta por muitos pixels, a soma dos valores de tons de cinza (fórmula *SUMD* disponível no programa KS300) dividida pela área (em pixels) fornece o valor de I . A fórmula *MEAND* resume a expressão descrita acima como a razão entre *SUMD* e a área, logo,

$$I = \text{SUMD} / \text{área} = \text{MEAND}$$

Neste analisador de imagens os valores de brilho variam de 0 a 255 (numa amplitude de oito bits), assim o I_0 teórico é igual a 255. Na prática, I_0 representa os valores de tons de cinza do *background* e foi obtido através da criação de uma imagem binária desta região e posterior cálculo de *MEAND*.

Todos os valores de DO obtidos foram comparados através do teste Kruscall-Walis e Mann-Whitney. O número de trofozoítos e a DO foram analisados entre si através da correlação de Spearman (programa Graphpad InStat).

3.1.9 Análise da deposição dos componentes C3 e C9

Todos os cortes foram examinados para descrição qualitativa das marcações imuno-histoquímicas nos trofozoítos e no parênquima hepático normal e lesado. Foram contados todos os trofozoitos positivos e negativos para os componentes C3 e C9 do complemento através da objetiva de 40x do

microscópio Axiolab/Carl Zeiss. A área total de cada corte histológico foi calculada através do software KS300/Carl Zeiss. Todos os cortes foram completamente digitalizados através do scanner HP scanjet 2400, na resolução de 300dpi. Em seguida todos os pixels de cada corte histológico foram completamente selecionados, com posterior criação de imagem binária e cálculo da área total do corte. A área do menor corte foi utilizada como padrão mínimo de tecido a ser analisado estatisticamente. Os resultados destas contagens foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para avaliar diferenças no número de trofozoítos C3⁽⁺⁾, C3⁽⁻⁾, C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ nos diferentes períodos de infecção. Os testes de Mann-Whitney e de Dunn foram usados para avaliar prováveis diferenças quantitativas dos trofozoítos C3⁽⁺⁾, C3⁽⁻⁾, C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ entre as cepas. Foi utilizado o teste de Spearman para avaliar prováveis correlações entre a área de necrose e a quantidade de trofozoítos C3⁽⁺⁾, C3⁽⁻⁾, C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾.

3.2 Resultados do modelo experimental nº 1

3.2.1 Análises histopatológicas e quantitativas das áreas de necrose

Após 12h de infecção foram observadas lesões hepáticas em todos os hamsters infectados, com aspecto microscópico similar em ambos os grupos de animais. Foram observados múltiplos focos de necrose, constituída por restos celulares, trofozoítos e discreto infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos. Tais lesões estavam presentes em maior quantidade que o observado nos outros períodos de infecção, e eram envoltas por parênquima hepático normal. (Fig. 1a). A fusão destas lesões focais originou área de necrose central na maioria dos animais, circundadas por borda de restos celulares, trofozoítos e, pequena quantidade de macrófagos e neutrófilos (Fig.

1b). A região central destas áreas era constituída por necrose de liquefação e/ou coagulação e trofozoítos. Os capilares sinusóides estavam dilatados e com maior quantidade de leucócitos em seu interior. Não houve diferença significativa na extensão da área de necrose como observado no fígado de hamsters inoculados com *E. histolytica* ou *E. dispar* (*E. histolytica*: $5,2 \times 10^5 \pm 7,2 \times 10^5$; *E. dispar*: $3,1 \times 10^6 \pm 2,7 \times 10^6$). Nenhuma lesão macro e microscópica foi observada nos animais inoculados com a flora de *E. histolytica* ou *E. dispar*.

3.2.2 Análise imuno-histoquímica qualitativa e quantitativa dos trofozoítos.

Trofozoítos marcados foram encontrados principalmente na borda da necrose e, em menor quantidade, no interior destas áreas, nas lesões nodulares e nos capilares sinusóides (Figuras 1c, d, e). Marcação positiva para antígenos de *E. dispar* e *E. histolytica* foram observados em todas as regiões descritas (Figuras 1d, f). Tal marcação sugere a presença de restos de trofozoítos (quando a marcação tem aspecto granuloso ou de restos de membrana) ou de produtos de secreção amebianos (quando o aspecto é amorfo e homogêneo).

A média do número de trofozoítos nos animais inoculados com *E. histolytica* e *E. dispar* foi respectivamente: $36,2 \pm 19,9$ e $2,2 \pm 2,3$. O teste de Mann-Whitney demonstrou diferença significativa no número de trofozoítos entre as cepas ($p=0,0119$). Contudo, à partir de 24hs não foi observada diferença entre os dois grupos de animais.

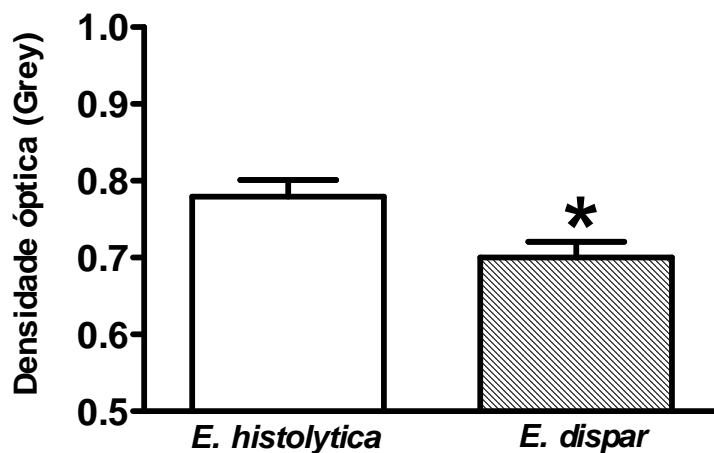
3.2.3 Análise qualitativa e quantitativa da ligação dos anticorpos sobre os trofozoítos

A técnica de imuno-histoquímica revelou a presença de anticorpos sobre os trofozoítos em todos os animais infectados com *E. dispar* e *E. histolytica* sem aparente diferença entre ambas as cepas (Figuras 2a e 2b). A substituição do antisoro 1^o por PBS produziu reação negativa em todos os trofozoítos.

Os trofozoítos de *E. dispar* frequentemente apresentavam vacúolos, indicando degeneração desses parasitos (Figura 2a). Restos de trofozoítos marcados foram mais frequentemente observados nos animais inoculados com *E. dispar*. Marcação positiva também foi observada na parede dos sinusóides e hepatócitos (Fig. 2c).

A ligação dos anticorpos sobre os trofozoítos foi significativamente menor nos animais inoculados com *E. histolytica* comparados com a *E. dispar* (*E. histolytica*: $0,77 \pm 0,11$ grey; *E. dispar*: $0,70 \pm 0,11$ grey; $p < 0,05$) (Gráfico. 1a). Valores altos de OD indicam menores intensidades de marcações imuno-histoquímica. Como a escala de OD é pequena, pequenas diferenças nos valores correspondem a mudanças significativas nos grupos.

(a)



(b)

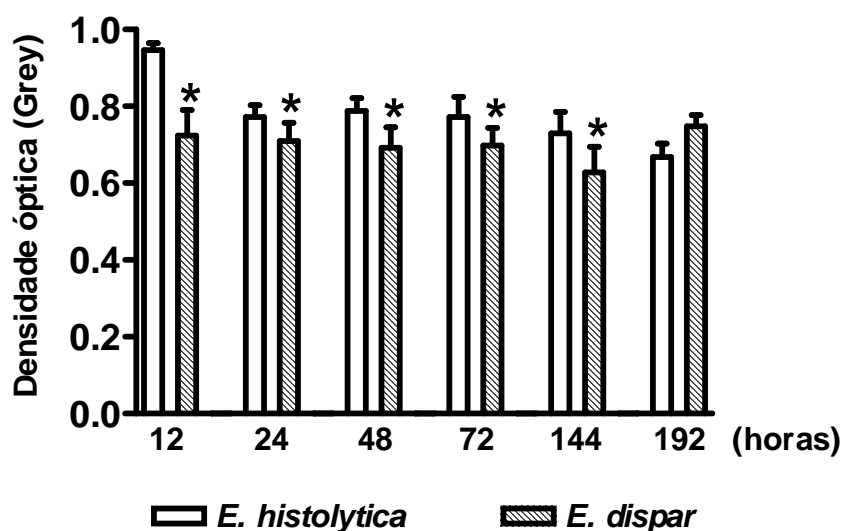


Gráfico 1 - Análise quantitativa de anticorpos ligados em trofozoítos no fígado de hamsters infectados com *E. histolytica* ou *E. dispar*. (a) Média da densidade óptica (DO) obtida de todos os períodos de infecção (12, 24, 48, 72, 144, and 192hs). Valores de DO próximos a zero correspondem à marcações imuno-histoquímicas mais intensas e, conseqüentemente, maior ligação de anticorpos anti-trofozoítos. * $p < 0,05$. (b) Valores de DO dos animais inoculados com *E. dispar* ou *E. histolytica* em diferentes períodos de infecção. * $p < 0,05$. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão.

A ligação de anticorpos nos tempos 12, 24, 48, 72, 96 e 144 foi maior nos trofozoítos dos hamsters inoculados com *E. dispar*, ao contrário do observado com a *E. histolytica* (Gráfico. 1b).

