

---

*Silvio Santana Dolabella*

**ESTUDO COMPARATIVO DA PATOGENICIDADE  
E VIRULÊNCIA DE *Entamoeba dispar* COM  
AMOSTRAS DE *Entamoeba histolytica***

**Belo Horizonte, MG  
2007**

---

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Parasitologia**

**ESTUDO COMPARATIVO DA PATOGENICIDADE  
E VIRULÊNCIA DE *Entamoeba dispar* COM  
AMOSTRAS DE *Entamoeba histolytica***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Doutor.

*Silvio Santana Delabella*

**Orientador:** Prof. Dr. Edward Félix Silva

**Belo Horizonte, MG  
2007**

---

043 Dolabella, Silvio Santana.  
D659e Estudo comparativo da patogenicidade e virulência de Entamoeba dispar com amostras de Entamoeba histolytica [manuscrito] / Silvio Santana Dolabella. – 2007.

xviii, 120 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Edward Félix Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia.

1. Entamoeba dispar - Teses. 2. Entamoeba histolytica – Teses. 3. Amebíase/patogenicidade – Teses. 4. Amebíase/virulência- Teses I. Silva, Edward Félix. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Parasitologia. III. Título.

**Trabalho realizado no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais e nos Laboratórios de Patologia Geral e Biologia Celular do Centro de Investigação e Estudos Avançados do Instituto Politécnico Nacional-México, com o auxílio financeiro da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Desenvolvimento e Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).**

**À minha família.**

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Edward Félix Silva pela orientação, incentivo, carinho e pela sincera e valiosa amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela confiança, apoio, cobranças e facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

A CAPES (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de doutorado e pela oportunidade de estudar em outro país, através do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDEE).

A Rosária, que novamente aceitou minhas longas noites em frente ao computador, pela compreensão nos momentos de ausência e pelo incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Amebíase, Edna Maria Pires e João da Costa Viana, pelo apoio incondicional, paciência e constante disponibilidade na realização dos experimentos.

A Michelle Ribeiro, amiga de toda uma jornada, pelo carinho, apoio, amizade e alegrias compartilhadas.

Ao amigo Francesco Iudici Neto, por sua amizade e estímulos.

Aos amigos de Pós-Graduação Haendel Gonçalves e Helen Cristine, pelo companheirismo.

---

Aos Professores Orivaldo Alves Rocha e Anilton Cesar Vasconcelos, do Departamento de Patologia do ICB/UFMG, pela valiosa colaboração na parte de patologia.

Ao Professor Ricardo Wagner de Almeida Vitor, por seu exemplo e consideração.

Aos Drs. Mineko Shibayama e Victor Tsutsumi, pesquisadores do Departamento de Patologia Experimental do Centro de Investigação e Estudos Avançados do Instituto Politécnico Nacional – México (CINVESTAV), pela atenção e orientação no desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos demais integrantes do Departamento de Patologia Experimental do Centro de Investigação e Estudos Avançados do Instituto Politécnico Nacional – México, que me proporcionaram um estágio tranquilo e um ótimo ambiente de trabalho: Silvia Galindo Gómez, Angélica Silva Olivares, Mireya Sánchez Palomero, Dagoberto Carrasco, Judith Pacheco Yépez, Martha Dueñas e Jesús Serrano Luna. Um carinho especial aos amigos que a vida me deu a oportunidade de conhecer: Isaac Cervantes Sandoval, Juan Manuel Gutiérrez Meza e María Fernanda López Gómez, os levo em meu coração.

Ao Dr. Fernando Navarro García, pesquisador do Departamento de Biologia Celular do CINVESTAV, que tão gentilmente me auxiliou nos experimentos com cultivos de células MDCK. Um agradecimento especial a Rocío Huerta Cantillo, auxiliar de investigação e que me acompanhou em grande parte dos experimentos neste laboratório, muito obrigado.

A Professora Alane Beatriz Vermelho, que gentilmente me abriu as portas de seu laboratório e me apoiou nos experimentos de proteases e a toda a equipe do Laboratório de Proteases de Microorganismos: Ana Maria Mazotto de Almeida, Barbara Gabriela Brun de Paiva Lopes,

---

Edilma Paraguai de Souza Dias, Ana Cristina Nogueira de Melo, Ana Lúcia Vazquez Villa e Thalita Rodrigues Duarte.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação em Parasitologia, pela contribuição em minha formação acadêmica.

A Sumara Aparecida Guilherme, secretária de Pós-Graduação, pela disponibilidade, incentivo e compreensão, muito obrigado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho e não foram citados.

A Força Superior, que todos os dias guia meus passos e me dá forças para trilhar o caminho escolhido.



**“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder  
o que, com frequência, poderíamos ganhar,  
por simples medo de arriscar.”**

**William Shakespeare**

---



|  |      |
|--|------|
| Lista de Figuras e Tabelas .....   | XII  |
| Lista de Abreviaturas .....  | XVII |
| Resumo .....   | XIX  |
| <br>   |      |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 1    |
| 1.1. Histórico .....   | 2    |
| 1.2. Prevalência Mundial .....   | 6    |
| 1.3. Morfologia e Biologia da <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i> ..... | 7    |
| 1.3.1. Trofozoítos de <i>E. histolytica</i> .....                            | 7    |
| 1.3.2. Pré-cistos.....   | 9    |
| 1.3.3. Cistos .....  | 9    |
| 1.3.4. Metacistos .....  | 10   |
| 1.3.5. Ciclo Biológico .....   | 10   |
| 1.3.6. <i>Entamoeba dispar</i> .....   | 11   |
| 1.4. Patogenia e Virulência .....  | 14   |
| 1.5. Estudos Experimentais de Virulência .....                               | 21   |
| 1.5.1. <i>In vitro</i> .....   | 21   |
| 1.5.1.1. Fagocitose .....  | 21   |
| 1.5.1.2. Efeito Citopático .....   | 23   |
| 1.5.1.3. Proteases .....   | 23   |
| 1.5.2. <i>In vivo</i> .....  | 24   |
| <br>   |      |
| 2. JUSTIFICATIVA .....   | 25   |
| <br>   |      |
| 3. OBJETIVOS .....   | 27   |
| 3.1. Objetivo Geral .....  | 28   |
| 3.2. Objetivos Específicos .....   | 28   |
| <br>   |      |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 29   |
| 4.1. Cepas utilizadas .....  | 30   |

---

|   |    |
|---|----|
| 4.2. Estudos de virulência .....  | 31 |
| 4.2.1. Estudos <i>in vivo</i> .....   | 31 |
| 4.2.1.1. Preparo dos inóculos .....   | 31 |
| 4.2.1.2. Inoculação intra-hepática em hamster....   | 32 |
| 4.2.2. Estudos <i>in vitro</i> .....  | 33 |
| 4.2.2.1. Eritrofagocitose .....   | 33 |
| 4.2.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida .....                             | 34 |
| 4.2.2.3. Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll .....      | 35 |
| 4.2.2.4. Efeito Citopático sobre Células MDCK .....   | 36 |
| 4.2.2.5. Medida da Resistência Transepitelial (R <sub>Te</sub> ) .....                      | 37 |
| 4.2.2.6. Preparo de anticorpos policlonais anti- <i>E. dispar</i> em coelhos .....          | 38 |
| 4.2.2.7. Imunohistoquímica .....  | 38 |
| 4.3. Estudos de ultraestrutura .....  | 39 |
| 4.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....  | 39 |
| 4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura .....  | 40 |
| 5. RESULTADOS .....   | 42 |
| 5.1. Estudos de virulência .....  | 43 |
| 5.1.1. Estudos <i>in vivo</i> - Cinética da Formação das Lesões Hepáticas em Hamsters ..... | 43 |
| 5.1.1.1. Cepa ICB-ADO polixênica ( <i>E. dispar</i> ) .....                                 | 43 |
| 5.1.1.2. Cepa ICB-EGG monoxênica ( <i>E. histolytica</i> ) .....                            | 54 |
| 5.1.1.3. Inoculação de meio de cultura .....  | 67 |
| 5.1.1.4. Inoculação de bactérias da cepa ICB-ADO polixênica .....                           | 68 |
| 5.1.1.5. Inoculação de trofozoítos fixados com glutaraldeído .....                          | 68 |
| 5.1.2. Estudos <i>in vitro</i> .....  | 69 |
| 5.1.2.1. Eritrofagocitose .....   | 69 |

---

|   |     |
|---|-----|
| 5.1.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida .....   | 70  |
| 5.1.2.3. Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll .....  | 73  |
| 5.1.2.4. Efeito Citopático sobre Células MDCK .....   | 78  |
| 5.1.2.5. Medida da Resistência Transepitelial (R <sub>Te</sub> ).....   | 78  |
| 5.1.2.6. Imunohistoquímica .....  | 80  |
| 5.2. Estudos de ultraestrutura .....  | 82  |
| 5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura .....  | 82  |
| 5.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....  | 87  |
| 6. DISCUSSÃO.....   | 90  |
| 6.1. Estudos <i>in vivo</i> - Cinética da Formação das Lesões Hepáticas em Hamsters .....   | 91  |
| 6.2. Estudos <i>in vitro</i> .....  | 95  |
| 6.2.1. Eritrofagocitose .....   | 95  |
| 6.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida e Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll ..... | 96  |
| 6.2.3. Efeito Citopático sobre Células MDCK e Medida da Resistência Transepitelial (R <sub>Te</sub> ) .....                             | 99  |
| 6.2.4. Imunohistoquímica .....  | 101 |
| 6.3. Estudos de Ultraestrutura .....  | 102 |
| 7. CONCLUSÕES .....   | 104 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 106 |

---

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Ciclo biológico da <i>E. histolytica/E. dispar</i> .....  | 13 |
| Figura 2: Montagem da câmara Transwell® em poço de placa Costar 3524 .....  | 38 |
| Figura 3. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster uma hora pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> .....   | 44 |
| Figura 4. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster três horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> ..... | 46 |
| Figura 5. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster seis horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> ..... | 48 |
| Figura 6. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster doze horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> ..... | 49 |
| Figura 7. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 24 horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> .....   | 51 |
| Figura 8. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 48 horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> .....   | 52 |

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 9. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster uma hora pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....   | 55 |
| Figura 10. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster três horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....                                      | 57 |
| Figura 11. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster seis horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....                                      | 59 |
| Figura 12. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster doze horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....                                      | 60 |
| Figura 13. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 24 horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....  | 62 |
| Figura 14. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 48 horas pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> .....  | 64 |
| Figura 15. Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster sete dias pós-inoculação com $5,0 \times 10^5$ trofozoítos a cepa ICB-EGG monoxênica .....   | 66 |
| Figura 16. Distribuição do somatório das áreas de necrose e infiltrado inflamatório em diferentes períodos de infecção por cepas de <i>E. histolytica</i> (ICB-EGG monoxênica) e <i>E. dispar</i> (ICB-ADO polixênica) ..... | 67 |

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 17. Fagocitose de eritrócitos humanos por cepas de <i>E. histolytica</i> (E.h.) e <i>E. dispar</i> (E.d.). Foi utilizada uma relação de um trofozoíto para 100 eritrócitos .....  | 69 |
| Figura 18. Porcentagem de trofozoítos de cepas de <i>E. histolytica</i> (E.h.) e <i>E. dispar</i> (E.d.) que fagocitaram eritrócitos humanos após 30 minutos de interação .....  | 70 |
| Figura 19. Atividade proteolítica de extratos totais da cepa HM1-IMSS de <i>E. histolytica</i> e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie .....           | 71 |
| Figura 20. Atividade proteolítica de extratos totais da cepa ICB-EGG monoxênica de <i>E. histolytica</i> e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie ..... | 72 |
| Figura 21. Atividade proteolítica de extratos totais da cepa ICB-ADO polixênica de <i>E. dispar</i> e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie .....      | 73 |
| Figura 22. Atividade proteolítica de extrato total de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (cepas ICB-EGG) e <i>E. dispar</i> (cepas ICB-ADO) com substrato azocoll .....  | 74 |
| Figura 23. Atividade proteolítica de extrato total de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (cepas ICB-EGG) e <i>E. dispar</i> (cepas ICB-ADO) com substrato azure .....  | 74 |

---

|  |    |
|--|----|
| Figura 24. Atividade proteolítica de meio condicionado de <i>E. histolytica</i> (cepas ICB-EGG) e <i>E. dispar</i> (cepas ICB-ADO) com substrato azocoll .....   | 75 |
| Figura 25. Atividade proteolítica de meio condicionado de <i>E. histolytica</i> (cepas ICB-EGG) e <i>E. dispar</i> (cepas ICB-ADO) com substrato azure .....   | 76 |
| Figura 26. Inibição da atividade proteolítica de extratos totais de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (cepa ICB-EGG monoxênica) e <i>E. dispar</i> (cepa ICB-ADO monoxênica), utilizando como substrato azocoll .....                                 | 77 |
| Figura 27. Inibição da atividade proteolítica de extratos totais de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> (cepa ICB-EGG polixênica) e <i>E. dispar</i> (cepa ICB-ADO polixênica), utilizando como substrato azocoll .....                                 | 77 |
| Figura 28. Efeito de trofozoitos de <i>E. dispar</i> (ICB-ADO monoxênica) e <i>E. histolytica</i> (ICB-EGG monoxênica) na resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas .....  | 79 |
| Figura 29. Efeito de trofozoitos de <i>E. dispar</i> (ICB-ADO polixênica) e <i>E. histolytica</i> (ICB-EGG polixênica) na resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas .....  | 79 |
| Figura 30. Interação <i>in vivo</i> em diferentes tempos pós-inoculações de trofozoítos de <i>E. dispar</i> (cepa ICB-ADO polixênica) com hepatócitos de hamsters, utilizando peroxidase marcada contra anticorpos policlonais de <i>E. dispar</i> ..... | 81 |
| Figura 31. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica ( <i>E. dispar</i> ), apresentando delgados filopódios (fi) aderidos ao substrato .....   | 83 |



---

|  |    |
|--|----|
| Figura 32. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-EGG polixênica ( <i>E. histolytica</i> ) .....               | 84 |
| Figura 33. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-ADO monoxênica ( <i>E. dispar</i> ).....                     | 85 |
| Figura 34. Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica ( <i>E. histolytica</i> ) .....               | 86 |
| Figura 35. Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica ( <i>E. dispar</i> ) .....                                  | 87 |
| Figura 36. Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-ADO monoxênica ( <i>E. dispar</i> ) .....                                  | 88 |
| Figura 37. Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-EGG polixênica ( <i>E. histolytica</i> ) .....                             | 88 |
| Figura 38. Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica ( <i>E. histolytica</i> ) .....                             | 89 |
| Tabela 1: Efeito citopático de cepas de <i>E. histolytica</i> (E.h.) e <i>E. dispar</i> (E.d.) sobre monocamadas de células MDCK ..... | 78 |

---

LISTA DE ABREVIATURAS

- AHA – abcesso hepático amebiano  
cf – *Crithidia fasciculata*  
CHO - *chinese hamster ovary cells* (células)  
CINVESTAV – Centro de Investigação e Estudos Avançados  
CP – cisteíl-proteinases  
DAB – diaminobenzidina  
E-64 - *L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide-(4-guanido)-butane*  
E.d. – *Entamoeba dispar*  
E.h. – *Entamoeba histolytica*  
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético  
fe – formações esferoidais  
fi – filopódios  
Gal/GalNac - galactose/N-acetil-galactosamina  
GPI – glicose fosfato isomerase  
g – grama (peso)  
HE – hematoxilina-eosina  
HK – hexoquinase  
ICB – Instituto de Ciências Biológicas  
IgA – imunoglobulina A  
IgG – imunoglobulina G  
kDa – quilodáltons  
kg – quilograma  
M – molar  
ma – estoma de macropinocitose  
MDCK - *Madin-Darby canine kidney cells* (células)  
ME – enzima málica  
MEM – meio essencial mínimo  
MET – microscopia eletrônica de transmissão  
MEV – microscopia eletrônica de varredura  
mg – miligrama

---

mi – estoma de micropinocitose  
min – minuto  
mL – mililitros  
mM – milimolar  
nm – nanômetro  
PBS – solução salina tamponada  
PGM – fosfoglicomutase  
pH – potencial hidrogeniônico  
PHMB – ácido p-hidroxiomercuriobenzóico  
PMN - polimorfonucleares  
PMSF – fluoreto de fenilmetilsufonil  
SDS – dodecilsulfato de sódio  
SDS-PAGE – *sodium dodecil sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis*  
SFB – soro fetal bovino  
TCA – ácido tricloroacético  
TER – resistência transepitelial  
Tris-OH – trisma base – tris(hidroximetil)aminometano  
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais  
UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro  
V – volt  
VERO – *African green monkey kidney epithelial cells* (células)  
WHO – Organização Mundial de Saúde  
 $\mu\text{g}$  – micrograma  
 $\mu\text{L}$  – microlitro  
 $\mu\text{m}$  – micrômetro

---

## RESUMO

Neste trabalho, aspectos da patogenicidade e virulência da cepa ICB-ADO polixênica de *Entamoeba dispar* foram abordados, visando um melhor conhecimento dos mecanismos de agressão que essa cepa apresenta.

Considerada uma espécie não-patogênica, *E. dispar* tem sido isolada de pacientes brasileiros com colite não disentérica e demonstrado capacidade de ocasionar lesões em animais de experimentação, quando associada à flora da microbiota intestinal de seus hospedeiros.

Estudos *in vivo* utilizando hamsters como modelo experimental, verificaram diferenças na cinética das lesões hepáticas ocasionadas pela cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*, diferindo substancialmente do observado para as cepas ICB-EGG e HM1-IMSS de *E. histolytica*. Apesar de ocasionar lesões extensas após sete dias de inoculação, a cepa ICB-ADO demonstra uma capacidade de lesar mais lentamente os tecidos.

Estudos *in vitro* demonstraram ser a cepa ICB-ADO de *E. dispar* capaz de ocasionar a destruição e a queda da medida da resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas, embora de forma mais lenta e gradual que cepas de *E. histolytica*. A cepa ICB-ADO polixênica apresentou também uma maior atividade de proteases quando comparada com a cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*, devendo a relação bactérias/amebas ser melhor estudada, objetivando conhecer mais profundamente as alterações que elas causam nos trofozoítos quando em associação.

**1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. Histórico

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) amebíase é a presença do protozoário *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) no organismo humano com ou sem manifestações clínicas.

A amebíase é uma parasitose que atinge cerca de 10% a 20% da população mundial, sendo mais comum em regiões tropicais e subtropicais, onde a população é mais carente, com baixo nível sócio-econômico e higiênico sanitário (Stanley, 2003; Stauffer & Ravdin, 2003). Caracteriza-se como uma doença comumente crônica e afebril que envolve a parede do intestino grosso, podendo estender-se a outros órgãos e tecidos do organismo humano (Muñoz et al., 1985).

Em 1860 Lambl publicou a identificação de um microorganismo que encontrou ao estudar as fezes de um garoto com disenteria; porém, considerou que este protozoário não era patogênico, embora aparecesse associado a casos de patologia intestinal como a do garoto em referência. Cunningham, em 1871, ao isolar o protozoário das fezes de pacientes que apresentavam diarréia por causa da cólera estabeleceu que era um organismo associado a esta enfermidade.

Lösh (1875) descreve o mesmo microorganismo ao observá-lo nas fezes de um campesino de 24 anos procedente de São Petesburgo que apresentava diarréia, disenteria, dor abdominal, febre e debilidade generalizada. Após a morte do paciente, Lösh realiza uma necrópsia e ao examinar o intestino grosso encontra úlceras contendo o mesmo microorganismo que antes havia identificado nas fezes do enfermo. Ao realizar o exame histopatológico das lesões, observa ao nível da submucosa um infiltrado celular com a presença de amebas idênticas às observadas antes. Posteriormente, Lösh inocula por via oral e retal o material obtido das úlceras a quatro cães, sendo que um dos animais desenvolveu um quadro de disenteria aguda. A necrópsia deste animal demonstrou a presença de ulcerações na mucosa intestinal com a presença de amebas nas lesões e nas fezes. Ele então denominou o

---

protozoário encontrado como *Amoeba coli*, porém não atribuiu a ele a verdadeira causa da disenteria.

Por sua vez, Kartulis (1886) e Köch (1887), através de estudos com pacientes apresentando quadros de disenteria tropical, atribuíram patogenicidade às amebas, responsabilizando-as pelos quadros observados.

Councilman & Lafleur, em 1891, denominaram o parasito causador da amebíase como *Entamoeba dysenteriae*, sendo os primeiros a empregarem os termos “disenteria amebiana” e “abscesso hepático amebiano”, sugerindo também a existência de uma outra ameba, que não seria patogênica.

Em 1893 Quincke e Roos identificaram a existência de diferentes espécies de amebas que podiam viver no cólon humano e descreveram o ciclo biológico do que agora conhecemos como *Entamoeba histolytica*, inclusive a identificação da forma infectante do parasito e a demonstração da sua capacidade de infecção ao ser ingerido o cisto. O nome definitivo deste protozoário foi dado em 1903 por Schaudinn, que verificou a existência de dois tipos de amebas no intestino humano: uma patogênica, que denominou de *E. histolytica*, e outra não patogênica, chamada então de *Entamoeba coli*.

Prowazek (1912) descreveu uma ameba morfologicamente semelhante à *E. histolytica*, embora menor, denominando-a *Entamoeba hartmanni*.

Em 1913 Walker & Selards confirmaram que cistos oriundos de pessoas sem sintomas disentéricos poderiam produzir infecções assintomáticas ou causar disenteria, ao passo que amebas provenientes de disenteria aguda eram capazes de ocasionar infecções assintomáticas.

Craig em 1917 e posteriormente Dobell em 1919 formulam a Teoria Unicista, na qual a *E. histolytica* constitui uma única espécie, parasito obrigatório dos tecidos e sempre causando lesões. Seus seguidores (Faust et al., 1946 e D’Antoni, 1952) admitem que este parasito, em muitas regiões do planeta, viva em estado de equilíbrio

---

com seu hospedeiro, onde as lesões ocasionadas por aquele podem ser regeneradas, não havendo assim manifestações clínicas.

Porém, outra teoria surgiu em 1925 (Brumpt) que procura explicar as diferenças geográficas nas formas clínicas da doença e o grande número de indivíduos infectados assintomáticos. Esta teoria foi denominada Dualista e propõe a existência de duas espécies morfológicamente indistinguíveis: *E. dispar*, um organismo não patogênico e *E. dysenteriae* (= *E. histolytica*), que seria a forma patogênica. Como não existiam meios de distinguir os dois organismos, as idéias de Brumpt tiveram pouca aceitação.

Com o advento do cultivo de amebas por Boech & Drbohlav em 1925 novos estudos foram realizados, com importância marcante na história da amebíase.

Uma nova teoria foi proposta por Hoare em 1961 que afirmava existir cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência, causando desde infecções assintomáticas até formas mais graves da doença. Essa teoria ficou conhecida como Teoria Pluralista. Entretanto, ela não explica o fato de ser a amebíase invasiva mais frequente em países de clima tropical do que naqueles de clima temperado ou frio.

Na década de 70, utilizando concanavalina-A (Con-A), Martínez-Palomo et al. (1973) e Trissl et al. (1977) demonstraram diferenças na aglutinação entre cepas de *E. histolytica* isoladas de indivíduos sintomáticos e aqueles com infecção assintomática.

O conceito de Brumpt de duas espécies morfológicamente idênticas foi retomado 50-60 anos mais tarde, quando a tecnologia tornou possível investigar essa teoria.

A prova definitiva ocorreu em 1978 quando Sargeant et al. revelaram que *E. histolytica* poderia ser dividida em dois grupos através da eletroforese de isoenzimas, verificando diferenças no perfil isoenzimático (zimodema) de isolados amebianos classificados como “patogênicos” e “não-patogênicos”, podendo ser correlacionados com a forma clínica e com parâmetros biológicos, sendo que esta técnica foi aplicada a centenas de amostras isoladas em vários continentes.



---

Estes autores demonstraram existir perfis distintos de bandas entre culturas de amebas provenientes de indivíduos sintomáticos e assintomáticos, quando submetidas à eletroforese de isoenzimas fosfoglicomutase (PGM), glicose fosfato isomerase (GPI), enzima málica (ME) e enzima hexoquinase (HK). Foram descritos mais de 21 zimodemas e, de um modo geral, a ausência da banda  $\alpha$  e a presença da banda  $\beta$  em PGM, assim como as bandas de corrida rápida em HK, são considerados marcadores de patogenicidade para *E. histolytica* (Sargeant, 1985).

Esta divisão teve suporte com a descoberta em 1988 de diferenças antigênicas entre os isolados de dois grupos (Strachan et al., 1988) e em 1989 pelas diferenças substanciais dos níveis de DNA (Tannich et al., 1989).

O problema surgido pela classificação da *E. histolytica* em formas “patogênicas” e formas “não-patogênicas” por diversos pesquisadores foi revisado por Spice & Ackers (1992). Eles foram os primeiros a indagar se a ameba responsável por uma infecção assintomática deveria ser considerada como uma espécie diferente, com hábitos exclusivamente de comensal.

Posteriormente, a classificação entre formas “patogênicas” e “não-patogênicas” pôde ser efetuada a nível molecular, levando vários pesquisadores e a Organização Mundial de Saúde a apoiarem a teoria dualista (Sargeant, 1986; Diamond, 1992; Diamond & Clark, 1993; WHO, 1997). A aceitação da *E. histolytica* e *E. dispar* como espécies distintas trouxe mudanças graduais, porém profundas, no entendimento da epidemiologia, controle e tratamento da amebíase.

Desde 1986, Sargeant sugeriu que a nomenclatura proposta por Brumpt – *E. histolytica* e *E. dispar* – fosse novamente utilizada.

---

## 1.2. Prevalência Mundial

A amebíase é considerada uma infecção de distribuição cosmopolita. Walsh (1986) relata que, em escala mundial, cerca de 500 milhões de pessoas estão infectadas, com 8 a 10% apresentando formas clínicas sintomáticas como colite, diarreia e abscesso hepático, entre outros. Com a aceitação da existência da *E. dispar*, admite-se que a maioria das infecções assintomáticas seja devida a essa espécie (Clark, 1998; Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000).

Algumas regiões se destacam no cenário mundial na prevalência da amebíase, sendo que a proporção de indivíduos que manifestam a doença não é uniforme nas diferentes áreas geográficas: nas Américas estima-se que existam 95 milhões de infectados, 10 milhões de enfermos e 10 a 30 mil mortes anuais (WHO, 1997). O México é um dos países do mundo que mais sofre com a enfermidade, apresentando uma alta incidência de formas intestinais e assintomáticas, sendo que o abscesso hepático chegou a ocupar o 4º lugar entre as causas de mortes no Hospital da Cidade do México (Crevenna et al., 1972). Ainda na América Latina, Colômbia e Venezuela (Cortez-Mendonza, 1956) apresentam uma maior frequência da forma invasiva. Na Ásia, onde o problema é grave, existem 300 milhões de infectados, 20 a 30 milhões de enfermos e 20 a 50 mil mortes, sendo o continente que apresenta o maior número de pessoas infectadas pela *E. histolytica* (WHO, 1997); na Índia (Subramanian, 1968), Tailândia, Singapura e Indochina (Elsdon-Dew, 1968) as formas graves da amebíase são frequentes. A África, por sua vez, apresenta uma alta incidência da amebíase invasiva na região subsahariana com cerca de 85 milhões de infectados, 10 milhões de enfermos e 10 a 20 mil mortes. Fatores como precárias condições de higiene e saneamento básico, educação deficiente e existência de linhagens virulentas do parasito contribuem para tornar a amebíase um problema social e de saúde pública (Guerrant, 1986; Martinez-Palomo, 1988).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1997) a amebíase é a segunda causa de morte por doenças parasitárias causadas

---

por protozoários a nível mundial, com cerca de 100 mil casos fatais por ano. Além disso, a doença é responsável por prolongados períodos de incapacidade das pessoas afetadas, necessitando assistência médica e, às vezes, até mesmo hospitalização.