3.2.4 Análise de correlação entre o número de trofozoítos e a ligação de anticorpos

Para avaliar as prováveis correlações existentes entre a ligação de anticorpos e o número de trofozoítos, foi aplicado o coeficiente rho de Spearman por não podermos assumir ou garantir relação linear entre as variáveis. Nos animais inoculados com *E. histolytica* foi observada correlação positiva entre a ligação de anticorpos e o número de trofozoítos, ou seja, quanto maior a DO (menor ligação de anticorpos nos trofozoítos) maior o número de trofozoítos ($p < 0,05$). Foi verificada uma tendência de aumento da ligação de anticorpos ao final da cinética da infecção, ao contrário do observado no grupo de animais com 12 horas de infecção, cujos valores de DO são os maiores.

3.2.5 Análise qualitativa e quantitativa da deposição dos componentes C3 e C9 do complemento

Trofozoítos C3⁽⁺⁾ e C9⁽⁺⁾ foram detectados no lúmen vascular, nos granulomas, dentro e na borda da área da necrose hepática dos animais infectados com *E. dispar* e *E. histolytica* (Figs. 3a e b). Trofozoítos C3⁽⁻⁾ e C9⁽⁻⁾ também foram encontrados nestas mesmas áreas. Restos de trofozoítos C3⁽⁺⁾ e C9⁽⁺⁾ foram mais frequentemente observados nos animais inoculados com *E.*

dispar e, em menor quantidade, nos animais inoculados com *E. histolytica*, sugerindo maior destruição de trofozoítos de *E. dispar* (Figs. 3b e 3e).

Imunoreatividade positiva difusa do componente C3 foi observada nas áreas de necrose, em hepatócitos normais e lesados, próximos ou não às lesões nodulares e áreas de necrose centrais (Figs. 3c e 3d). Esses achados foram muito mais evidentes no fígado dos animais inoculados com *E. histolytica*, com 24 e 72h de infecção. Foram usados cortes de miocárdio submetidos à isquemia e reperfusão como controles positivos para C3 e C9. Como mostrado na figura 3f, grandes áreas de imunoreatividade de C3 e C9 foram observadas nos cortes de miocárdio. A remoção dos antisoros 1^{os} produziu marcação negativa nos cortes de fígado e miocárdio reperfundido (dados não mostrados).

A deposição de C9 sobre trofozoítos de *E. histolytica* reduziu durante o período analisado (12, 24, 48, 72, 144 e 192h). Os gráficos 2 e 3 mostram a média do número de trofozoítos C3⁽⁺⁾, C9⁽⁺⁾, C3⁽⁻⁾ e C9⁽⁻⁾ nos animais infectados com *E. dispar* e *E. histolytica*. Os gráficos 4 e 5 mostram a sua distribuição nos diferentes períodos de infecção. Os animais infectados com *E. histolytica* apresentaram uma quantidade significativamente maior de trofozoítos C9⁽⁺⁾ quando comparado aos hamsters infectados com *E. dispar*. Em contraste, não houve diferença significativa na deposição do componente C3 no período analisado, tanto quanto entre as cepas em cada tempo. Correlação positiva entre a área de necrose e o número de trofozoítos C9⁽⁺⁾ foi observada nos animais inoculados com a *E. dispar* ($p < 0,05$).

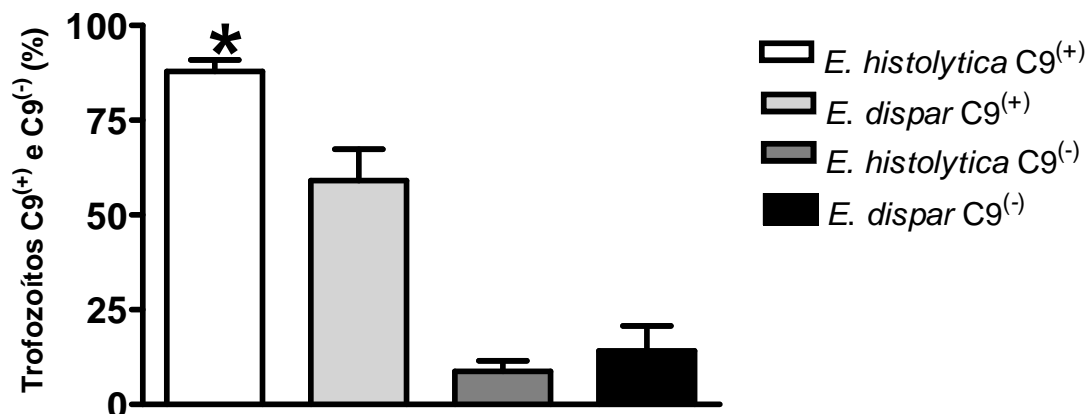


Gráfico 2 - Análise quantitativa de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ no fígado de hamsters infectados com *E. histolytica* ou *E. dispar*. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão. * $p < 0,05$

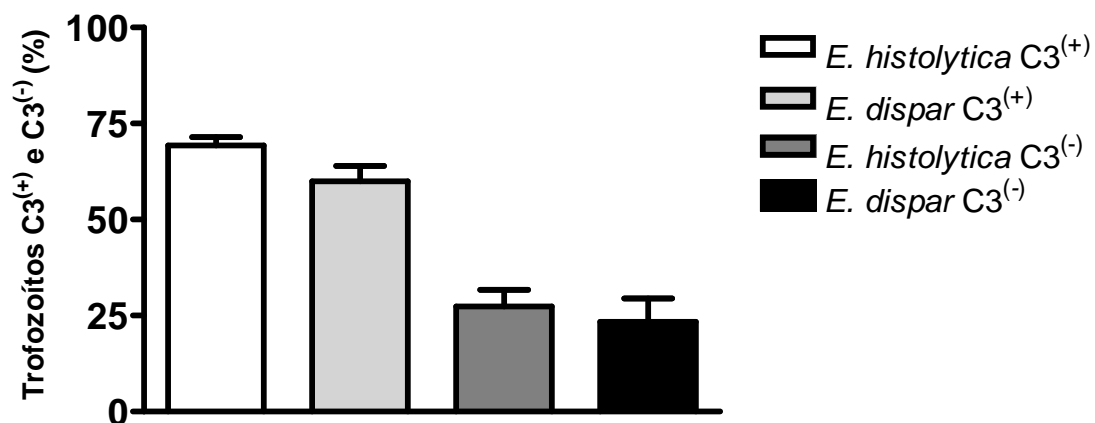


Gráfico 3 - Análise quantitativa de trofozoítos C3⁽⁺⁾ e C3⁽⁻⁾ no fígado de hamsters infectados com *E. histolytica* ou *E. dispar*. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão.

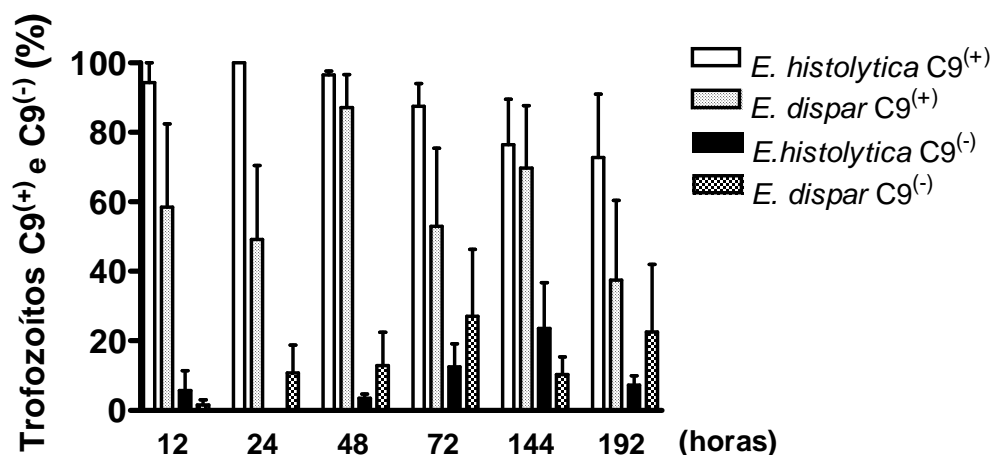


Gráfico 4 - Distribuição dos trofozoítos C9⁽⁺⁾ e C9⁽⁻⁾ no fígado de hamsters infectados com *E. histolytica* ou *E. dispar*, em diferentes períodos de infecção.

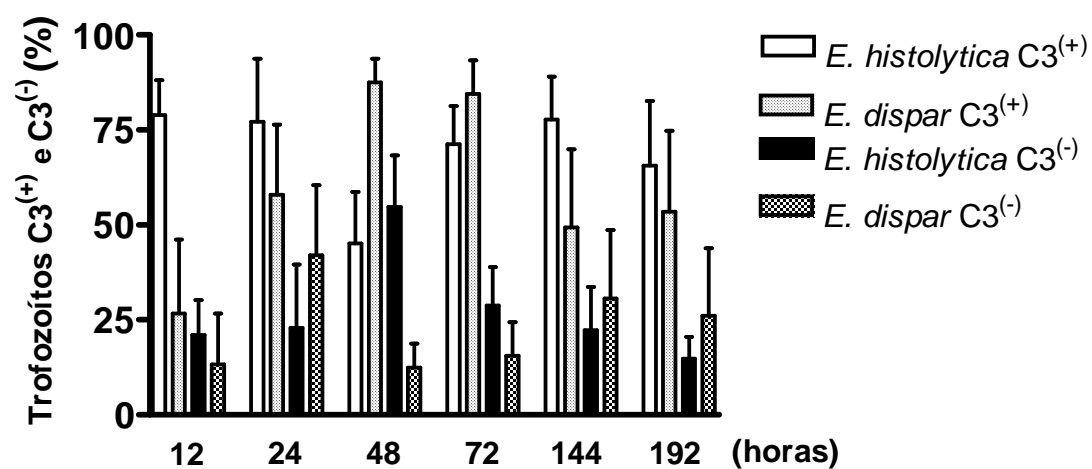


Gráfico 5 - Distribuição dos trofozoítos C3⁽⁺⁾ e C3⁽⁻⁾ no fígado de hamsters infectados com *E. histolytica* ou *E. dispar*, em diferentes períodos de infecção.