No Brasil, o número de infectados por *E. histolytica* varia de região para região, apresentando percentuais extremamente variáveis (Silva et al., 1997; Braga et al., 1998; Pinheiro et al., 2004; Araujo & Fernandez, 2005; Benetton et al., 2005). Observa-se alta prevalência nas regiões norte e nordeste e baixa prevalência nas regiões sul e sudeste, sendo que estes casos não apresentam a gravidade e intensidade daqueles observados no México e em alguns países da África e da Ásia. Na região amazônica, os casos de amebíase sintomática ou invasiva são mais frequentes e graves que nas demais regiões do Brasil (Cunha et al., 1977; de Menezes, 1986; Chaves, 1991).

### **1.3. Morfologia e Biologia da *E. histolytica*/*E. dispar***

O ciclo biológico da *E. histolytica*/*E. dispar* é monoxênico, não necessitando assim de um hospedeiro intermediário para o seu desenvolvimento. Consiste de quatro estágios evolutivos: trofozoítos, pré-cistos, cistos e metacistos.

Das quatro fases do ciclo das amebas, os trofozoítos e os cistos constituem fases bem definidas do parasito. Os pré-cistos e metacistos são, por outro lado, fases intermediárias ou transitórias: a primeira, antes da diferenciação completa em cistos e a segunda, antes da formação dos trofozoítos maduros.

#### **1.3.1. Trofozoítos de *E. histolytica***

Os trofozoítos são notavelmente móveis e muito ativos na captação de alimentos (fagocitose), sendo sensíveis a mudanças físicoquímicas do ambiente, ocorrendo o mesmo com variações locais

---

de pH, osmolaridade e potencial de óxido-redução. Os parasitos obtidos de fezes disentéricas ou de lesões hepáticas ou intestinais têm somente um núcleo, são pleomórficos, medindo entre 20 a 40µm. As amebas em cultivos medem entre 7 a 30µm, embora em algumas ocasiões podemos observar trofozoítos medindo até 50µm. Se movem com relativa rapidez mediante a formação de pseudópodes (lobopódios) que aparecem bruscamente em qualquer área da superfície do corpo e com maior frequência na zona anterior dos trofozoítos.

Em sua superfície notam-se pseudópodes, estomas/citóstomas e um uróide posterior (González-Robles & Martínez-Palomo, 1983). Dentre as propriedades de superfície mais importantes que apresentam as amebas, encontram-se a aglutinação com a lecitina concanavalina A (Martínez-Palomo et al., 1973) e a capacidade de formar “capping”, que é a redistribuição dos componentes membranosos e o acúmulo destes componentes em um pólo da superfície amebiana (o uróide). Esta propriedade permite a ameba liberar anticorpos unidos à sua membrana (Calderón et al., 1980) ou realizar a sua endocitose (Kettis & Sundqvist, 1978). Além do mais, apresentam em sua superfície glicoproteínas (consideradas como fatores de virulência) como a lectina Gal/GalNac 260 kDa (Petri & Ravdin, 1991), a lectina de 220 kDa (Rosales-Encina et al., 1987) e a adesina de 112 kDa (Arroyo & Orozco, 1987).

O citoplasma apresenta duas áreas que não estão claramente separadas. O ectoplasma é em geral hialino, livre de estruturas membranosas ou vacuolares e está associado aos pseudópodes e a outras extensões citoplasmáticas como os filopódios. No endoplasma se encontram múltiplos vacúolos ou vesículas de diferentes tamanhos rodeadas de uma matriz citoplasmática relativamente homogênea.

Uma grande parte do volume citoplasmático está ocupada por vacúolos membranosos, em sua maioria esféricos, com uma grande variação de tamanho.

O conteúdo dos vacúolos amebianos é variável e depende da origem dos trofozoítos; aqueles obtidos de pacientes e de cultivos

---

polixênicos possuem poucos vacúolos, enquanto amebas cultivadas axenicamente mostram uma maior quantidade deles.

Trofozoítos obtidos de biópsia de paciente com amebíase contêm nos vacúolos eritrócitos, células inflamatórias e células do tecido que invadiram (Griffin & Juniper, 1971; Pittman et al., 1973); o mesmo ocorre com as amebas recuperadas de animais experimentalmente infectados (Takeuchi & Phillips, 1975).

Os primeiros estudos sobre a ultraestrutura dos trofozoítos de *E. histolytica* mostraram que estes parasitos não apresentam organelas típicas bem diferenciadas como mitocôndrias, aparelho de Golgi, retículo endoplasmático rugoso, centríolos e microtúbulos. Porém, como apresenta seu DNA confinado por uma membrana nuclear, é considerada uma célula eucariótica.

### 1.3.2. Pré-cistos

Os precistos são formas intermediárias entre os trofozoítos e os cistos, sendo ovais ou ligeiramente arredondados e menores que os trofozoítos.

### 1.3.3. Cistos

Os cistos são estruturas esféricas ou ovais com a parede cística rígida, contendo inicialmente somente um núcleo, que após uma série de divisões nucleares se transformam em cistos tetranucleados. Têm, em média, 12  $\mu\text{m}$  de diâmetro, com variações entre 8 a 20 $\mu\text{m}$  (Chavez et al., 1978). Somente os cistos têm importância no processo de transmissão da doença, sendo as únicas formas infectantes.

Em fezes humanas, sem corantes, se observam como corpos hialinos com uma parede refringente, com núcleos pouco visíveis, assim como os corpos cromatóides. Em amostras coradas com iodo ou lugol os cistos se apresentam com um a quatro núcleos. Quando coradas com hematoxilina férrica, o citoplasma desta forma do parasito se apresenta

---

vacuolar com corpos cromatóides de cor azul escuro, em forma de barras cilíndricas (Proctor & Gregory, 1973).

#### 1.3.4. Metacistos

Os cistos após ingestão e por um processo ainda não totalmente elucidado, libertam uma ameba tetranucleada denominada metacisto que irá originar, através de uma série de divisões nucleares e citoplasmáticas, primeiro a quatro e finalmente a oito amebas uninucleadas, denominadas trofozoítos metacísticos.

#### 1.3.5. Ciclo biológico

O ciclo geralmente se inicia com a ingestão de água ou alimentos contaminados com cistos maduros, provenientes de fezes de indivíduos parasitados. A transmissão homem a homem realiza-se habitualmente através de mãos sujas contaminadas e também através de práticas sexuais.

Os cistos passam então pelo estômago resistindo à ação do suco gástrico e atingem o final do intestino delgado ou início do intestino grosso, onde ocorre o desencistamento e a saída do metacisto através de uma pequena fenda na parede cística. Em seguida, o metacisto sofre sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas originando quatro e posteriormente oito trofozoítos metacísticos que migram para o intestino grosso onde se fixam. Em certas circunstâncias não muito bem conhecidas, despreendem-se da mucosa intestinal e transformam-se em pré-cistos e posteriormente cistos que serão eliminados juntamente com as fezes formadas (figura 1).

Algumas cepas de *E. histolytica* podem viver como comensais na luz intestinal, não causando sintomas clínicos no hospedeiro. Porém, outras cepas podem causar danos, com invasão de tecidos e formação de úlceras, às vezes atingindo também outros órgãos, principalmente o fígado, causando “abscesso hepático” e, ainda, os pulmões e mais raramente o cérebro .

---

Apesar da alta mortalidade (cerca de 100.000 pessoas/ano), muitos casos de infecção assintomática são registrados. Tem-se observado que a grande maioria das infecções por *E. histolytica* é completamente assintomática.

#### 1.3.6. *Entamoeba dispar*

Com relação a *E. dispar*, admite-se que seja morfologicamente indistinguível da *E. histolytica*, pelo menos à microscopia de luz. Porém, com a axenização de uma cepa de *E. dispar* por Clark (1995), aspectos ultra-estruturais dessa ameba puderam ser comparados com aqueles da *E. histolytica* (Espinosa-Cantellano et al., 1998), sendo observadas diferenças na estrutura da membrana nuclear e no aspecto da superfície das duas amebas, onde se destaca um notável uróide (região de alta adesividade geralmente localizada na região oposta à da direção do pseudópodo, observando-se restos celulares e bactérias, os quais são parcialmente eliminados no substrato – Martinez-Palomo, 1982), raramente presente em *E. histolytica*.

Através da microscopia eletrônica de transmissão observa-se numerosos vacúolos que tendem a concentrar em determinadas áreas do citoplasma da *E. dispar*, enquanto áreas livres de vacúolos apresentam metacromasia quando coradas com azul de toluidina devido à presença de largos depósitos de glicogênio, raramente encontrado em *E. histolytica*. Na *E. histolytica* estes vacúolos são menores e estão distribuídos de forma uniforme no citoplasma (Espinosa-Cantellano et al., 1998).

Diferenças entre trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* são evidenciadas quando observados através de microscopia óptica com tecnologia NOMARSKI. A forma dos trofozoítos de *E. dispar* é alongada, com um pseudópode anterior proeminente e largo e um notável uróide posterior. Em contraste, trofozoítos de *E. histolytica* tendem a ser globosos com vários pequenos pseudópodes e um uróide menos comumente visto, o núcleo apresenta grânulos finos periféricos e

---

um anel cromático mais denso que o observado em *E. dispar* (Espinosa-Cantellano et al., 1998).

Provavelmente a diferença mais acentuada entre estes dois parasitos é que a membrana celular de *E. dispar* mostra uma camada mais delgada e em algumas ocasiões interrompida, diferentemente da *E. histolytica* que possui uma membrana mais grossa e uniforme (Espinosa-Cantellano et al., 1998).

Ao microscópio eletrônico, Chávez-Munguía et al. (2000) descreveram a presença de estruturas semelhantes ao complexo de Golgi em *E. dispar*.

*E. dispar* parece ser menos capaz de obter nutrientes por pinocitose do que a *E. histolytica*, o que pode explicar sua dificuldade em crescer em meio axênico (Clark, 1998). Além disso, *E. dispar* produz menos proteases (Brucchaus et al., 1996) e tem um glicocálix mais fino (Espinosa-Castellano et al., 1998), tendo ligação mais fraca e menos tóxica com as células (Dodson et al., 1997).



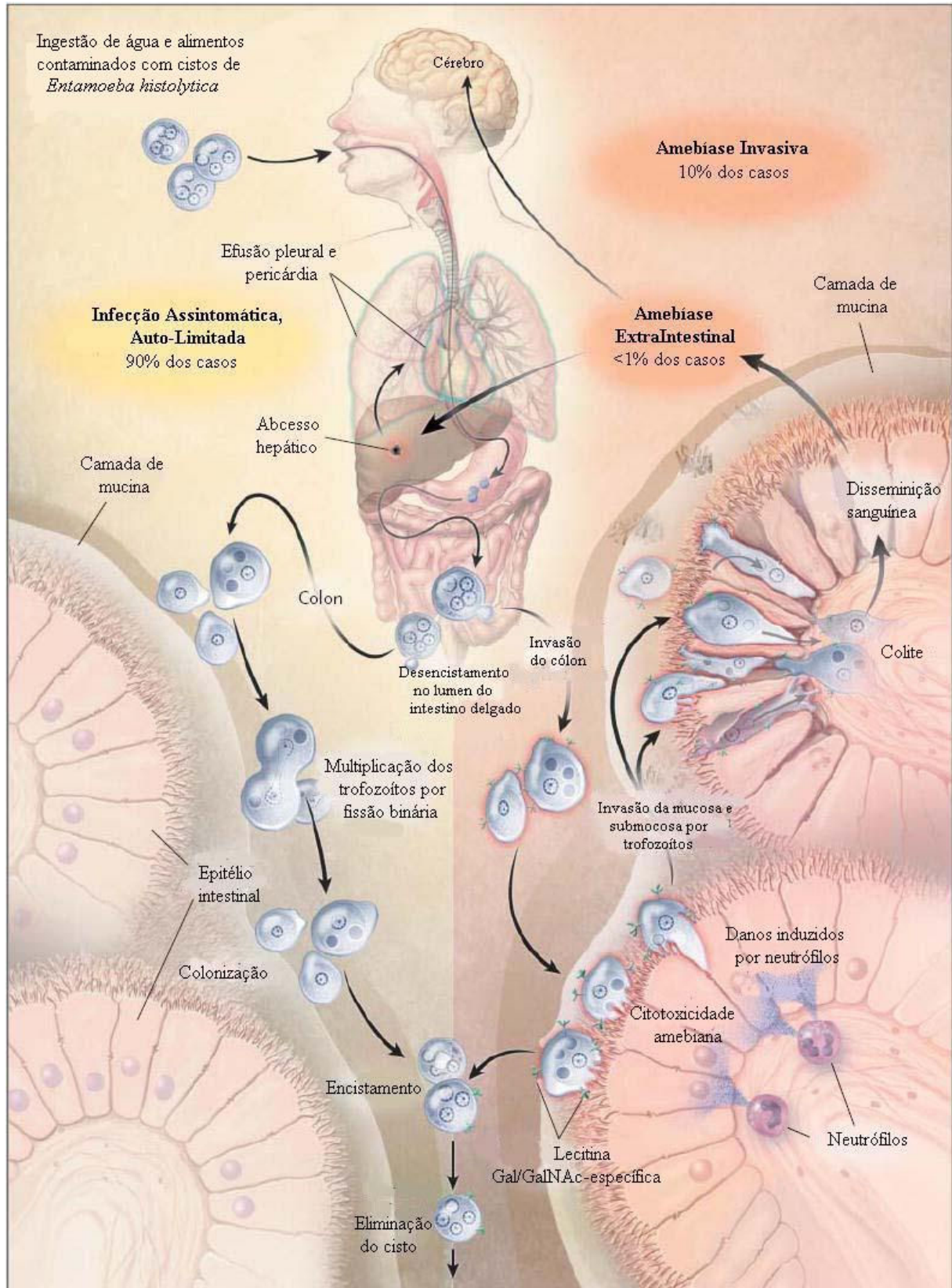


Figura 1 : Ciclo biológico da *E. histolytica*/*E. dispar* (adaptado de Haque et al., 2003)

---

#### 1.4. Patogenia e Virulência

Pérez-Tamayo (1986) utilizou a palavra patogenia para se referir aos mecanismos participantes na iniciação, evolução e resultado final do processo patológico. Na amebíase tais mecanismos não estão limitados ao hospedeiro ou ao parasito, porém são uma consequência da interrelação de ambos e sua expressão conjunta no processo patológico.

A patogenicidade é a capacidade do parasito de produzir ou não enfermidade em uma relação parasito-hospedeiro específica. A virulência é o grau com o qual se expressa a patogenicidade, que também depende tanto do hospedeiro como do parasito.

A variada expressão de virulência da *E. histolytica* é um dos mais interessantes aspectos da amebíase humana, onde observamos desde formas assintomáticas até formas invasivas letais, apresentando ainda grande diversidade de manifestações clínicas.

Explicar a menor incidência da doença invasiva em humanos infectados com *E. histolytica* tem ocupado a atenção de gerações de investigadores clínicos e não-clínicos. Walsh (1986) estimou que menos de 10% (36 milhões) das pessoas infectadas com *E. histolytica* (480 milhões de pessoas) desenvolvem sintomas clínicos, das quais 100 mil morrem anualmente.

A amebíase intestinal afeta e é mais letal nos extremos da vida, enquanto o abscesso hepático é mais frequente em homens entre 30 e 45 anos, tendo uma alta mortalidade.

Amebíase invasiva devido a *E. histolytica* é mais comum em países em desenvolvimento, onde condições variadas (sócio-econômicas e higiênico-sanitárias) favorecem a transmissão fecal-oral do parasito.

Apesar de se conhecer a grande capacidade destrutiva dos trofozoítos de *E. histolytica* e que esta característica se observa claramente nos tecidos afetados, principalmente no intestino grosso e no fígado, atualmente pouco se conhece a respeito dos mecanismos intrínsecos das amebas e dos fatores do hospedeiro que conduzem a produção de lesões. Embora estudos sobre a morfologia, biologia celular, imunologia, genética e biologia molecular tenham contribuído

---

para o entendimento de alguns aspectos da patogenia da amebíase, a maioria destes estudos tem sido realizada de forma isolada e pouco integrativa.

Cunha (1977) classifica dois grupos principais de pacientes com amebíase: assintomáticos e sintomáticos. No grupo de pacientes sintomáticos podemos observar as formas intestinais (colite disentérica, ameboma, apendicite por ameba e colite não disentérica) e as formas extra-intestinais (hepática, cutânea, pulmonar e cerebral).

A amebíase intestinal é a forma mais frequente da infecção sintomática por *E. histolytica*, mas os sintomas observados não são específicos desta doença. Compreende desde a colonização luminal até a invasão da mucosa. Os sintomas podem aparecer em uma ou duas semanas após a infecção.

A colite disentérica é a manifestação expressiva da amebíase aguda não complicada, tendo como sintomas dominantes a diarreia, dores abdominais e tenesmos. O indivíduo parasitado pela *E. histolytica* é acometido de diarreia com evacuações frequentes, chegando a dez ou mais vezes ao dia, com fezes líquidas e muco-sanguinolentas, já traduzindo uma lesão ulcerativa e inflamação do intestino.

O ameboma - resultante de uma resposta inflamatória intensa, com reação fibroelástica e formação de granuloma - geralmente é composto por uma lesão única resultante da junção de várias úlceras, formada por massas granulomatosas que podem ser confundidas com neoplasias.

A apendicite decorre de ulceração ceco-apendicular seguida de processo inflamatório do apêndice.

Embora alguns autores não aceitem a existência da colite não disentérica (CND), esta tem como características evacuações do tipo diarreico ou não alternadas por período de funcionamento normal do intestino ou mesmo constipação intestinal, podendo ser acompanhadas de dores abdominais em cólica, periumbilicais, flatulência e sensação de desconforto abdominal, sendo denominada por Cunha et al. (1977) como forma intermediária da amebíase.

Por sua vez, Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo (2000) classificam em quatro formas clínicas a amebíase intestinal invasiva:

---

disenteria ou diarréia sanguinolenta (90%), colite fulminante, apendicite amebiana e ameboma do cólon.

A lesão mais precoce dessa invasão é representada por pequenas elevações nodulares em cabeça de alfinete. Há uma depleção do muco intestinal e ruptura da barreira epitelial como resultado da degradação da matriz extracelular, o que ocorre em parte devido a ação das cisteíloproteínases liberadas pelo parasito. Subseqüentemente, trofozoítos invadem as células epiteliais e encontrando maior resistência da camada muscular, estendem sua ação lateralmente, formando as chamadas úlceras em "botão de camisa" (Que & Reed, 2000).

No início do processo invasivo três eventos consecutivos ocorrem: erosão focal superficial da mucosa, pequeno foco glandular de microinvasão e leve a moderado infiltrado da lâmina própria (Espinosa-Cantellano & Martínez-Palomo, 2000).

Estudos *in vitro* revelaram que a atividade lítica da *E. histolytica* resultando em doença invasiva requer aderência ao muco, citólise de células epiteliais intestinais e células imunes efectoras após contato e modulação das funções imunes do hospedeiro (Chadee et al., 1988; Martínez-Palomo et al., 1989; Campbell & Chadee, 1997).

Os trofozoítos colonizam o intestino humano após a aderência às glicoproteínas da mucina colônica através de uma lecitina específica, a Gal/GalNAc de 260kDa. A destruição das células do hospedeiro requer contato via parasito-lecitina (Ravdin et al., 1989; Petri & Singh, 1999).

A aderência às células do hospedeiro é um pré-requisito para a destruição tecidual, uma vez que é necessário um íntimo contato entre os trofozoítos e as células alvo. A aderência é também importante para a colonização intestinal, como citado anteriormente. De forma interessante, ambas as formas de aderência parecem ser mediadas pelo mesmo receptor de superfície, uma lecitina que pode ser inibida pela Gal/GalNAc.

Comparações entre *E. histolytica* e *E. dispar* revelaram que ambas possuem receptores para esta lecitina, a qual liga com a mesma eficiência as células alvo e a mucina colônica (Dodson et al., 1997).

---

Amebaporos são peptídeos formadores de poros que modificam os canais iônicos da membrana celular das células-alvo e induzem a modificações hidroeletrólíticas no citoplasma da célula (Lynch et al., 1982). Têm a capacidade de incorporar-se às bicamadas lipídicas e formar poros permeáveis a íons. Tanto *E. histolytica* como *E. dispar* possuem a atividade de formar poros, porém a atividade da *E. dispar* é 80% menor quando comparada à *E. histolytica*.

As cisteíil-proteinases (CP) são as principais enzimas proteolíticas encontradas em grande quantidade em lisados de *E. histolytica* e capazes de clivar colágeno, elastina, fibrinogênio e laminina, elementos da matriz extracelular, permitindo a penetração de trofozoítos para causar assim a forma invasiva da doença (Keene et al., 1990). Em adição, CP interferem com a função do sistema-imune do hospedeiro, clivando C3 e degradando IgA e IgG, possivelmente protegendo assim a ameba da opsonização (Haque et al., 2003).

Cepas de *E. histolytica* apresentando diferentes graus de virulência apresentam diferentes níveis de expressão entre as cisteíil-proteinases (Que & Reed, 1997; Tannich et al, 1989).

Evidências do papel das CP como fator de virulência incluem a produção e liberação de dez a 1000 vezes mais quantidades destas substâncias por células lisadas de *E. histolytica* do que por células lisadas de *E. dispar* (Reed et al., 1989). Desta forma, *E. dispar* apresenta uma menor atividade destas enzimas, aparentemente como resultado de um menor número de genes expressando estas substâncias.

A medida da resistência transepitelial (TER) de células MDCK tem sido utilizada para avaliar a virulência de cepas de *E. histolytica*. Essa técnica é altamente sensível para detectar o dano inicial produzido por trofozoítos amebianos às células em cultivo. Estudos realizados por Orozco et al. (1982), Martínez-Palomo et al. (1985) e Olivos-Garcia et al. (2004) demonstraram que trofozoítos de *E. histolytica* são capazes de reduzir drasticamente a resistência transepitelial após 60 minutos de interação com células MDCK. Por outro lado, Espinosa-Cantellano et al. (1998) demonstraram que

---

*E. dispar* também é capaz de promover a redução da TER, porém de forma mais lenta que aquela observada com a *E. histolytica*.

Embora *E. histolytica* possa infectar qualquer órgão do corpo, a forma mais frequente de amebíase extra-intestinal é o abscesso hepático amebiano, sendo dez vezes mais comum em adultos e três vezes mais frequente em homens que em mulheres.

A amebíase extra-intestinal é rara em nosso meio, porém já foram assinalados vários casos de abscessos hepáticos amebianos na região amazônica, sobretudo nos estados do Pará e Amazonas (Cunha et al., 1977; de Menezes, 1986). No entanto, este quadro é mais comum em países como México, África do Sul, Tailândia e Egito, onde se constitui em uma constante e severa complicação da amebíase (WHO, 1984).

Nas suas formas invasivas a amebíase é uma enfermidade potencialmente letal, sendo que a mortalidade entre aqueles com abscesso hepático pode chegar a 10% e atingir 70% nos casos de colite fulminante (Guerrant, 1986). Além de ser uma doença potencialmente letal, a amebíase invasiva tem importantes consequências sociais e econômicas, haja vista sua frequente ocorrência em indivíduos do sexo masculino na etapa mais produtiva de sua vida, entre os 20 e 50 anos de idade, podendo levar à incapacitação temporária e requerendo, muitas vezes, vários dias ou semanas de hospitalização.

O abscesso hepático amebiano é uma complicação da amebíase em três a nove por cento dos casos de colite amebiana (Barbour & Juniper, 1972), predominantemente localizado no lóbulo direito. Apesar do termo já consagrado, na amebíase não ocorre propriamente abscesso com a formação de inflamação purulenta circunscrita. Há sim uma necrose coliquativa do parênquima em consequência da ação enzimática das amebas, com cavidades contendo líquido amarelado, achocolatado ou esverdeado devido à presença de pigmento biliar. O material necrótico pode ser sólido, macio ou semi-líquido, frequentemente espesso e um pouco mucóide. O tamanho dos abscessos varia desde lesões puntiformes até massas enormes de material necrótico que podem substituir até cerca de 90% do órgão normal.

---

As principais manifestações clínicas do abscesso hepático amebiano são representados pela tríade dor, febre e hepatomegalia. A dor se localiza no quadrante superior direito do abdome, com hepatomegalia dolorosa em 90% dos pacientes. Inclui, entre outros sintomas, febre intermitente e irregular, variando de 38°C a 40°C com calafrio, anorexia e perda de peso.

Quando *E. histolytica* atinge o fígado humano, observa-se inicialmente lesões muito pequenas e múltiplas que tendem a unir-se e dar lugar aos abscessos hepáticos amebianos. Estes abscessos costumam ser únicos e geralmente localizados no lóbulo direito do fígado (85% dos casos), apresentando tamanhos variados (Silva, 1997). Não é comum a invasão bacteriana, mas quando ocorre, agrava o quadro.

Em infecções experimentais, a lesão hepática amebiana é caracterizada por um infiltrado inflamatório e lise de células inflamatórias em tempos iniciais, seguida pela formação de granulomas e produção de necrose tissular de tipo coagulativo com escassa fibrose (Tsutsumi et al., 1984; Tsutsumi & Martínez-Palomo, 1988).

São numerosas as variáveis envolvidas na patogenicidade e virulência da *E. histolytica*, as quais relacionam-se com o hospedeiro, com o parasito e com o meio. Aspectos como localização geográfica, raça, sexo, idade, resposta imune, estado nutricional, dieta, clima, flora bacteriana associada e passagens sucessivas do parasito em diversos hospedeiros, dentre outros aspectos, são responsáveis pela maior ou menor patogenicidade da doença.

Infecções assintomáticas por *E. histolytica* podem ocorrer em alguns pacientes, identificados através de sorologia positiva para o parasito (Gathiram & Jackson, 1987; Carvalho et al., 1991).

Sargeaunt et al. (1982) estudaram 147 pacientes comparando 80 com amebíase invasiva e 67 assintomáticos com cistos nas fezes. Todos os 80 pacientes estavam infectados com *E. histolytica*, enquanto aqueles assintomáticos estavam infectados com a forma não invasiva da amebíase. O uso da eletroforese de isoenzimas confirmou a existência de diferentes tipos de amebas.

---

Atualmente aceita-se que a maioria das formas assintomáticas da doença seja ocasionada pela *E. dispar* (Brumpt, 1925). Esta ameba é considerada um comensal do intestino grosso - embora algumas cepas possam irritar a mucosa intestinal sem invadi-la, ocasionando uma colite não-disentérica - sendo morfológicamente semelhante à *E. histolytica* (Diamond & Clark, 1993; Clark, 1998; Martínez-Palomo & Espinosa-Cantellano, 1998).

A *E. dispar* parece ser capaz de induzir lesões intestinais focais em animais experimentais e destruir células epiteliais em monocamadas *in vitro*, sendo então por definição, um patógeno (Chadee et al., 1985; Espinosa-Cantellano et al., 1997; Espinosa-Cantellano et al., 1998; Costa et al., 2006).

Estudos realizados por Costa et al. (2000) e Furst et al. (2000) demonstraram ser a *E. dispar* capaz de produzir lesões hepáticas em hamsters quando associada à flora original do seu hospedeiro. A possibilidade da *E. dispar* ser capaz de induzir mudanças patológicas no cólon humano, embora não necessariamente lesões invasivas, não pode ser excluída (Diamond & Clark, 1993).