4 Modelo experimental nº 2

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Animais utilizados

Foram utilizados no experimento 20 camundongos Swiss machos com idade aproximada de 30 dias. Os animais foram obtidos no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA-UFMG).

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

Foram utilizadas as cepas MCR e EGG da *E. dispar* e *E. histolytica* respectivamente. Após crescimento em meio PAVLOVA modificado, foi feita diluição com salina até atingir o inóculo de 250.000 trofozoítos/0,1ml.

4.1.3 Inoculação

Dois grupos de 10 camundongos foram inoculados pela via intra-hepática (no lobo esquerdo) com as cepas MCR de *E. dispar* ou EGG de *E. histolytica*; metade deles previamente tratados com 0.5mg/Kg de dexametasona, administrada pela via subcutânea 24 e 01 h antes da inoculação dos trofozoítos

4.1.4 Necrópsia e coleta do material

Os camundongos foram eutanaziados com injeção intraperitoneal de 200 mg/Kg de ketamina 5% e 10mg/Kg de xilazina 2%, com 48hs de infecção, para coleta do lobo esquerdo do fígado. Três fatias do lobo esquerdo foram fixadas

em formol tamponado 10%, pH 7,2 e digitalizadas através da câmera digital Sony, modelo MVC-CD400/CD250 para análise morfométrica da extensão da necrose amebiana através do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. Após o processamento em álcool e em xilol, os fragmentos foram incluídos em parafina, cortados com 4 μ m de espessura e corados pela hematoxilina e eosina (H&E).

4.1.5 Reações imuno-histoquímicas

- Para trofozoítos;
- Para neutrófilos;
- Para macrófagos;

Cortes histológicos das fatias de fígado foram desparafinados, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes e lavados em tampão fosfato (PBS) pH 7,2. A atividade da peroxidase endógena foi eliminada incubando os cortes em solução de H₂O₂ 30vv a 3,5% 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 à 4°C. Para identificação dos neutrófilos e macrófagos os cortes foram incubados com a solução DakoCytomation Target Retrieval (Dako, Califórnia, USA) à 100° C por 20 minutos. Os cortes foram incubados com os antisoro primários específicos (Tabela 2); posteriormente incubados com IgG biotinilada (antisoro 2°) e estreptavidina conjugada com peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA). A marcação foi detectada usando solução de diaminobenzidina 0,05% em H₂O₂ 40 vv à 0,2%. Como controle negativo, o

antisoro 1° foi substituído por PBS em alguns cortes. Como controles positivos foram usados cortes de pele de camundongos (inflamada através de injeção intradérmica de carragenina), cortes de fígado ricos em trofozoítos e com porções de tecido hepático normal. Os cortes foram contracorados com hematoxilina de Harris diluída e montados em entelan.

Tabela 2: Reagentes imunológicos utilizados nas reações imunohistoquímicas do modelo 2.

Detecção	Antisoro 1°	Antisoro 2°	Estreptavidina
Trofozoítos (Produzido nos laboratórios de Amebíases e Protozooses)	1:2000 30min Temp. ambiente	1:200 30min Temp. ambiente	1:200 30min Temp. ambiente
Macrófagos (Hycult Biotechnology b.v., Netherlands)	1:50 12-16horas 4°C	1:100 1hora 4°C	1:100 1hora 4°C
Neutrófilos (Hycult Biotechnology b.v., Netherlands)	1:50 12-16horas 4°C	1:100 1hora 4°C	1:100 1hora 4°C

4.1.6 Análise quantitativa

Através do software KS300 (Carl Zeiss) foram calculadas as áreas de necrose das fatias do fígado. A distância entre as fatias e a câmera foi a

mesma em todas as amostras digitalizadas. Todas as áreas de necrose foram delimitadas com o auxílio de um cursor e os resultados em μm^2 enviados para uma planilha.

Com o uso da microcâmara JVC-TK 1270 e da objetiva de 40X, foram digitalizadas 30 imagens aleatórias de cada corte histológico submetido à reação imuno-histoquímica contra trofozoítos, perfazendo $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ de fígado analisado para contagem dos trofozoítos usando o mesmo software.

Os macrófagos e neutrófilos foram quantificados tanto na borda das zonas centrais de necrose quanto no parênquima hepático não-necrosado utilizando a mesma metodologia descrita acima.

Também foram contados o número de focos inflamatórios no parênquima hepático não-necrosado em cortes corados pela hematoxilina e eosina.

Os métodos utilizados para digitalização, definição de condições de medida e obtenção de resultados são os descritos por Caliari (1997). Todos os resultados obtidos foram submetidos aos testes t de Student e Pearson.

4.2 Resultados do modelo experimental nº 2

4.2.1 Análise qualitativa da área de necrose

Lesões amebianas hepáticas foram detectadas em todos os animais inoculados com *E. dispar* (MCR) e com *E. histolytica* (EGG). Com 48 horas de infecção a lesão era macroscopicamente visível no lobo esquerdo, única, de coloração branco-amarelada e bem delimitada. Segue abaixo a descrição histopatológica nas diferentes cepas, com e sem o tratamento com dexametasona.

4.2.2 Camundongos inoculados com a cepa EGG e não tratados com dexametasona (Grupo EGG)

Em geral as regiões de necrose foram maiores nos animais deste grupo quando comparados aos animais inoculados com EGG e tratados com dexametasona (Fig. 4a). Foi possível observar vários hepatócitos com necrose de coagulação e zona central de necrose liquefeita, às vezes, delimitada por parênquima hepático normal, outras vezes por debris e/ou discreto infiltrado inflamatório misto, constituído por neutrófilos, macrófagos, células gigantes e linfócitos. Calcificação estava presente em pequena quantidade, tanto na borda quanto no centro da necrose. Também estavam presentes, pequenos focos de infiltrado inflamatório e vasos sanguíneos hiperêmicos na borda da lesão. Trofozoítos foram encontrados nos cinco animais do grupo, com maior frequência na borda e, em menor quantidade, na região central da necrose.

4.2.3 Camundongos inoculados com a cepa EGG e tratados com dexametasona (Grupo EGG-DEX)

Nesses animais foi possível observar que, quando presente, a área de necrose era menor do que nos animais não tratados com dexametasona. Debris e leucócitos foram observados com menor frequência (Fig. 4b). Foram observadas poucas lesões focais em meio ao parênquima hepático normal. Trofozoítos foram encontrados tanto na borda quanto na região central da necrose.

4.2.4 Camundongos inoculados com a cepa MCR e não tratados com dexametasona (Grupo MCR)

Foi observada pelo menos uma zona de necrose central. Esta zona era bem delimitada por debris, infiltrado inflamatório discreto a moderado e tecido de granulação pouco desenvolvido (Fig. 4c). O tecido de granulação era constituído por capilares neoformados, fibras colágenas, fibroblastos, leiomíocitos e eosinófilos, todos associados à um infiltrado polimorfomononuclear. A necrose era constituída principalmente por restos celulares e áreas de liquefação. As zonas de calcificação eram maiores e mais frequentes, tanto no centro da necrose quanto na borda. Trofozoítos foram encontrados nas regiões descritas acima.

4.2.5 Camundongos inoculados com a cepa MCR e tratados com dexametasona (Grupo MCR-DEX)

As zonas de necrose se assemelham às áreas formadas nos animais inoculados pela EGG e tratados com dexametasona. O infiltrado polimorfohistiocitário é escasso e situado principalmente na borda da necrose, circunscrita pelo parênquima hepático normal (Fig. 4d).

4.2.6 Análise quantitativa da área de necrose

A média e o erro padrão da área de necrose hepática nos animais inoculados com *E. histolytica* dos grupos EGG e EGG-DEX foi de $2,95 \pm 1,91$ mm² e $1,32 \pm 0,44$ mm², respectivamente. Nos animais inoculados com *E. dispar* dos grupos MCR e MCR-DEX foi de $4,63 \pm 2,96$ mm² e $2,62 \pm 1,71$ mm², respectivamente (Gráfico 6). Apesar da necrose, à histopatologia, ter se

mostrado menor nos animais de ambos os grupos tratados com dexametasona, esta diferença não foi significativa pelo test t de Student ($p>0,05$).