O efeito citopático da *E. dispar* analisado pela perda gradual da resistência elétrica transmural de células MDCK é muito lento. Enquanto a fagocitose por *E. histolytica* de células epiteliais tem um importante papel na patogenicidade aos hospedeiros, trofozoítos de *E. dispar* raramente mostram evidências de fagocitose (Espinosa-Cantellano et al., 1998).

*E. histolytica* e *E. dispar* podem ser separadas por vários testes não disponíveis rotineiramente em laboratórios de análises clínicas: pesquisa de coproantígenos (Haque et al., 1993; Gonzalez-Ruiz et al., 1994), análise de isoenzimas (Sargeant & Williams, 1978; Mirelman et al., 1984; Blanc, 1992), anticorpos monoclonais (Torian et al., 1987; Strachan et al., 1988; Reed, 1992) e métodos como RFLP e PCR baseado em genes do rRNA (Tannich et al., 1991; Tannich & Burchard, 1991; Tachibana et al., 1991; Acuna-Soto et al., 1993).

Tecnicamente, entretanto, a diferenciação entre as duas espécies continua um desafio. O diagnóstico da *E. histolytica* é tradicionalmente



---

realizado através de exame microscópico de fezes frescas ou fixadas, apresentando várias limitações (Gonzalez-Ruiz et al., 1994), sendo a mais importante a incapacidade de distinguir *E. histolytica* de *E. dispar*, por serem morfologicamente semelhantes.

Embora métodos de microscopia de luz apontem para duas amebas morfologicamente semelhantes, estas apresentam propriedades biológicas que se correlacionam com a forma clínica dos indivíduos dos quais são provenientes (Sargeant et al., 1980). Assim sendo, *E. dispar* não deveria ser diagnosticada em indivíduos sintomáticos. Entretanto, Costa et al. (2006) identificaram geneticamente como *E. dispar* amebas isoladas de pacientes com colite não-disentérica. Estas amebas, quando em cultivo misto com bactérias, produziram lesões tão severas em animais de experimentação quanto *E. histolytica*.

Apesar de alguns autores afirmarem ser *E. dispar* incapaz de causar sintomas no homem, trabalhos realizados por Chadee et al. (1985) e Barral de Martinez et al. (1996) sugeriram que novos estudos devem ser realizados para esclarecer tal questão.

## **1.5. Estudos Experimentais de Virulência**

### *1.5.1. In vitro*

#### **1.5.1.1. Fagocitose**

A fagocitose foi definida como um processo mediante o qual algumas células são capazes de ingerir partículas que se encontram em seu meio (Stossel, 1974); no caso de organismos unicelulares heterotróficos como *E. histolytica* esse processo é utilizado para a obtenção de nutrientes. Por outro lado, em organismos multicelulares, a fagocitose é realizada unicamente por algumas de suas células e tem a função de defesa.

Uma das propriedades biológicas das amebas que mais se tem estudado *in vitro* é a fagocitose. Esta se caracteriza pela ingestão de

---

células mortas, fragmentos celulares, partículas inertes ou vivas. Em geral, o fenômeno da fagocitose implica três etapas: a primeira é a adesão da partícula ou célula a superfície da ameba, a segunda é a ingestão ou internalização ao interior do citoplasma, envolta com a membrana plasmática dando origem ao fagossoma, e a terceira etapa consiste na formação de uma nova estrutura denominada fagolisossoma. O conteúdo do mesmo é degradado pelas enzimas que a célula possui nos lisossomas.

A fagocitose de hemácias humanas por trofozoítos de *E. histolytica* foi descrita há mais de 100 anos por Lösch (1875), sendo considerada um critério válido para a separação de cepas “patogênicas” e “não-patogênicas”. É considerada uma propriedade biológica dos trofozoítos de *E. histolytica* que se relaciona não apenas com virulência (Trissl et al., 1978 e Orozco et al., 1982a) mas também com o mecanismo de patogenicidade do trofozoíto.

Nas infecções humanas, a presença de eritrócitos no citoplasma da ameba é uma forte indicação da invasão dos tecidos pelo protozoário (Ravdin & Guerrant, 1982).

Embora se tenha dado grande importância a atividade eritrofagocítica, os trofozoítos de *Entamoeba histolytica* também são capazes de fagocitar uma grande variedade de células e partículas como bactérias (Rosebaum & Wittner, 1970; Anaya-Velázquez et al., 1997), outros protozoários como *Trypanosoma cruzi* (Phillips, 1953), diversas linhas celulares em cultivo como células CHO (Ravdin & Guerrant, 1980), MDCK (Martínez-Palomo et al., 1985), grânulos de amido, liposomas (Trudel & Gicquaud, 1985) e esferas de látex (Bailey et al., 1990), entre outros.

Trissl et al. (1978) demonstraram que diferentes cepas de *Entamoeba histolytica* são capazes de fagocitar eritrócitos humanos *in vitro*; eles observaram que a atividade fagocítica foi maior em cepas de *E. histolytica* isoladas de casos de disenteria humana do que em cepas obtidas de portadores assintomáticos. Os resultados demonstraram que a atividade fagocítica em cepas virulentas é um processo mais rápido e eficiente que em cepas não-virulentas.

---

#### 1.5.1.2. Efeito Citopático

O efeito citopático é definido como a capacidade dos trofozoítos destruírem células em cultivo constituindo, juntamente com a adesão e a fagocitose, um fator importante nos mecanismos patogênicos da *E. histolytica* (Orozco et al., 1982b e Petri & Ravdin, 1987). Há inicialmente uma diminuição da resistência elétrica transepitelial, seguida da ruptura das uniões entre as células com consequente desprendimento do substrato, o que resulta na lise e fagocitose das células pelos trofozoítos (Martinez-Palomo et al., 1985).

#### 1.5.1.3. Proteases

As proteases são um grupo de enzimas líticas envolvidas em uma grande quantidade de vias metabólicas e que apresentam diversas funções em todos os organismos. Estas enzimas catalizam a ruptura de ligações peptídicas, participando na manufatura e edição de novas proteínas até a degradação de proteínas que cumpriram sua vida média. Também participam nos mecanismos de defesa das células do sistema imune, inclusive no processamento de antígenos por células apresentadoras de antígeno. Estas proteínas são classificadas conforme sua composição, estrutura bioquímica e mecanismo de ação.

A principal classificação das proteases se refere ao tipo de aminoácido presente no sítio ativo da enzima. Desta forma, o sistema de classificação está composto por quatro grupos principais: serino-proteases, cisteí-l-proteases, metalo-proteases e aspartato-proteases.

Nos organismos patógenos foi demonstrado em diversas ocasiões que a ação de proteases tem um efeito direto sobre a patogênese da doença (Rosenthal et al., 1987; Bouvier et al., 1989; McKerrow et al., 1991; McKerrow et al., 1993; Serrano-Luna et al., 2006).

---

### 1.5.2. *In vivo*

A utilização de modelos animais em algumas parasitoses é realizado com o objetivo fundamental de se conhecer os mecanismos de patogenia. Na amebíase experimental com modelos animais se utiliza principalmente roedores devido a uma série de vantagens como custo, alta reprodutibilidade das lesões e acessibilidade e uniformidade deste animais de laboratório.

Apesar de não existir um modelo experimental *in vivo* que reproduza fielmente o ciclo completo observado na enfermidade amebiana no ser humano, os modelos animais nos têm permitido conhecer diversos aspectos da fisiopatologia da amebíase e da resposta imune do hospedeiro, além de serem utilizados com outros propósitos, como a determinação do efeito farmacológico de alguns medicamentos ou provas de substâncias potencialmente úteis como amebicidas ou na produção de vacinas.

Desde 1930 quando Cleveland & Sanders iniciaram o estudo experimental da amebíase hepática em gatos, diferentes investigadores utilizaram uma grande variedade de espécies animais para experimentação, como cães, ratos, coelhos, répteis, hamsters e gerbilíneos.

Hamsters e gerbilíneos são os animais de laboratório mais susceptíveis à produção experimental do abscesso hepático amebiano. Camundongos são poucos utilizados, pois a maioria das linhagens existentes são resistentes a produção de lesões no fígado (Tsutsumi & Shibayama, 2006).

Os modelos intestinais, diferentemente dos hepáticos, não estão claramente estabelecidos, uma vez que a produção das lesões ulcerativas não é constante nem uniforme e requerem condições e manipulação especiais dos animais de experimentação. Em geral, as lesões intestinais produzidas em hamsters, ratos ou gerbilíneos são temporais, autolimitadas e tendem a curar-se espontaneamente (Meerovitch & Chadee, 1988).

**2. JUSTIFICATIVA**

---

Morfologicamente semelhante a *Entamoeba histolytica* porém incapaz de invadir a mucosa intestinal, *E. dispar*, anteriormente descrita como forma “não patogênica” da *E. histolytica*, somente foi aceita como espécie distinta quando estudos demonstraram diferenças nos padrões isoenzimáticos entre as cepas consideradas patogênicas - isoladas de pacientes com doença invasiva - e as cepas não patogênicas - isoladas de pacientes assintomáticos (Sargeant et al., 1978). Essa teoria foi reforçada por trabalhos que evidenciaram diferenças antigênicas e genéticas entre as duas espécies (Strachan et al., 1988; Tannich et al., 1989).

Nos últimos vinte anos grande parte dos estudos bioquímicos, moleculares e epidemiológicos tentam elucidar, sem muito sucesso, se *E. histolytica* compreende duas espécies ou apenas uma capaz de modular a expressão de sua virulência. Trabalhos recentes demonstraram que cepas de *E. dispar* isoladas de pacientes no Brasil (Furst et al., 2000; Costa et al., 2006), quando cultivadas em associação com bactérias da microbiota intestinal do hospedeiro, são capazes de ocasionar lesões hepáticas em animais de laboratório (principalmente hamsters) e apresentam efeito citotóxico em monocamadas de células VERO.

Desta forma, nosso trabalho visa o estudo mais detalhado da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*, isolada por Costa em 1997 e mantida no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Também optamos por estudar a cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* que, apesar de isolada por Silva em 1988 e notavelmente virulenta, pouco se conhece sobre seus mecanismos de patogenicidade.

**3. OBJETIVOS**

---

### 3.1. Objetivo Geral

Determinar a patogenicidade e a virulência de cepas de *Entamoeba dispar* e *Entamoeba histolytica* em condições de cultivo monoxênico e polixênico, comparando-as com a cepa patogênica de *E. histolytica* HM1-IMSS.

### 3.2. Objetivos Específicos

1. Comparar o grau de virulência de cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* através de testes *in vivo*, analisado através da lesão produzida em fígado de hamsters.

2. Estudar as alterações histopatológicas das lesões formadas no fígado de hamsters infectados experimentalmente.

3. Estudar a cinética de formação das lesões através de microscopia de luz.

4. Comparar o grau de virulência de cepas de *E. dispar* e *E. histolytica* através de testes *in vitro*:

4.1. Análise da eritrofagocitose através de parâmetros qualitativos e quantitativos;

4.2. Análise da atividade proteolítica em gel de poliacrilamida e com substratos azure e azocoll;

4.3. Determinação do efeito citopático sobre células MDCK e medida da resistência transepitelial.

5. Realizar o estudo ultraestrutural de trofozoítos de *E. dispar* (cepa ICB-ADO) e *E. histolytica* (cepa ICB-EGG) em cultivos monoxênico e polixênico através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.



---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 4.1. Cepas Utilizadas

Foram utilizadas quatro cepas de parasitos: três cepas de *E. histolytica* e uma cepa de *E. dispar*.

##### ICB-ADO (*E. dispar*)

Cepa isolada em 1997 a partir de cistos obtidos das fezes de um paciente de 21 anos do sexo masculino procedente da Reserva Indígena de Xacriabá, município de Itacarambi - MG. O paciente apresentava diarreia e dor abdominal alternados com períodos de normalidade. Essa cepa se apresenta com perfil isoenzimático tipo I, não-patogênico e vem sendo mantida em cultivos polixênico (com *Escherichia coli* e *Shigella sp.*) e monoxênico (com *C. fasciculata*).

##### ICB-EGG (*E. histolytica* patogênica)

Cepa isolada em 1988 das fezes muco-sanguinolentas de paciente sintomático do sexo masculino procedente de Manaus, contendo cistos e trofozoítos de *E. histolytica*. O paciente apresentava colite disentérica e abscesso hepático. A cepa vem sendo mantida nas condições de cultivo polixênico (com bactérias da microbiota intestinal do hospedeiro) e monoxênico (com *C. fasciculata*) e criopreservada em nitrogênio líquido, apresentando zimodema XIX - patogênico.

##### HM1-IMSS (*E. histolytica* patogênica)

Cepa isolada por De la Torre et al. (1971) na Cidade do México a partir de um paciente com disenteria amebiana. Essa cepa é amplamente utilizada para estudos como patologia, imunologia, biologia celular e molecular, entre outros. Mantida em cultivo axênico, apresenta zimodema XIX – patogênico.

##### ICB-452 (*E. histolytica* não-patogênica)

Cepa isolada em 1983 a partir de cistos obtidos das fezes de estudante do curso primário, assintomático, residente em Belo Horizonte. Esta cepa foi monoxenizada e posteriormente axenizada

---

diretamente de cistos sem o cultivo com bactérias. Apesar de apresentar zimodema II (patogênico), a cepa não infectou nem produziu lesões em animais de experimentação (hamsters e ratos). Foi utilizada nos estudos de eritrofagocitose, em cultivo monoxênico (com *C. fasciculata*) e axênico.

As cepas são mantidas em cultivo e em nitrogênio líquido no Laboratório de Amebíase e Protozoários Intestinais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. As cepas ICB-EGG e ICB-452 foram isoladas por Silva (1997), ICB-ADO foi isolada por Costa et al. (2006).

## **4.2. Estudos de Virulência**

### 4.2.1. Estudos *in vivo*

Para os estudos *in vivo* foram utilizados hamsters (*Mesocricetus auratus*) fornecidos pelo biotério de criação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e pelo biotério de criação do Centro de Investigação e Estudos Avançados (CINVESTAV) do Instituto Politécnico Nacional - México.

O presente projeto foi enviado ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG) e obteve aprovação em 15 de dezembro de 2004, sob o número 119/04.

#### 4.2.1.1. Preparo dos inóculos

Os trofozoítos mantidos em cultivo axênico ou monoxênico em meio TYI-S-33 com *C. fasciculata* foram obtidos a partir de diversos tubos de cultura em crescimento exponencial com 48/72 horas. As culturas foram colocadas em banho de gelo por dez minutos para o despreendimento das amebas dos tubos e centrifugadas a 200g por cinco minutos. Desprezou-se os sobrenadantes e após a homogeneização, os

---

trofozoítos do sedimento foram contados em câmara de Neubauer, observando sua viabilidade através do azul de tripan ou eosina a 0,125% e ajustados à concentração desejada, de modo a permitir que os inóculos estipulados possam ser feitos em volume não maior que 0,2mL.

Para as inoculações com culturas polixênicas, estas foram cultivadas em garrafas de cultivo de células Corning<sup>TM</sup> de 30mL até o esgotamento dos grãos de amido no meio de cultivo (meio Pavlova) e no interior dos trofozoítos. O meio sobrenadante foi retirado e substituído por PBS pH 7,2 a 37<sup>0</sup>C, agitando-se levemente a garrafa para lavar os trofozoítos aderidos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as garrafas transferidas para banho de gelo por 10 minutos. Ao término desse período, os trofozoítos foram transferidos para tubos de centrifugação e centrifugados a 200g por 10 minutos. Os trofozoítos sedimentados foram diluídos em PBS pH 7,2 de modo a ajustar as concentrações desejadas.

#### 4.2.1.2. Inoculação intra-hepática em hamster

Utilizou-se 21 hamsters com aproximadamente um mês de idade (90-100g). Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hipnol<sup>®</sup> - 40mg/kg de peso), laparatomizados e inoculados diretamente na face diafragmática do lóbulo esquerdo do fígado com 5,0x10<sup>5</sup> trofozoítos em 0,2mL de volume, utilizando uma seringa de insulina para inoculação. Foram empregadas neste experimento as cepas ICB-ADO polixênica e ICB-EGG monoxênica.

Três animais foram sacrificados em intervalos de 1, 3, 6, 12, 24 e 48 horas e ao 7<sup>o</sup> dia de experimento. Grupos controle de três animais inoculados com meio de cultura somente ou com bactérias foram sacrificados após 6 e 24 horas e também ao 7<sup>o</sup> dia. Procedimento semelhante foi realizado com trofozoítos fixados em gluturaldeído.

Fragmentos do fígado foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% em PBS pH 7,2 e processados rotineiramente para

---

exames histopatológicos, obtendo-se cortes de 5µm que foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

Três lâminas de cada tempo foram utilizadas para a quantificação das áreas necróticas e de infiltrados inflamatórios. As imagens foram digitalizadas em microcâmara JVC TK-1270/JGB e submetidas para a análise morfométrica com o software Kontron KS300 v.2.0 - Kontron Electronics, Carl Zeiss (Caliari, 1997), pertencentes ao Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia Geral do ICB/UFMG. Foram identificadas, delimitadas e quantificadas todas as áreas com necrose e infiltrado inflamatório de cada lâmina. Os resultados foram apresentados com média  $\pm$  erro padrão, utilizando-se o teste t para comparar os dois grupos (cepa ADO polixênica e EGG monoxênica).

#### 4.2.2. Estudos *in vitro*

##### 4.2.2.1. Eritrofagocitose

Para estes experimentos foram utilizadas as cepas ICB-452 axênica e monoxênica, ICB-EGG monoxênica e polixênica e HM1-IMSS axênica de *E. histolytica* e a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. Ajustou-se o número de trofozoítos visando obter uma concentração de  $1 \times 10^6$  trofozoítos/mL em salina tamponada pH 7,2 (PBS). Em seguida 0,4mL da suspensão de trofozoítos foi incubado com o mesmo volume de eritrócitos humanos (tipo sanguíneo B<sup>+</sup>) heparinizados na concentração de  $1 \times 10^8$  eritrócitos/mL, obtendo-se uma relação de 100 eritrócitos por ameba (Trissl et al., 1978).

As diferentes amostras foram incubadas em triplicata, em estufa a 37<sup>o</sup>C por 10, 20 e 30 minutos, sendo o experimento repetido três vezes. A interação trofozoítos/eritrócitos foi interrompida pela adição de água destilada aos tubos - para lisar os eritrócitos livres e aqueles aderidos à superfície das amebas. Os tubos foram então centrifugados a 200g por três minutos e os trofozoítos, juntamente com os eritrócitos fagocitados, fixados com glutaraldeído 2,5% em PBS por trinta

---

minutos, à temperatura ambiente. Retirou-se o excesso de glutaraldeído lavando-se os trofozoítos três vezes com PBS. Os eritrócitos ingeridos foram contrastados com diaminobenzidina 25mg% em PBS adicionados de 500µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 volumes, seguido de incubação por cinco minutos à temperatura ambiente (Silva, 1997).

Os trofozoítos foram lavados novamente com PBS e centrifugados a 200g por cinco minutos. Foram contados os eritrócitos ingeridos por 100 amebas escolhidas ao acaso. Realizou-se o cálculo da eritrofagocitose com relação ao número de eritrócitos por ameba (média ± desvio padrão) e à porcentagem dos trofozoítos que fagocitaram eritrócitos (comparados pelo teste de Kruskal-Wallis).

#### 4.2.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida

Para examinar a atividade proteolítica das cepas estudadas, foram realizados ensaios de eletroforese em SDS-PAGE a 12% (Laemmli, 1970), copolimerizados com gelatina de pele suína (Sigma) a concentração final de 0,1% (Heussen & Dowdle, 1980). Foram utilizadas 20µg de proteínas do extrato celular de cada cepa, obtidas através de ciclos de congelamento-descongelamento empregando nitrogênio líquido e quantificadas pelo método de Bradford (1976). A eletroforese foi realizada a 100V em um banho de gelo para evitar a proteólise. Posteriormente os géis foram lavados em Triton X-100 a 2,5% durante 30 minutos para eliminar o SDS, uma vez que esse detergente interfere com a atividade proteolítica da maioria das proteases. Os géis foram incubados em um tampão de ativação (100mM Tris-OH e 10mM de CaCl<sub>2</sub>) por toda a noite, sendo então corados por solução de Coomassie Azul Brilhante R-250 a 0,5% por 30 minutos e descorados em uma solução de metanol:ácido acético:água (45:10:45) até o aparecimento das bandas proteolíticas como bandas claras onde não se observa cor, devido a degradação da gelatina durante a incubação.

---

Para observar o efeito de inibidores, estes foram adicionados aos extratos e incubados à temperatura ambiente por 1 hora antes de iniciar a eletroforese. Foram utilizados os seguintes inibidores: 10 $\mu$ M de E-64, 5mM de fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF), 10 $\mu$ M de pepstatina e 2mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), os quais são inibidores para cisteíprotease, serinaprotease, aspárticoprotease e metaloprotease, respectivamente.

#### 4.2.2.3. Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll

Foram utilizados extratos totais e meio condicionado para determinar quantitativamente a atividade proteolítica mediante ensaios com Azure Hide Powder e Azocoll (Sigma-Aldrich), os quais são substratos cromógenos para proteases. Estes substratos são insolúveis; ao ocorrer a proteólise, os resíduos de aminoácidos se dissolvem e geram um sobrenadante colorido, o qual pode ser lido em um espectrofotômetro. A absorbância resultante é diretamente proporcional à atividade proteolítica das amostras.

Os extratos totais das diferentes cepas foram obtidos pela lise de trofozoítos por ciclos de congelamento e descongelamento, empregando nitrogênio líquido. A quantidade de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Para o estudo com meio condicionado, 3x10<sup>6</sup> trofozoítos foram transferidos para um tubo contendo 3mL de meio livre de soro e incubados por 24 horas.

Dois miligramas de Azure Hide Powder ou Azocoll foram adicionados a tubos de Eppendorf (1,5mL) com 100 $\mu$ g de extrato total ou 100 $\mu$ L de meio condicionado e o volume final ajustado para 500 $\mu$ L com tampão de ativação (100mM Tris-OH e 10mM de CaCl<sub>2</sub>). As amostras foram incubadas a 36°C durante 16 horas. A reação foi interrompida com 500 $\mu$ L de ácido tricloacético 10% (TCA) e os tubos mantidos em repouso por 5 minutos. Depois foram centrifugados a 4500g por cinco minutos. O sobrenadante foi coletado e lida a absorbância em um espectrofotômetro a 600nm para os ensaios com

---

Azure e a 540nm para Azocoll. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada amostra.

Para observar o efeito de inibidores, estes foram adicionados aos extratos e incubados à temperatura ambiente por 1 hora antes de adicionar o substrato. Para calcular a porcentagem da inibição de atividade proteolítica, foi tomado como 100% de atividade o valor obtido dos extratos totais incubados sem inibidores. Foram utilizados os seguintes inibidores: 10mM de ácido p-hidroximercuriobenzóico (PHMB), 5mM de fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF) e 2mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), os quais são inibidores para cisteíprotease, serinaprotease e metaloprotease, respectivamente. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos três vezes. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Bonferroni para as diferenças observadas nas atividades proteolíticas.

#### 4.2.2.4. Efeito Citopático sobre Células MDCK

Para observar o efeito citopático de trofozoítos das diferentes cepas utilizadas, realizaram-se interações com a linha celular MDCK. As células MDCK foram cultivadas em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C em Meio Essencial Mínimo (MEM – Gibco Invitrogen Co. USA) suplementado com soro fetal bovino a 20% (SFB – Gibco) até a formação de 80% da monocamada, em câmaras para cultivo celular de 8 poços (Nunc Inc., USA). Uma vez estabelecida a monocamada, sobre ela foram adicionados 3x10<sup>5</sup> trofozoítos e incubados por períodos de 15, 30 e 60 minutos a 37°C. Durante o tempo de incubação, foi utilizado MEM sem SFB para impedir a regeneração celular. Após a incubação, foram realizados três lavados com MEM sem SFB. As células foram fixadas com metanol a 70% recém preparado e, posteriormente, coradas com Giemsa a 5% durante 40 minutos e montadas em resina. Como controles, as bactérias associadas às culturas e *C. fasciculata* (1x10<sup>6</sup> formas/mL) foram preparadas para a interação.

Imagens microscópicas foram digitalizadas através de uma microcâmera JVC TK-1270/JGB e submetidas para a análise



---

morfométrica com o software Kontron KS300 v.2.0 - Kontron Eletronics, Carl Zeiss (Caliari, 1997), pertencentes ao laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia do ICB/UFMG. As diferenças de efeito citopático entre as cepas foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis.

#### 4.2.2.5. Medida da Resistência Transepitelial (R<sub>Te</sub>)

Células MDCK foram cultivadas em meio MEM suplementado com 20% de SFB em estufa a 37<sup>0</sup>C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Foram utilizadas câmaras Transwell<sup>®</sup> (Transwell<sup>®</sup> Cell Culture Permeable Supports – Corning Inc. Costar, USA) com membranas cobertas com colágeno com poros de 3µm. As câmaras foram colocadas dentro de uma placa multipoço (Costar 3524) formando, assim, dois compartimentos independentes (figura 2).

Após atingir a confluência (aproximadamente 100.000 células por poço), as células foram lavadas duas vezes com MEM sem SFB e recolocadas na placa, a qual foi adicionada meio MEM sem SFB para evitar a regeneração celular. Realizou-se então a medida da resistência transepitelial basal utilizando um voltímetro epitelial - EVOM, World Precision Instruments Inc., USA (Martínez-Palomo et al., 1985; Leroy et al., 2000).

Após este procedimento, adicionou-se aos Transwell<sup>®</sup> os trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar* na proporção 1:2 trofozoíto/células. A resistência transepitelial foi medida aos 5, 15, 30 e 60 minutos. Todas as dosagens foram realizadas em triplicatas e a diferença entre elas avaliada pelo teste de ANOVA.

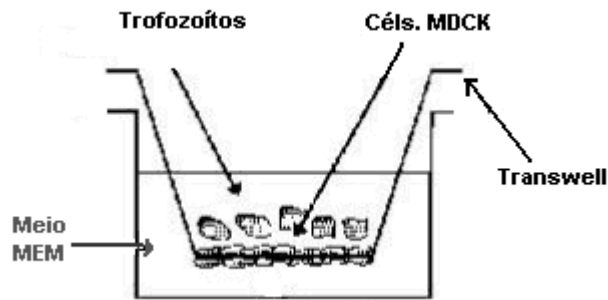


Figura 2: Montagem da câmara Transwell®  
em poço de placa Costar 3524

#### 4.2.2.6. Preparo de anticorpos policlonais anti-*E. dispar* cepa ICB-ADO em coelhos

Coelho branco Nova Zelândia com peso de 2 a 3 kg foi imunizado por via subcutânea com 0,5mL de extrato amebiano (3mg de proteína), emulsionado com igual volume de adjuvante completo de Freund e imunizado novamente duas semanas depois com adjuvante incompleto de Freund. Após duas semanas, o animal foi sacrificado por punção cardíaca e o soro obtido foi alíquotado e congelado para uso.

#### 4.2.2.7. Imunohistoquímica

Hamsters com aproximadamente um mês de idade (90-100g) foram utilizados para a inoculação de  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos de *E. dispar* cepa ICB-ADO polixênica e sacrificados em intervalos de 3, 12 e 24 horas após inóculo. Fragmentos do fígado foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e, posteriormente, embebidos em parafina e obtidos corte de 5µm. Após desparafinar os cortes (58°C por uma noite), as amostras foram desidratadas em xilol e, posteriormente, em álcool absoluto por cinco minutos (em vaso koplín). As peroxidases endógenas foram bloqueadas com metanol-peróxido (45:5) por 1 hora. As amostras foram hidratadas em concentrações descendentes de álcoois (90%, 80%, 70%, 60%, 50% e PBS durante 5 minutos). As uniões inespecíficas

---

foram bloqueadas com soro fetal bovino (SFB) a 10% em PBS-Tween 0,05% durante 1 hora, a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas duas vezes com PBS-Tween e secas o melhor possível, sem tocar o tecido. Incubou-se então as amostras com anticorpo policlonal primário anti-ameba (preparado em coelho) diluído em SFB a 5% em PBS-Tween 0,05% (diluição 1:25) durante 2 horas, a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS-Tween, agregou-se o anticorpo secundário anti-IgG de coelho peroxidado (Sigma Immuno Chemicals) em SFB 5% em PBS-Tween 0,05% (diluição 1:300) e incubou-se durante 90 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas em PBS-Tween e foi adicionado o substrato para a peroxidase (DAB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), na diluição de 1:10, preparada no momento de uso, durante 15 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e contra-coradas com hematoxilina durante 10 minutos. Finalizado esse tempo, as amostras foram lavadas em água corrente e desidratadas em uma série de álcoois ascendentes. Finalmente, montadas em resina e secas a temperatura ambiente.