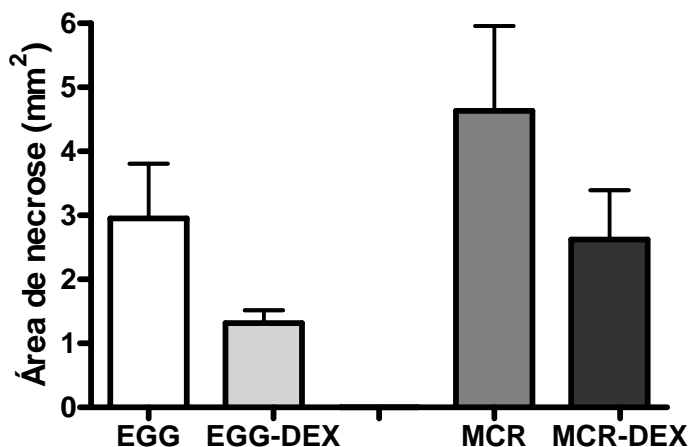


Gráfico 6 - Área de necrose no fígado de camundongos inoculados com *E. dispar* ou *E. histolytica*, não tratados e tratados com dexametasona.

EGG: Camundongos inoculados com EGG e não tratados com dexametasona

EGG-DEX: Camundongos inoculados com EGG e tratados com dexametasona

MCR: Camundongos inoculados com MCR e não tratados com dexametasona

MCR-DEX: Camundongos inoculados com MCR e tratados com dexametasona

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão.

4.2.7 Análise quantitativa dos trofozoítos e dos focos inflamatórios

A imuno-histoquímica revelou a presença de trofozoítos principalmente na borda da zona central de necrose, bem como em seu interior, nos sinusóides hepáticos e em focos inflamatórios. A análise quantitativa mostrou um decréscimo significativo no número de trofozoítos nos animais de ambos os grupos tratados com dexametasona (Fig. 5 e Gráfico 7) ($p<0,05$). Associado a queda de trofozoítos, o teste t de Student também demonstrou redução significativa dos focos inflamatórios e do infiltrado inflamatório ao redor das

zonas de necrose nos animais tratados com dexametasona inoculados com *E. histolytica* ou *E. dispar* ($p < 0,05$).

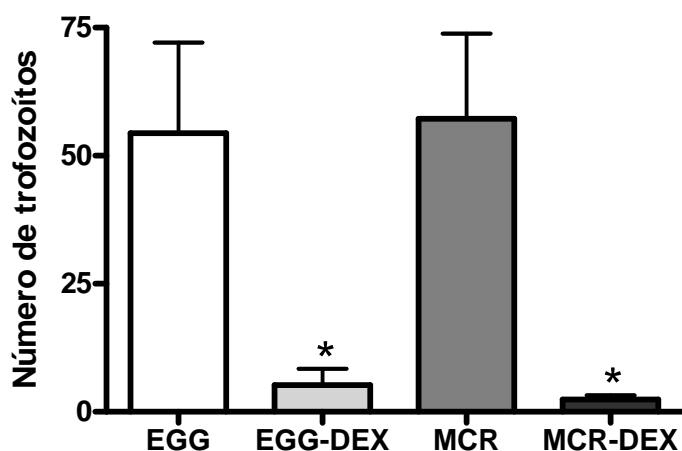


Gráfico 7 - Número de trofozoítos no fígado de camundongos inoculados com *E. dispar* ou *E. histolytica*, não tratados e tratados com dexametasona.

EGG: Camundongos inoculados com EGG e não tratados com dexametasona

EGG-DEX: Camundongos inoculados com EGG não tratados com dexametasona

MCR: Camundongos inoculados com MCR e não tratados com dexametasona

MCR-DEX: Camundongos inoculados com MCR e tratados com dexametasona

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

4.2.8. Análise quantitativa dos neutrófilos e macrófagos

Nos grupos EGG e MCR, a imuno-histoquímica demonstrou o predomínio de macrófagos no infiltrado inflamatório, tanto na borda das zonas de necrose quanto nos focos inflamatórios, enquanto os neutrófilos foram encontrados em pequena quantidade nestas mesmas regiões (Figs. 6 e 7).

Os gráficos 8, 9, 10 e 11 mostram a distribuição de neutrófilos e macrófagos nos grupos MCR, MCR-DEX, EGG e EGG-DEX. A análise quantitativa demonstrou decréscimo significativo de macrófagos na borda das zonas de necrose dos animais do grupo MCR-DEX ($p < 0,05$). A média e o erro

padrão do número de macrófagos nos animais inoculados com *E. dispar* dos grupos MCR e MCR-DEX foi de $23 \pm 8,91$ e $5,8 \pm 5,67$, respectivamente. Foi verificada correlação positiva entre a queda do número de trofozoítos e a redução do número de macrófagos na borda das zonas de necrose ($p < 0,05$) e, a redução do número de neutrófilos no parênquima hepático ($p < 0,05$). Apesar de ter sido observada redução no número de neutrófilos em todos os grupos, a mesma não foi estatisticamente significativa.

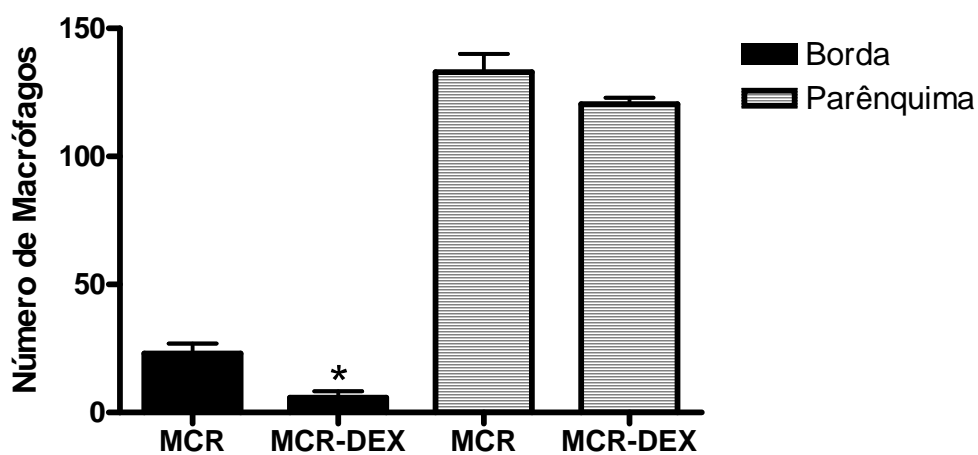


Gráfico 8 - Número de macrófagos na borda da necrose amebiana e no parênquima hepático de camundongos inoculados com *E. dispar*, não tratados e tratados com dexametasona.

MCR: Camundongos inoculados com MCR e não tratados com dexametasona

MCR-DEX: Camundongos inoculados com MCR e tratados com dexametasona

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

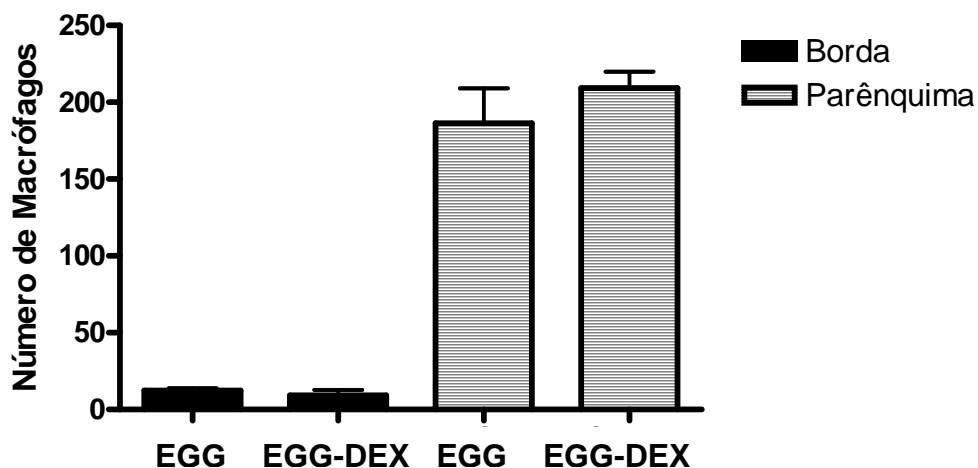


Gráfico 9 - Número de macrófagos na borda da necrose amebiana e no parênquima hepático de camundongos inoculados com *E. histolytica*, não tratados e tratados com dexametasona.

EGG: Camundongos inoculados com EGG e não tratados com dexametasona

EGG-DEX: Camundongos inoculados com EGG não tratados com dexametasona

Os dados são mostrados como média ± erro padrão.

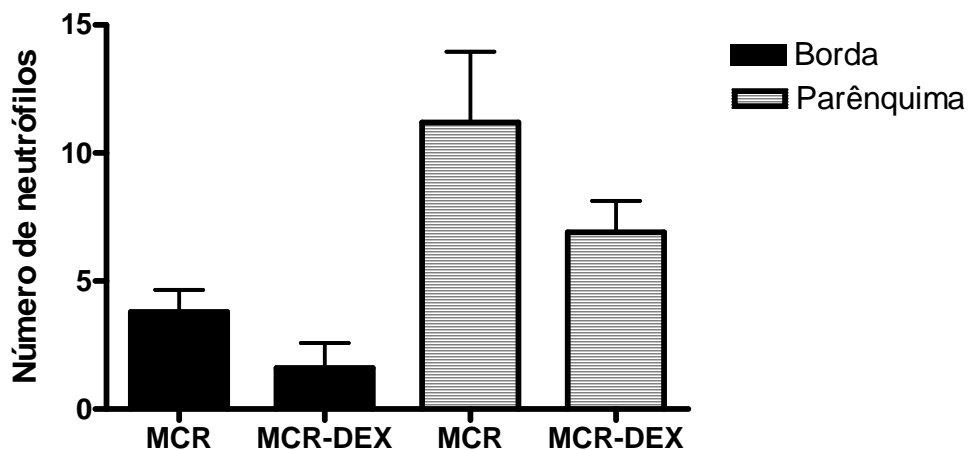


Gráfico 10 - Número de neutrófilos na borda da necrose amebiana e no parênquima hepático de camundongos inoculados com *E. dispar*, não tratados e tratados com dexametasona.