### **4.3. Estudos de Ultraestrutura**

#### **4.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Trofozoítos de culturas monoxênica e polixênica (cepas ICB-ADO e ICB-EGG) cultivados em garrafas Corning<sup>TM</sup> de 30mL por 48 horas foram fixados em glutaraldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1 hora a temperatura ambiente. Foram então lavados três vezes em cacodilato de sódio 0,1M. Seguiu-se a pós-fixação em OsO<sub>4</sub> 1% em cacodilato de sódio 0,1M por 1 hora a 4°C e novamente lavados três vezes em cacodilato 0,1M. As células foram desidratadas em uma série ascendente de álcoois (70%, 80%, 90% e 100% durante 15 minutos em cada álcool) e por último em óxido de propileno por 40 minutos, sempre em agitação. Posteriormente, as amostras foram incluídas em resina e os cortes semifinos obtidos corados com azul de

---

toluidina/borato de sódio para a seleção de áreas adequadas à ultramicrotomia. Os cortes ultrafinos foram corados com acetato de uranila (Watson, 1958) e citrato de chumbo (Reynolds, 1963) e analisados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM-10.

#### 4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Trofozoítos de culturas monoxênica e polixênica (cepas ICB-ADO e ICB-EGG) cultivados em garrafas Corning<sup>TM</sup> de 30mL por 48 horas foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente foram lavados duas vezes no mesmo tampão e pós fixados por uma hora em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 a temperatura ambiente. Realizou-se novamente a lavagem do material em tampão cacodilato e desidratou-se as amostras em série crescente de álcoois (50%, 60%, 70%, 80% e 90% durante 10 minutos em cada álcool e três vezes em álcool absoluto durante 10 minutos). Em seguida, realizou-se a secagem em aparelho de ponto crítico Samdri-780A (Tousimis Research Corp.). Após fixação das amostras em suportes de alumínio, o material foi recoberto com ouro em aparelho Denton Vacuum DeskII (Denton Vacuum Inc.) por período de 60 segundos e observado ao microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM35-C.

O processamento e o estudo histopatológico foram realizados com a colaboração do Prof. Orivaldo Alves Rocha, do Departamento de Patologia do ICB/UFMG, Dr. Victor Tsutsumi e Dra. Mineko Shibayama, do Departamento de Patologia Experimental, Cinvestav-México.

A determinação da atividade proteolítica em géis de poliacrilamida foi realizada com a colaboração do Dr. Victor Tsutsumi e Dra. Mineko Shibayama e da Prof<sup>a</sup>. Alane Beatriz Vermelho, do Departamento de Microbiologia Geral, UFRJ.

A determinação quantitativa da atividade proteolítica com azure e azocoll, os estudos de imunohistoquímica e os estudos de ultraestrutura

---

tiveram a colaboração do Dr. Victor Tsutsumi e Dra. Mineko Shibayama.

O estudo do efeito citopático sobre células MDCK e a medida da resistência transepitelial foram realizados com a colaboração do Dr. Victor Tsutsumi e Dra. Mineko Shibayama e do Dr. Fernando Navarro, do Departamento de Biologia Celular, Cinvestav-México.

**5. RESULTADOS**

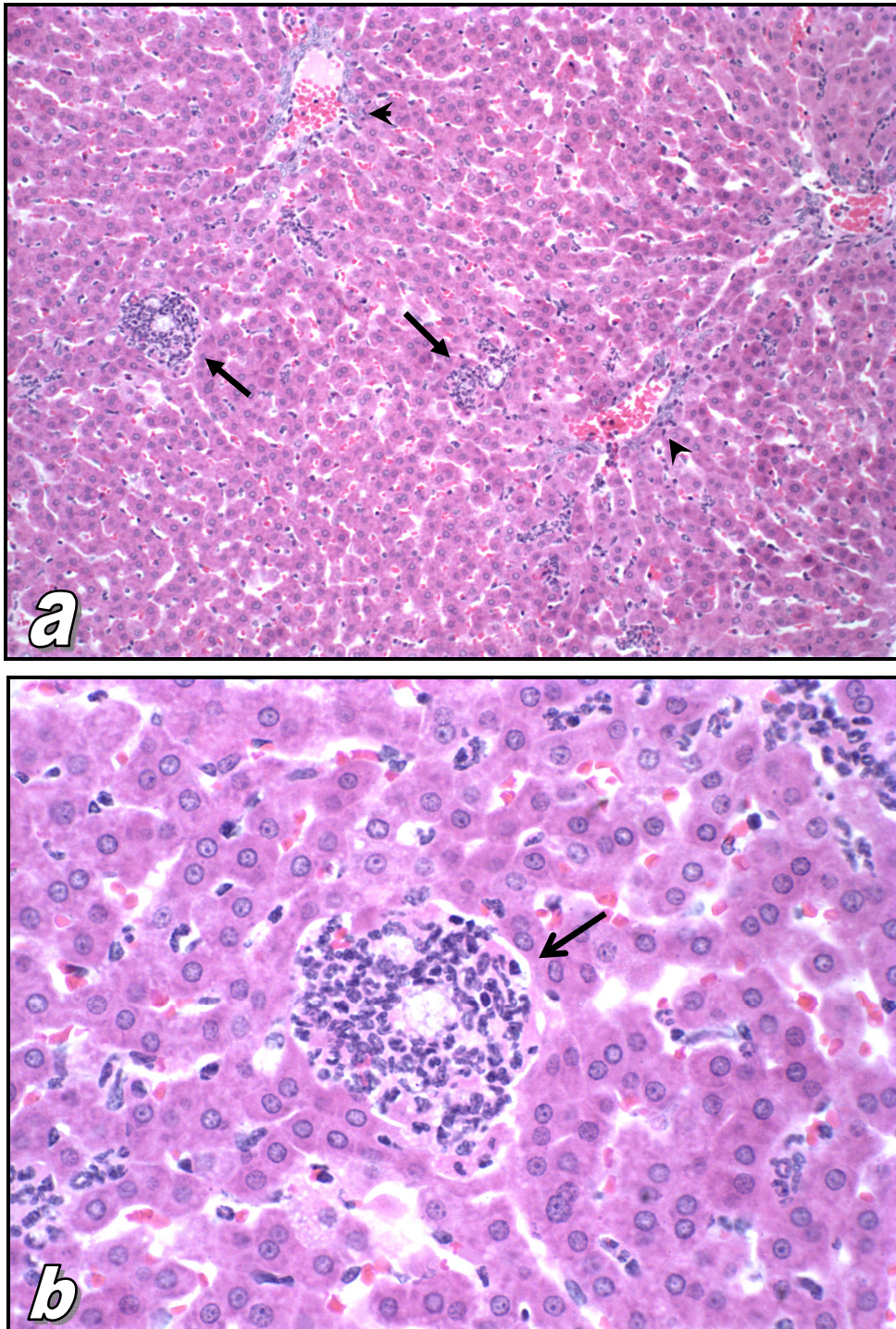
---

## 5.1. Estudos de Virulência

### 5.1.1 Estudos *in vivo* - Cinética da Formação das Lesões Hepáticas em Hamsters

#### 5.1.1.1. Cepa ICB-ADO polixênica (*E. dispar*)

**Uma hora :** Macroscopicamente não observou-se lesão, apenas na borda do lóbulo esquerdo uma moderada congestão na trama sinusoidal. Microscopicamente, observou-se reação inflamatória aguda, com vários focos inflamatórios e ligeira congestão vascular em ramos da veia-porta, com hemorragia leve. Foram visualizadas poucas amebas em sinusóides, envoltas por camada de leucócitos PMN (figura 3).

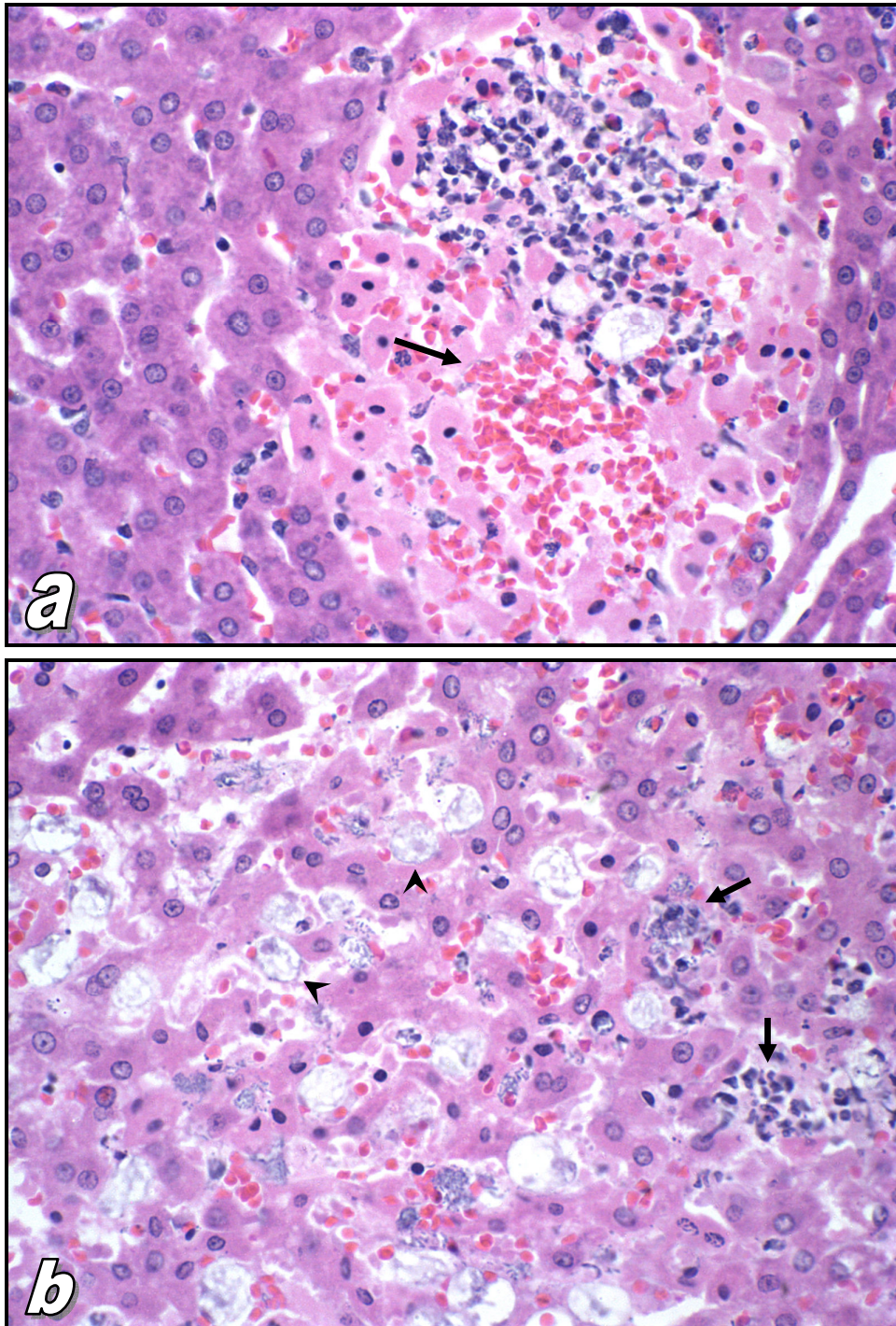


**Figura 3.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster uma hora pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. a) Observam-se pequenos focos inflamatórios no tecido hepático (setas), além de ligeira congestão em ramos da veia-porta (cabeças de seta). b) Em alguns focos inflamatórios, visualizam-se trofozoítos em sinusóides recobertos por camadas de PMN (seta). Objetivas: (a) 20x, (b) 60x. Coloração HE.