MCR: Camundongos inoculados com MCR e não tratados com dexametasona

MCR-DEX: Camundongos inoculados com MCR e tratados com dexametasona

Os dados são mostrados como média ± erro padrão.

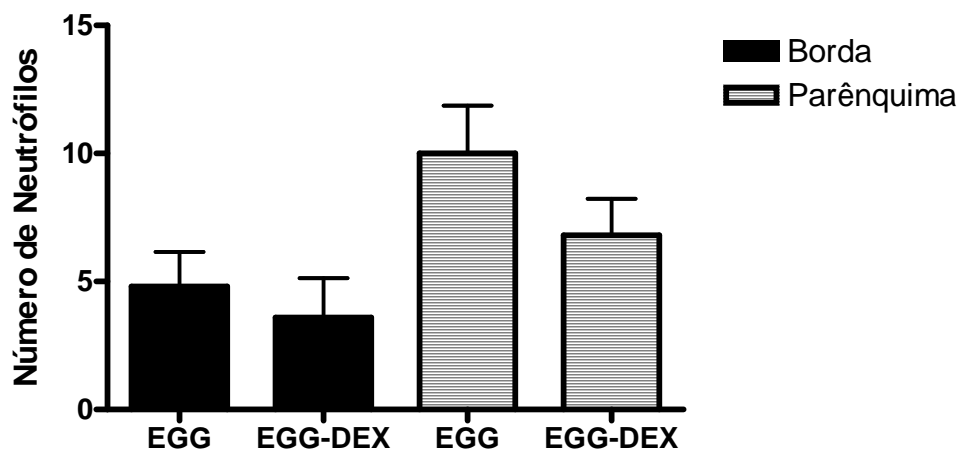


Gráfico 11 - Número de neutrófilos na borda da necrose amebiana e no parênquima hepático de camundongos inoculados com *E. histolytica*, não tratados e tratados com dexametasona.

EGG: Camundongos inoculados com EGG e não tratados com dexametasona

EGG-DEX: Camundongos inoculados com EGG não tratados com dexametasona

Os dados são mostrados como média \pm erro padrão.

5 Discussão

Os objetivos deste estudo foram avaliar o papel de anticorpos, complemento, macrófagos e neutrófilos no perfil das lesões amebianas hepáticas em dois modelos experimentais. Uma das mais importantes observações do trabalho foi a demonstração e a análise quantitativa *in vivo* da ligação de anticorpos em trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* no fígado de hamsters infectados. Além disso, foi verificado que tal ligação foi significativamente maior nos trofozoítos da espécie não-patogênica *E. dispar* e que houve correlação positiva entre a ligação do componente C9 do complemento nestes trofozoítos com a área de necrose. Também foi objetivo do presente trabalho, avaliar a influência dos neutrófilos e dos macrófagos no número de trofozoítos e na área do abscesso hepático amebiano murino. Os resultados mostraram que as células inflamatórias contribuem em menor proporção para o aumento do abscesso amebiano, quando comparado com parasitismo. A relação direta observada entre a intensidade do parasitismo e da inflamação sugere que, no início da formação do abscesso amebiano, a inflamação pode favorecer a multiplicação dos trofozoítos.

A resposta imune inata é a primeira reação do hospedeiro contra um patógeno e funciona para limitar a progressão da infecção durante o início da exposição do hospedeiro aos microorganismos. Na imunidade inata pode haver a participação de neutrófilos, macrófagos, anticorpos naturais e do sistema complemento. O sistema complemento inicia uma resposta inflamatória que provoca a migração de leucócitos para o local da infecção, promovendo a opsonização e levando a remoção de microorganismos (BOHLSON *et al.*, 2007). Em todos os períodos da infecção foi verificada ligação de anticorpos e

dos componentes C3 e C9 do complemento em trofozoítos, bem como infiltrado inflamatório polimorfohistiocitário. Diferente do observado por nosso grupo, Campos-Rodrigues *et al.* somente relataram ligação de anticorpos em trofozoítos após 72 horas de infecção (CAMPOS-RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Provavelmente, durante o período de 12 a 72 horas, ocorreu a ligação de anticorpos naturais aos trofozoítos, enquanto após este intervalo (entre 144 e 192 horas), foram anticorpos específicos produzidos pela resposta imune adaptativa. Em nosso estudo, a ligação de anticorpos nos trofozoítos foi observada nos grupos de animais inoculados por ambas as cepas de amebas; entretanto, a ligação foi maior nos trofozoítos de *E. dispar* do que nos trofozoítos da *E. histolytica*. Este achado pode ser atribuído a baixa produção de cisteína proteinases, enzimas capazes de clivar imunoglobulinas, pela espécie não-patogênica *E. dispar*, (QUE X. & REED S.L, 2000). Tais observações revelam diferenças *in situ* de mecanismos de escape entre as duas espécies de ameba no modelo experimental de abscesso amebiano hepático.

Tem sido sugerido que a imunidade humoral não é eficiente contra as amebas *in vivo* (CAMPOS-RODRIGUEZ *et al.*, 2000). Entretanto, observamos anticorpos ligados a restos de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* com ou sem o contato com células inflamatórias. Similarmente, áreas de debris C9⁽⁺⁾ foram encontradas no fígado de animais infectados de ambos os grupos, indicando a destruição de trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*. Tais observações foram mais evidentes nos hamsters infectados com *E. dispar*, provavelmente devido a baixa expressão da lectina galactose/N-acetyl-D-galactosamina (molécula CD59-like). Na *E. histolytica* esta molécula está

relacionada com a proteção dos trofozoítos contra a ação do complemento (DODSON *et al.*, 1997). Assim, a correlação positiva entre a quantidade de trofozoítos C9⁽⁺⁾ e a área de necrose nos animais inoculados com *E. dispar* sugere que a deposição do componente C9 nos trofozoítos de *E. dispar* provoca a sua destruição, liberando substâncias tóxicas e ampliando a área de necrose. De fato, a quantidade de debris de trofozoítos foi maior nos animais inoculados com *E. dispar*. Conseqüentemente, estas observações demonstram a maior habilidade dos trofozoítos de *E. histolytica* em escapar dos efeitos da ação do complemento *in vivo* durante a infecção hepática.

Grandes áreas de parênquima hepático com imunoreatividade positiva para o componente C3 do complemento foram observadas nos animais inoculados com *E. histolytica*. Tal expressão significativamente maior pode ser devida a maior habilidade desta espécie em produzir maior quantidade de cisteína proteinases, enzimas capazes de ativar o sistema complemento pela via alternativa (REED *et al.*, 1989). Sabendo que a *E. histolytica* é mais eficiente em escapar das ações destrutivas do complemento, a razão pela qual ela induz uma forte e persistente ativação do complemento pode estar relacionada a uma capacidade desta espécie de ameba em manipular o sistema imunológico a seu favor.

Como observado em outros estudos, verificamos uma pequena quantidade de trofozoítos no parênquima hepático com 12 horas de infecção (RIGOTHIER *et al.*, 2002). Neste período, a maioria dos focos inflamatórios não continha parasitos e os capilares sinusóides apresentavam-se dilatados e com grande número de leucócitos. Comparando estes achados com o observado nos outros períodos da infecção, foi verificado que o número de leucócitos,

especialmente neutrófilos, foi bem maior com 12 horas de infecção do que nos outros tempos, em ambas as espécies de amebas. À partir de 24 horas de infecção os leucócitos foram diminuindo de quantidade no parênquima hepático dos hamsters inoculados com *E. histolytica*. Tal redução pode ser devida a sua destruição com conseqüente liberação de produtos tóxicos e ampliação do abscesso amebiano. Muitos estudos sugerem a participação das células inflamatórias para o estabelecimento do abscesso hepático amebiano (OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004; SEYDEL *et al.*, 1997).

É admitido que os trofozoítos sobreviventes às primeiras incursões do sistema imunológico seriam os responsáveis pela evolução do abscesso hepático. É provável que as cepas de amebas sejam constituídas de populações mistas de trofozoítos, contendo parasitos resistentes e sensíveis (WALDERICH *et al.*, 1997). Conforme já havíamos observado anteriormente, os trofozoítos aumentaram de quantidade nos dois grupos de animais após 24 horas de infecção (COSTA *et al.*, 2007). A ação conjunta do complemento e dos anticorpos pode não ser capaz de eliminar completamente os trofozoítos, mas pode favorecer a seleção destas subpopulações mais resistentes e contribuir para o desenvolvimento do abscesso hepático amebiano. Nesse sentido, apesar de alguns trabalhos mostrarem que o complemento não interfere no surgimento das lesões hepáticas (OLIVOS-GARCIA *et al.*, 2004), mostramos que o complemento pode ser capaz de destruir alguns trofozoítos de *E. histolytica in vivo*, sugerindo que, ao lado da ação conjunta de outros mecanismos imunológicos, este fenômeno poderia contribuir para a patogênese do abscesso hepático amebiano.

No modelo murino de abscesso hepático amebiano, a redução da inflamação associada a uma pequena diminuição da área de necrose mostra que a necrose nos grupos não tratados com dexametasona ocorreu especialmente devido aos produtos amebianos. A secreção de amebaporos, cisteína-proteinases e de lectina Gal/GalNac pelos trofozoítos provocam a destruição de neutrófilos com a liberação de seus produtos tóxicos que podem desempenhar papel importante na ampliação das lesões amebianas. Contudo, 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. O estudo das mudanças ultraestruturais que aparecem durante os estágios iniciais da lesão hepática em hamster, demonstrou o recrutamento de grande número de neutrófilos ao redor das amebas (TSUTSUMI *et al.*, 1988).

No grupo de animais inoculados com *E. dispar* e animais não-tratados com dexametasona, foi verificado o predomínio de macrófagos na borda das zonas de necrose. O mesmo foi observado nos focos inflamatórios em ambos os grupos de animais não-tratados. Estudos *in vitro* demonstraram que macrófagos ativados após estimulação via IFN-gama apresentam maior resistência e capacidade de destruir trofozoítos através da produção de NO (LIN *et al.*, 1992). Macrófagos isolados de abscessos hepáticos nas fases iniciais da infecção, quando estimulados com proteínas amebianas, produziram grandes concentrações de TNF- α (WANG *et al.*, 1992, ZHANG *et al.*, 2003). A necessidade de ativação do macrófago sugere uma resposta Th1 secretora de IFN-gama, IL-2 e TNF-alfa. Contudo, outros estudos mostram em animais deficientes em IL-12, IFN-gama e NO, a mesma intensidade de parasitismo e

inflamação encontrados nos animais controles, indicando que a resposta Th1 não seria fundamental na resistência contra a infecção amebiana (HOUPY *et al.*, 2002).

Estudo realizado com trofozoítos marcados com isótopos radioativos mostrou que a maioria dos parasitos são destruídos 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. A redução do número de trofozoítos nos animais tratados com dexametasona, associado à queda de macrófagos e neutrófilos, sugere a participação destas células na manutenção do processo infeccioso. Conforme postulado por outros autores, as células de defesa do hospedeiro destroem inicialmente a maioria dos trofozoítos, permitindo a seleção dos parasitos mais resistentes e capazes de vencer as barreiras imunológicas (RIGOTHIER *et al.*, 2002).

Como esperado, o tratamento com dexametasona no modelo murino de abscesso hepático amebiano reduziu o infiltrado inflamatório, no entanto paradoxalmente foram menores o número de trofozoítos e a área de necrose. Estes resultados sugerem a ação efetiva da inflamação na patogênese amebiana privilegiando a multiplicação dos trofozoítos e, conseqüentemente, levando a um aumento da área do abscesso amebiano. É possível que os leucócitos e/ou seus produtos estimulem a transcrição de substâncias tóxicas amebianas ampliadoras da lesão.

Apesar dos resultados controversos sobre a importância da resposta inflamatória na produção do abscesso hepático amebiano, nossos resultados demonstraram a ação efetiva da inflamação na patogênese do mesmo, a

despeito da virulência inerente ao parasito ser determinante no estabelecimento da lesão.

6 Conclusões

6.1 Os achados morfológicos e imuno-histoquímicos sugerem que trofozoítos sensíveis foram destruídos por anticorpos e complemento no fígado de hamsters experimentalmente infectados, talvez selecionando os parasitos mais resistentes, responsáveis pela progressão do abscesso amebiano hepático.

6.2 Os achados indicam que a *E. histolytica* possui maior habilidade *in vivo* de escapar da resposta imune se comparada a *E. dispar*, embora este protozoário tenha provocado lesões hepáticas experimentais.

6.3 A escassez ou a ausência de trofozoítos nos camundongos tratados com dexametasona sugere a importância da resposta inflamatória na produção do abscesso hepático amebiano a despeito da virulência inerente ao parasito ser determinante no estabelecimento da lesão.

6.4 A dexametasona poderia ser a responsável indireta pela redução do número de trofozoítos devido a sua interferência numa provável ação seletiva de parasitos promovida pela inflamação, prejudicando a proliferação dos mesmos.

7 Abstract

Amebiasis is a disease caused by the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*, which resides in the large intestine of hosts, where can colonize without clinical symptoms or produce severe invasive infections with bloody diarrhea and, yet be able to disseminate to other organs. In the 90ths, the species *E. histolytica* was separated into two groups: the pathogenic *E. histolytica*, which is invasive and can cause symptomatic disease and, the non pathogenic *E. dispar*, morphologically similar to *E. histolytica*. The amebian abscess in liver is the more frequent form of out-intestine amebiasis and still there are doubts about the pathogenetics mechanisms involved. Some studies has demonstrated that *E. dispar* can also produce lesions experimentally in liver. In this study, we evaluated the influence of antibodies, complement system, macrophages and neutrophils in the parasitism and development of experimental hepatic abscess by the amebas. Hamsters were inoculated intra-hepatically with 100.000 trophozoites of *E. histolytica* or *E. dispar*. Different groups of animals were necropsied 12, 24, 48, 72, 144 and 192 hours after inoculation. Trophozoites and antibodies, C3 and C9 complement components bound to trophozoites, were detected by immunohistochemistry. Mice treated or not with dexamethasone were inoculated intra-hepatically with 250.000 trophozoites of *E. histolytica* or *E. dispar* and animals were necropsied 48 hours after inoculation. Trophozoites, macrophages and neutrophils were detected by immunohistochemistry. Histopathological analysis was done in histological slices stained by Hematoxylin and Eosin in all hamsters and mice. Digital morphometrics was used to quantify all immune positive staining and to calculate necrotic areas. The binding of antibodies to trophozoites was significantly higher in hamsters inoculated with *E. dispar*, as well the presence of debris of labeled trophozoites and vacuolated parasites. C3 positive diffuse immune-reactivity was higher in liver of animals inoculated with *E. histolytica*, at 24 and 72h of infection. C3⁽⁺⁾ and C9⁽⁺⁾ debris of trophozoites were more frequent in the liver of animals infected with *E. dispar*. In this same group of animals was observed a positive correlation between the necrotic area and number of C9⁽⁺⁾ trophozoites. Although necrosis has proven lower in mice in the groups treated with dexamethasone, this difference was not statistically significant. There was a significant decrease of parasitism and inflammation in mice treated with dexamethasone. In both groups non-treated with dexamethasone, the immunohistochemistry analysis demonstrated the prevalence of macrophages in the inflammatory infiltrate both in the border areas of necrosis and in the inflammatory foci. Positive correlation was found between the number of trophozoites and inflammatory cells. Morphologic findings and immunohistochemistry studies suggest that antibodies and complement are capable of destroying part of trophozoites in the liver of hamsters experimentally infected, perhaps selecting the most resistant parasites responsible for the development of amebic liver abscess. The results showed that *E. histolytica* has greater ability in vivo to escape the immune response compared to *E. dispar*, although this species also is capable of producing experimental lesions. The scarcity or absence of trophozoites in the groups treated with dexamethasone suggests the importance of the inflammatory response in the production of amebic liver abscess, despite the inherent parasite virulence to be determinant in establishing the injury.

8 Referências Bibliográficas

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

AMARAPURKAR, D.N., PATEL, N., AMARAPURKAR, A.D. Amoebic Liver Abscess. *Journal of Hepatology*, v. 39, 291-296, 2003.

ASGHARPOUR, A., GILCHRIST, C., BABA, D., HAMANO, S., HOUPPT, E. Resistance to *Entamoeba histolytica* infection is conferred by innate immunity and Gr-1+ cells. *Infection and Immunity*, v. 73, 4522-4529, 2005.

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

BANSAL, D., SEHGAL, R., CHAWLA, Y., MALLA, N., MAHAJAN, R.C. Cytokine mRNA expressions in symptomatic vs. asymptomatic amoebiasis patients. *Parasite Immunology*, v. 27, 37-43, 2005.

BERNINGHAUSEN, D., LEIPPE, M. Necrosis versus apoptosis as the mechanism of target cell death induced by *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, v. 65, 3615-3621, 1997.

BLASQUEZ, S., ZIMMER, C., GUIGON, G., OLIVO-MARIN, J.C., GUILLÉN, N., LABRUYÈRE, E. Human Tumor Necrosis Factor is a chemoattractant for the parasite *Entamoeba histolytica*. *Infection and Immunity*, v. 74, 1407-1411, 2006.

BLASQUEZ, S., RIGOTHIER, M.C., HUERRE, M., GUILLÉN, N. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. *International Journal for Parasitology*, v. 37, 425-433, 2007.

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

BOOTH, N.H; MACDONALD, L. E. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 493-508, 1992.

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

BRAGA, L.L., NINOMYA, H., McCOY J.J., EACKER, S., WIEDMER, T., PHAM, C., WOOD, S., SIMS, P.J., PETRI JR, W.A. Inhibition of the complement membrane attack complex by the galactose-specific adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.*, v. 90, 1131-1137, 1992.

BRUMPT, E. Étudie sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp., amibe a kystes quadrinuclées, parasite de l'homme. *Bull. Acad. Méd.*, v. 44, 943, 1925.

BRUCHHAUS,I, JACOBS, T, LEIPPE, M. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* differences i numbers and expression of cysteine proteinase genes. *Mol. Microbiol.* V. 2, 2255-63, 1996.

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

CALIARI, M.V. Princípios básicos de morfometria digital: KS 300 para iniciantes. Ed. UFMG, 149p, 1997.

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

CAMPOS-RODRIGUEZP, R., JARILLO-LUNA, A., VENTURA-JUÁREZ, J. et al. Interaction of antibodies with de *Entamoeba histolytica* trophozoites from experimental amebic liver abscess: na immunocytochemical study. *Parasitol. Res.*, V. 86, 603-607, 2000.

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

CAPIN, N.R., JIMENEZ, M., ZAMACONA, G., ORTIZ-ORTIZ, L. Determinación de complemento y vía alterna del complemento en pacientes con absceso hepático amibiano. *Arch. Invest. Méd.*, v. 9, 297-302, 1978.

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

COSTA, A.O., VIANA, J.C., ASSIS, D., ROCHA, O.A., SILVA, E.F. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Archives of Medical Research*, v. 31, S247-S248, 2000.

COSTA, C.A.X., BRITO, K.N.O., GOMES, M.A., CALIARI, M.V. Morphometric study of the hepatic lesions experimentally induced in hamsters by *Entamoeba dispar* and *E. histolytica*. *Parasite*, v. 14, 329-334, 2007.

DENIS, M., GHADIRIAN, E. Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.*, London, v. 12, 193-198, 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.*, 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. Euk. Microbiol., v. 42, 277-278, 1995.

DOBELL, C. The amoeba living in man. A zoological monograph., John Bale, Sons & Danielson, LTD., 168p, 1919.

DODSON, J.M., CLARK, G.C., LOCKHART, L.A., LEO, B.M., SHROEBER, J.W., MANN, B.J. Comparison of adherente, citotoxicity, and Gal/GalNac lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. Parasitology Internacional, v. 46, 225-235, 1997.

ESPINOSA-CANTELLANO, M., GUTIERREZ, G. C., MARTINEZ-PALOMO, A. In vivo pathogenesis of *Entamoeba dispar*. Archives of Medical Research, v. 28, S204-S206, 1997.

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. Tese (Doutorado em Parasitologia) Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

FURST, C., GOMES, M.A., TAFURI, W.L., SILVA, E.F. Biological aspects of a brazilian strain of *Entamoeba dispar*. Pathologica, v. 94, 22-27, 2002.

GOMES, M A, MELO, M N, PENA, G. P .M, SILVA E. F. Virulence parameters in the characterization of strains of *Entamoeba histolytica*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v 39, 65-69, 1997.

GOMES M.A., MELO M.N., MACEDO A.M., PENA G.P.M., CALIARI M.V., SILVA, E.F. Characterization of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by biological, and Molecular Parameters. Arch Med Res., v. 31, S249- S250, 2000.

GUTIÉRREZ-ALARCÓN, A., MOGUEL-TORRES, M., MATA-LEYVA, O., CUELLAR-NEVÁREZ, G., SIQUEIROS-CENDÓN, T., EROSA, G., RAMOS-MARTÍNEZ, E., TALAMÁS-ROHANA, P., SÁNCHEZ-RAMÍREZ, B. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2-expression in macrophages and trophozoites. *Experimental Parasitology*, v. 114, 154-159, 2006.

HAMELMANN, C., FOERSTER, B., BURCHARD, G.D., HORSTMANN, R.D. Lysis of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by human complement: methodological analysis. *Parasite Immunol.* v.14, 23-25, 1992.

HAQUE, R., MOLLAH, N. U. ALI, I.K.M., ALAM, K., EUBANKS, A., LYELY, D., PETRI JR, W.A. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the techlab *Entamoeba histolytica* II: antigen detection and antibody tests. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, 3235-3239, 2000.

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

HOARE, R. Considerations on the etiology of amebiasis according to the host parasite relationship. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, v. 54, 429-41, 1961.

HUANG, Y., QIAO, F., ABAGYAN, R., HAZARD, S., TOMLINSON, S. Defining the CD59-C9 binding interaction. *The Journal of biological Chemistry*, v. 281, 27398-27404, 2006.

HULDT, G., DAVIES, P., ALLISON, A.C., SCHORLEMMER, H.U. Interactions between *Entamoeba histolytica* and complement. *Nature*, v.277, 214-216, 1979.

HUSTON, C.D., HOUPPT, E.R., MANN, B.J., HAHN, C.S., PETRI JR, W.A. Caspase 3-dependent killing of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Cell. Microbiol., v. 2, 617-625, 2000.

HUSTON, C.D., BOETTNER, D.R., MILLER-SIMS, V., PETRI JR, W.A. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. Infection and Immunity, v. 71, 964-972, 2003.

HUSTON, C.D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. TRENDS in Parasitology, v. 20, 01, 2004.

JACKSON, T. F. H. G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species; clinical, epidemiological and serological evidence. International Journal for Parasitology, v. 28, 181- 186, 1998.

LEEIPE, M. Amoebaporos. Parasitol Today., v. 13, 178-83, 1997.

LIDELL, M.E., MONCADA, D.M., CHADEE, K., HANSSON G.C. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. Proc Natl Acad Sci., v. 103, 9298-303, 2006.

LIN, J.Y, CHADEE, K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine. J.Immunol., v. 148, 3999-4005, 1992.

LOTTER, H., TANNICH, E. The current status of an Amebiasis vaccine. Archives of Medical Research, v. 37, 292-296, 2006.

LOFTUS, B., ANDERSON, I., DAVIES, R., ALSMARK, U.C., SAMUELSON, J., AMEDEO, P., et al., The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. Nature, v. 433, 865-868, 2005.

MANN, B.J. Structure and function of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *International Review of Cytology*, v. 216, 59-80, 2002.

MOODY, S., BECKER, S., NUCHAMOWITZ, Y., MIRELMAN, D. Virulent and avirulent *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* differ in their cell surface phosphorylated glycolipids. *Parasitology*, v. 114, 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. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267, 13675-13680, 1992.

OLIVOS-GARCÍA, A., NEQUIZ-AVENDÁNO, M., TELLO, E., MARTÍNEZ, R.D., GONZÁLEZ-CANTO, A., LÓPEZ-VANCELL, R., GARCÍA DE LEÓN, M.C., MONTFORT, I., PÉREZ-TAMAYO, R. Inflammation, complement, ischemia and amebic survival in acute experimental amoebic liver abscess in hamsters. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 77, 66-71, 2004.

OMS. Report of a consultation of experts on amoebiasis, México, 1997.

ORTIZ- ORTIZ, L., CAPIN, R., CAPIN, N., SEPULVEDA, B. & ZAMACONA, G. Activation of the alternative pathway of complement by *Entamoeba histolytica*. *Clinical and Experimental Immunology*, v. 34,10,1978.

OYEYINKA, G.O., ONYEMELUKUWE, G.C. Amoebic liver abscess: serum immunoglobulins and complement in Northern Nigerian patients. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 77, 293-296, 1983.

PÉREZ-TAMAYO, R., MONTFORT, I., OLIVOS-GARCÍA, A., RAMOS, E., OSTRIA, C.B. Pathogenesis of acute experimental liver Amebiasis. *Archives of Medical Research*, v. 37, 203-209, 2006.

PRITT, B. S.; CLARK, C. G. Amebiasis. *Mayo clinic proceedings*, v. 83, 1154-1159, 2008.

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

QUE, X., REED, S. L. Cysteine Proteinases and the pathogenesis of Amebiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, 196-206, 2000.

REED, S.L., CURD, J.G., GIGLI, I., GILIN, F.D., BRAUDE, A.I. Activation of complement by pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. *The journal of Immunology*, v. 136, 2265-2270, 1986.

REED, S.L., KEENE, W.E., MCKERROW, J.H., GIGLI, I. Cleavage of C3 by a neutral cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica*. *The Journal of Immunology*, v. 143, 189-195, 1989.

REED, S.L., KEENE, W.E., MCKERROW, J.H. Thiol proteinase expression correlates with pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, 2772-2777, 1989.

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

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

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

RIGOTHIER, M.C., KHUN, H., TAVARES, P., CARDONA, A., HUERRE, M., GUILLÉN, N. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. *Infection and Immunity*, v. 70, 3208-3215, 2002.

RIVERO-NAVA, L., AGUIRRE-GARCÍA, J., SHIBAYAMA-SALAS, M., HERNANDEZ-PANDO, R., TSUTSUMI, V., CALDERON, J. *Entamoeba histolytica*: acute granulomatous intestinal lesions in normal and neutrophil-depleted mice. *Experimental Parasitology*, v. 101, 183-192, 2002.

SATO, D., NAKADA-TSUKUI, K., OKADA, M., NOZAKI, T. Two cysteine protease inhibitors, EhICP1 and 2 localized indistinct compartments, negatively regulate secretion. *FEBS*, v. 580, 5306-12, 2006.

SEYDEL, K.B., LI, E., SWANSON, P.E., STANLEY JR, S.L. Human intestinal epithelial cells produce pro-inflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infection and Immunity*, v. 65, 1631-1639, 1997.

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

SEYDEL, K.B., SMITH, S.J., STANLEY, J.R. Innate immunity to amoebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. *Infection and Immunity*, 400-402, 2000.

SILVA, E.F. *Entamoeba moshkovskii* TSHALAI, 1941: Novos focos na América do Sul; aspectos da morfologia e biologia em comparação com a *Entamoeba histolytica* SCHAUDINN, 1903 e *Entamoeba ranarum* GRASSI, 1879 - Departamento de Zoologia e Parasitologia - ICB/UFMG - Tese de Mestrado em Parasitologia, 142p, 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., v. 28, 288-289, 1997.

STANLEY JR, S.L. Patophysiology of Amoebiasis. Trends in Parasitology, v. 17, 280-285, 2001 .

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

STANLEY JR, S.L. Amoebiasis. The Lancet, v. 361, 1025-1032, 2003.

TANNICH, E. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene meeting at manson house. London, 19 February 1998. Amoebic disease. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparasion of molecules considered important for host tissue. Trans R Soc Med Hyg., v. 92, 593-6, 1998.

TSUTSUMI, V., MENA-LÓPEZ, R., ANAYA-VELÁSQUEZ, F., MARTINEZ-PALOMO, A. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. Am. J. Pathol., v. 117, 81-91, 1984.

TSUTSUMI, V., MARTINEZ-PALOMO, A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis an ultrastructural study. American Journal of pathology, v. 103, 112-119, 1988.

VELÁQUEZ, C., SHIBAYAMA-SALAS, M., AGIRRE-GARCÍA, J. et al. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. Parasite Immunology, v. 20, 255-262, 1998.

VENTURA-JUÁREZ, J., JARILLO-LUNA, R.A., FUENTES-AGUILAR, E., PINEDA-VÁZQUEZ, A., MUÑOZ-FERNANDEZ, L., MADRID-REYES, J.I., CAMPOS-RODRÍGUES, R. Human amoebic hepatic abscess: *in situ*

interactions between trophozoites, macrophages, neutrophils and T cells. *Parasite Immunology*, v. 25, 503-511, 2003.

VINAYAK, V.K., PURNIMA, K.S., VENKATSWARLU, K., NAIN, C.K., MEHTA, S.K. Specific Circulating immune complexes in amebic liver abscess. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 23, 1088-1090, 1986.

WANG, W., KELLER, K., CHADEE, K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. *Infect. Immun.*, v. 60, 3169-74, 1992.

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

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

ZHANG, Z., MAHAJAN, S., ZHANG, X., STANLEY JR, S.L. 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. *Infection and Immunity*, v. 71, 5355-5359, 2003.

9 Anexos

9.1 Figuras do modelo experimental nº 1

Fig. 1 – Parênquima hepático de hamsters inoculados com trofozoítos de *E. histolytica* ou *E. dispar* e sacrificados com 12 horas de infecção. (a) Lesões nodulares circunscritas (*) contendo infiltrado inflamatório constituído predominantemente de neutrófilos, debris e trofozoíto de *E. histolytica* (cabeça de seta). Grande quantidade de leucócitos no interior dos capilares sinusóides (seta). Parênquima hepático não-necrosado (H). H&E; Barra = 100 µm. (b) Necrose (N) produzida pela *E. dispar*, com infiltrado inflamatório e trofozoíto (cabeça de seta). Parênquima hepático não-necrosado (H) com capilares sinusóides dilatados. H&E; Barra = 20 µm. (c) Reação imuno-histoquímica contra trofozoítos de *E. histolytica* mostrando necrose (N) associada a trofozoítos (setas), infiltrado inflamatório e debris. Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 50 µm. (d) Reação imuno-histoquímica contra trofozoítos de *E. histolytica* mostrando extensa área de necrose hepática (N). Trofozoíto (seta) e antígenos derivados dos trofozoítos (cabeças de seta) são também observados. Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 50 µm. (e) Reação imuno-histoquímica contra trofozoítos de *E. dispar* mostrando trofozoítos (setas) e área de necrose central (N). Barra = 20 µm. (f) Reação imuno-histoquímica contra trofozoítos de *E. dispar* mostrando lesões nodulares (setas) delimitadas por parênquima hepático não-necrosado (H). Material marron-escuro granuloso indicando marcação positiva para antígenos de *E. dispar* (cabeças de seta). Barra = 20 µm.

Fig. 2 – Reação imuno-histoquímica para anticorpos ligados aos trofozoítos no fígado de hamsters infectados com trofozoítos de *E. histolytica* ou *E. dispar*. (a) Lesão nodular constituída por neutrófilos e macrófagos (*) e circunscrita por parênquima hepático não-necrosado (H). Trofozoítos de *E. dispar* vacuolizados com imunoreatividade positiva para anticorpos ligados, sem contato direto com células inflamatórias (setas). (b) Área de necrose (N) contendo trofozoítos de *E. histolytica* imunomarcados (setas). Imunoreatividade também foi observada em hepatócitos lesados (*). (c) Parênquima hepático com reação positiva para anticorpos na parede de capilares sinusóides (cabeças de seta), hepatócitos lesados (*) e trofozoítos de *E. histolytica*. Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 20 µm.

Fig. 3 – Reação imuno-histoquímica para os componentes C3 e C9 do complemento no fígado de hamsters infectados com trofozoítos de *E. histolytica* ou *E. dispar*. (a) Trofozoítos C9⁽⁺⁾ (setas) presentes na área de necrose (N) induzida pela *E. histolytica*. Notar a presença de trofozoítos C9⁽⁺⁾ no interior de vaso sanguíneo (cabeças de seta). Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 20 µm. (b) Necrose hepática (N) produzida pela *E. dispar*. Reações C9⁽⁺⁾ são observadas em trofozoítos intactos (setas) e fragmentados (cabeças de seta). Barra = 20 µm. (c) Área de necrose produzida pela *E. histolytica* (N). Extensas áreas de reação positiva para o componente C3 do complemento são observadas (*). Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 100 µm. (d) Fraca reação C3⁽⁺⁾ no parênquima hepático de hamsters inoculados *E. dispar* (cabeças de seta). (N) necrose. Parênquima hepático não-necrosado (H). Barra = 100 µm. (e) Detalhe da figura 3d mostrando hepatócitos C3⁽⁺⁾ (*) e restos de *E. dispar* C3⁽⁺⁾ (cabeças de seta). Barra = 20 µm. (f) Controle positivo de reação imuno-histoquímica para o componente C3 do complemento (*) em miocárdio reperfundido de rato. Barra = 100 µm.

9.2 Figuras do modelo experimental nº 2

Fig. 4 – Parênquima hepático de camundongo inoculado com *E. histolytica* ou *E. dispar*, tratado ou não tratado com dexametasona. (a)

Necrose hepática induzida em camundongo do grupo EGG (N), delimitada por borda constituída por debris e escasso infiltrado inflamatório (*). (b) Necrose hepática, induzida em camundongo do grupo EGG-DEX (N). (c) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR (N). Debris e escasso infiltrado inflamatório (*). (d) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR-DEX (N). Parênquima hepático não-necrosado (H). Hematoxilina de Harris. Barra = 50 µm.

Fig. 5 – Reação imuno-histoquímica para trofozoítos em fígado de camundongo inoculado com *E. histolytica* ou *E. dispar*, tratado ou não tratado com dexametasona. (a) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo EGG (N). Trofozoítos imunomarcados em meio à necrose hepática (cabeças de seta); (b) Necrose hepática, induzida em camundongo do grupo EGG-DEX (N). Ausência de trofozoítos; (c) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR (N). Muitos trofozoítos de *E. dispar* imunomarcados (cabeças de seta); (d) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR-DEX (N). Ausência de trofozoítos. Parênquima hepático não-necrosado (H). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 μ m.

Fig. 6 – Reação imuno-histoquímica para macrófagos em fígado de camundongo inoculado com *E. histolytica* ou *E. dispar*, tratado ou não tratado com dexametasona. (a) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo EGG (N). Notar a presença de macrófagos imunorreativos na borda da necrose e em seu interior (cabeças de seta); (b) Necrose hepática rica em debris, induzida em camundongo do grupo EGG-DEX (N). Reação imuno-histoquímica positiva para macrófago (cabeça de seta). (c) Necrose hepática rica em debris, induzida em camundongo do grupo MCR (N). Macrófagos são identificados na borda da necrose (cabeças de seta); (d) Necrose hepática rica em debris, induzida em camundongo do grupo MCR-DEX (N). Escassez de macrófagos (cabeça de seta) junto à necrose. Parênquima hepático não-necrosado (H). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 μ m.

Fig. 7 – Reação imuno-histoquímica para neutrófilos em fígado de camundongo inoculado com *E. histolytica* ou *E. dispar*, tratado ou não tratado com dexametasona. (a) Necrose hepática rica em debris induzida em camundongo do grupo EGG (N). Neutrófilos imunorreativos na borda da necrose e em ramo da veia porta (cabeças de seta); (b) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo EGG-DEX (N). Escassos neutrófilos (cabeças de seta). (c) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR (N). Neutrófilos imunomarcados presentes na borda da necrose e em seu interior (cabeças de seta); (d) Necrose hepática induzida em camundongo do grupo MCR-DEX (N). Poucos neutrófilos marcados junto à necrose hepática (cabeças de seta). Parênquima hepático não-necrosado (H). Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. Barra = 50 μ m

9.3 Documento de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG

9.4 Artigo Publicado

9.5 Artigo Submetido

9.6 Cópia da Ata da defesa de tese de doutorado

9.7 Declaração da aprovação da defesa de tese