---

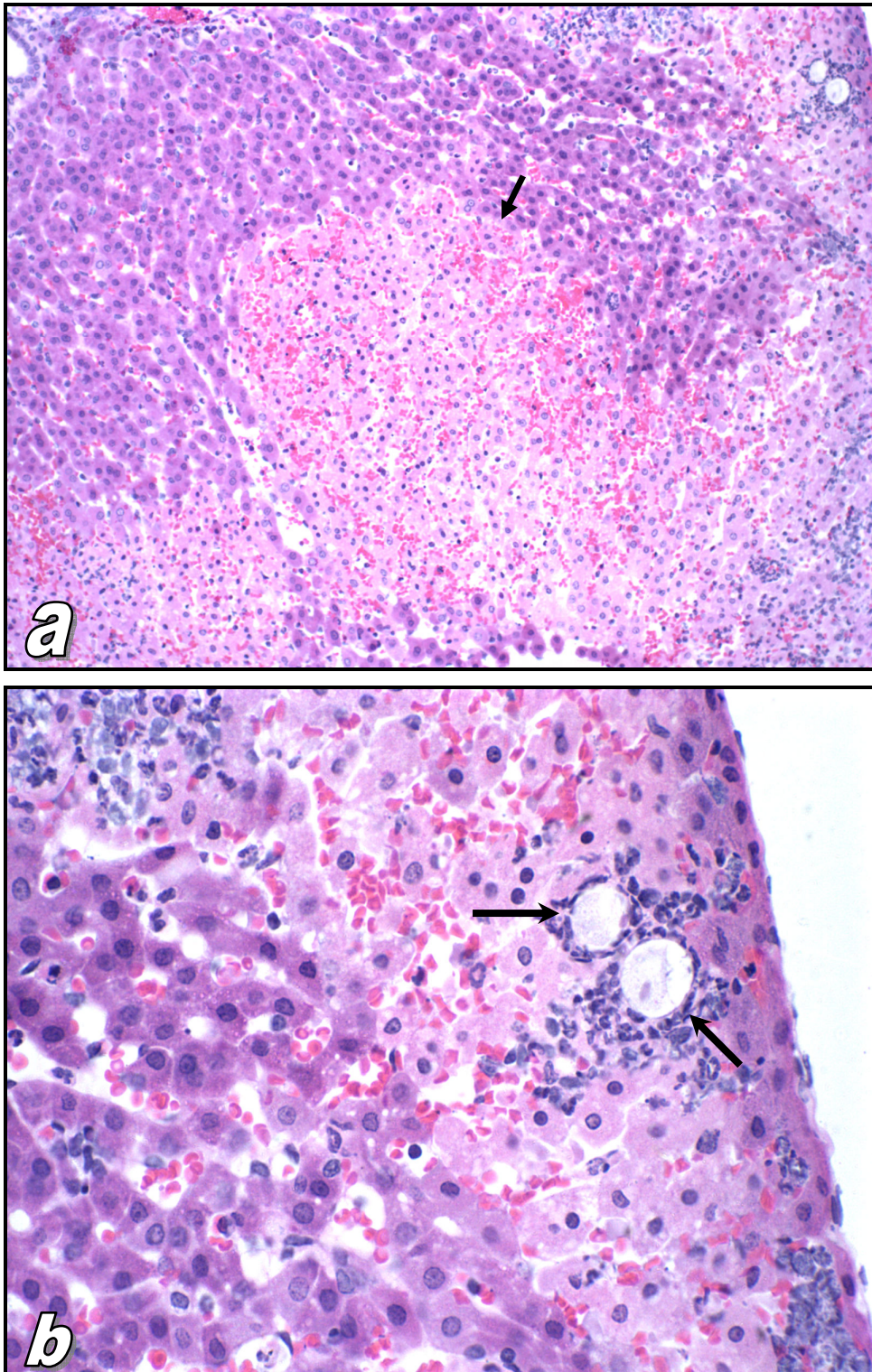
**Três horas :** Observou-se, macroscopicamente, pequenos pontos esbranquiçados no lóbulo inoculado. Microscopicamente, observou-se extensa necrose com reação inflamatória acentuada e presença de trofozoítos. Visualizaram-se numerosos focos inflamatórios com amebas no parênquima hepático, com alguns trofozoítos aparentemente destruídos. Em outras áreas, trofozoítos foram encontrados em contato direto com o parênquima hepático, com processos degenerativos nos hepatócitos (figura 4).



**Figura 4.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster três horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. a) Observa-se reação inflamatória com área de necrose marcante e presença de hemorragia (seta). b) Em algumas zonas, visualizam-se trofozoítos em contato direto com o parênquima hepático (cabeças de seta) além de focos de infiltração de PMN (setas). Objetivas: (a) e (b) 60x. Coloração HE.

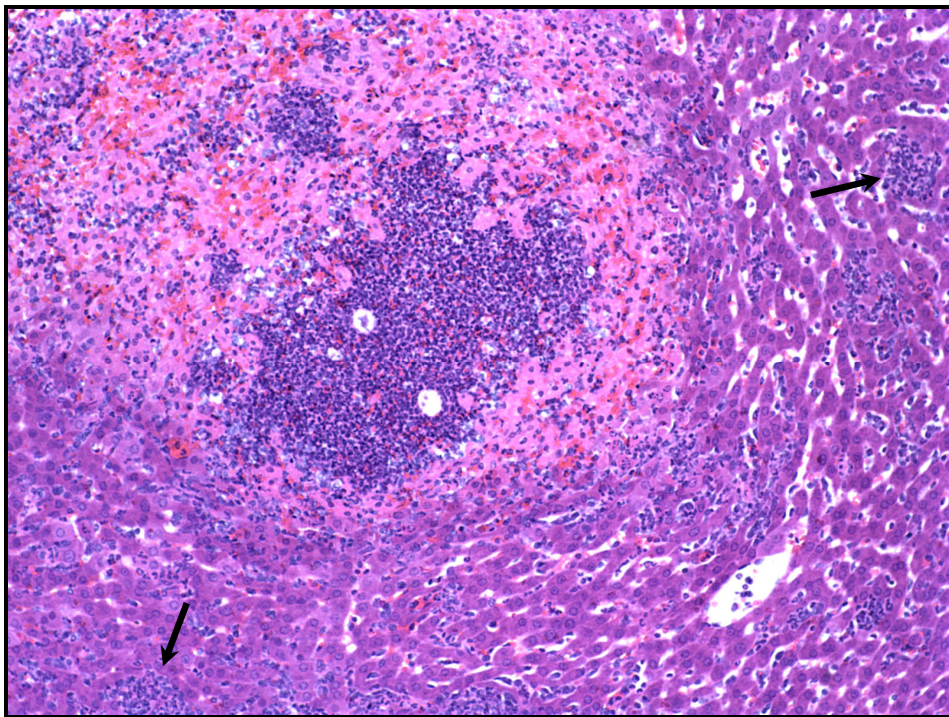
---

**Seis horas :** Observou-se pequenas áreas de lesões esbranquiçadas no sítio de inoculação que alcança face visceral, onde se visualiza melhor os focos inflamatórios. Microscopicamente, observou-se reação inflamatória periportal de intensidade variável com congestão moderada. Observaram-se áreas com necrose e hemorragia intensa. Presença de amebas envoltas por leucócitos polimorfonucleares (figura 5).



**Figura 5.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster seis horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. a) Observa-se aumento acentuado das áreas de necrose e hemorragia (seta). b) Trofozoítos (setas) são encontrados cercados por PMN. Objetivas: (a) 20x, (b) 60x. Coloração HE.

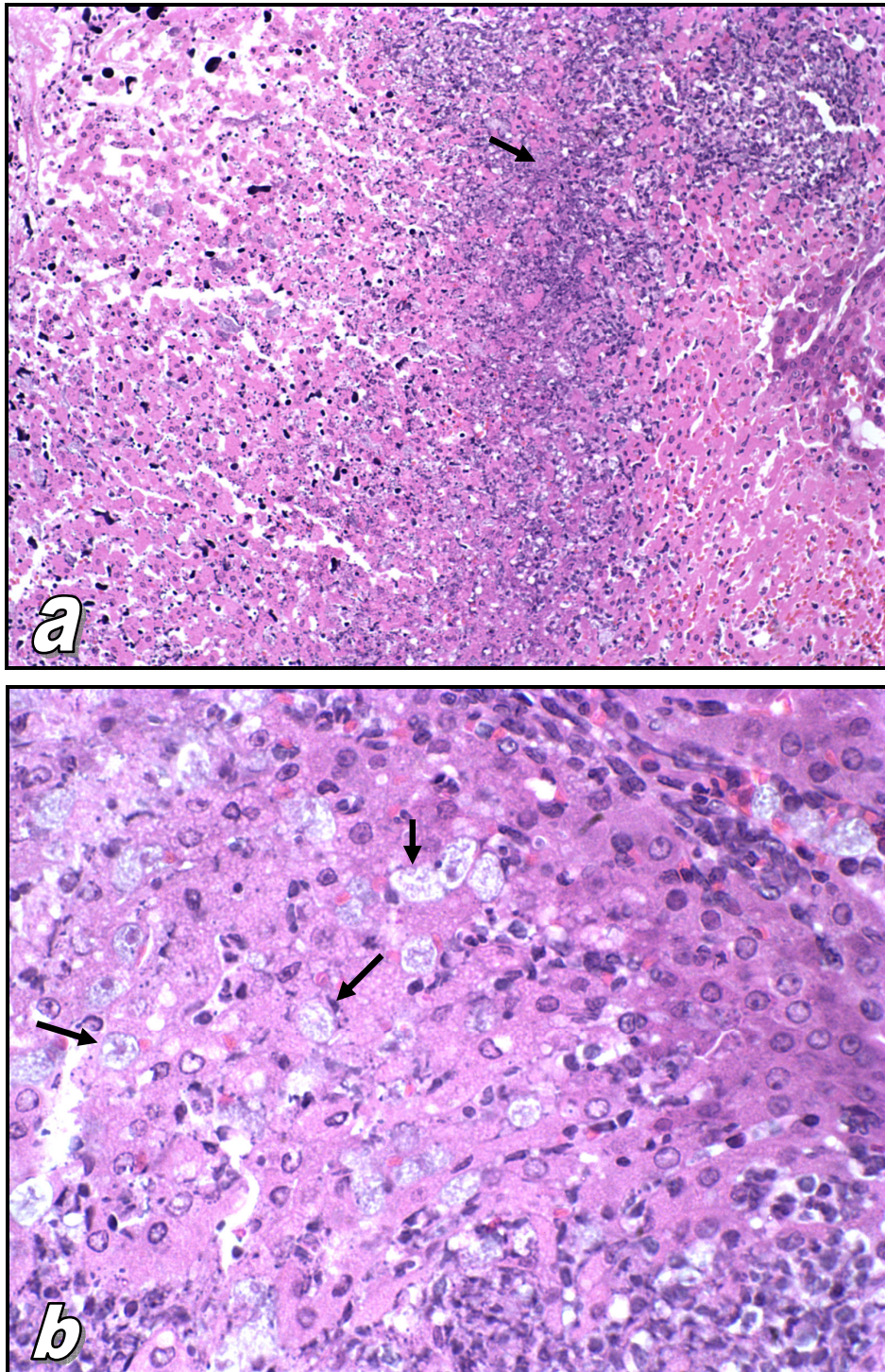
**Doze horas** : Macroscopicamente, observaram-se numerosos pontos esbranquiçados em face diafragmática e visceral. Microscopicamente, observa-se presença de numerosos focos inflamatórios de intensidade elevada com ausência de trofozoítos de *E. dispar*. Outros focos associados à trofozoítos e ampla área de necrose também foram visualizados (figura 6).



**Figura 6.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster doze horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. Extensas áreas de necrose no tecido hepático. Numerosos infiltrados focais de PMNs (setas). Objetiva 20x. Coloração HE.

---

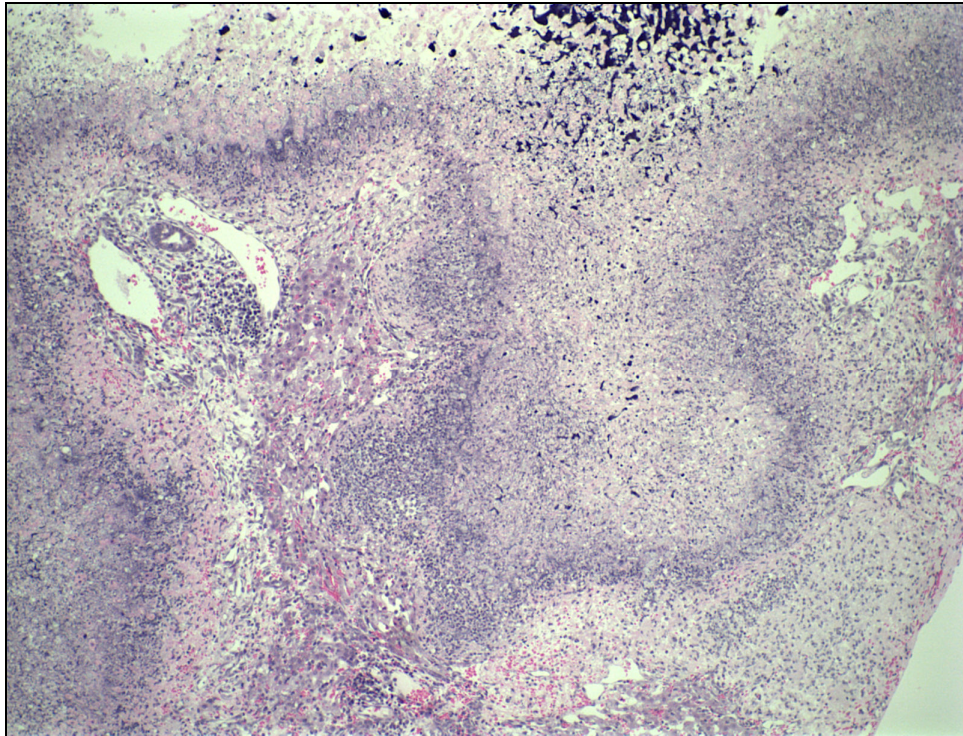
**Vinte e quatro horas :** Lesão esbranquiçada localizada em face diafragmática, no lóbulo hepático esquerdo. Microscopicamente, visualizaram-se extensas áreas de necrose com material basófilo (restos celulares), algumas áreas com restos amebianos e outras com amebas aparentemente viáveis, as vezes em contato direto com hepatócitos (figura 7). Observou-se uma reação de tipo granulomatosa com trofozoítos aparentemente normais e extensa lise de células inflamatórias. Em algumas zonas escassos neutrófilos e macrófagos. Também foi possível visualizar áreas de ramos da veia-porta com presença de amebas e congestão.



**Figura 7.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 24 horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. a) Extensas áreas de necrose com PMNs lisados (seta) e presença de amebas. b) Trofozoítos (setas) em contato direto com o parênquima hepático. Objetivas: (a) 20x, (b) 60x. Coloração HE.

---

**Quarenta e oito horas :** Fígado com lesões de tipo nodular, esbranquiçadas e duras ao corte. Microscopicamente, observou-se necrose tipo liquefativa com presença de material basófilo e hemorragia (figura 8) com numerosas amebas, algumas com morfologia típica. Em algumas áreas notavam-se neutrófilos e macrófagos.



**Figura 8.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 48 horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. Extensas áreas de necrose com presença de intenso infiltrado inflamatório e perda da arquitetura tecidual. Objetiva 20x. Coloração HE.



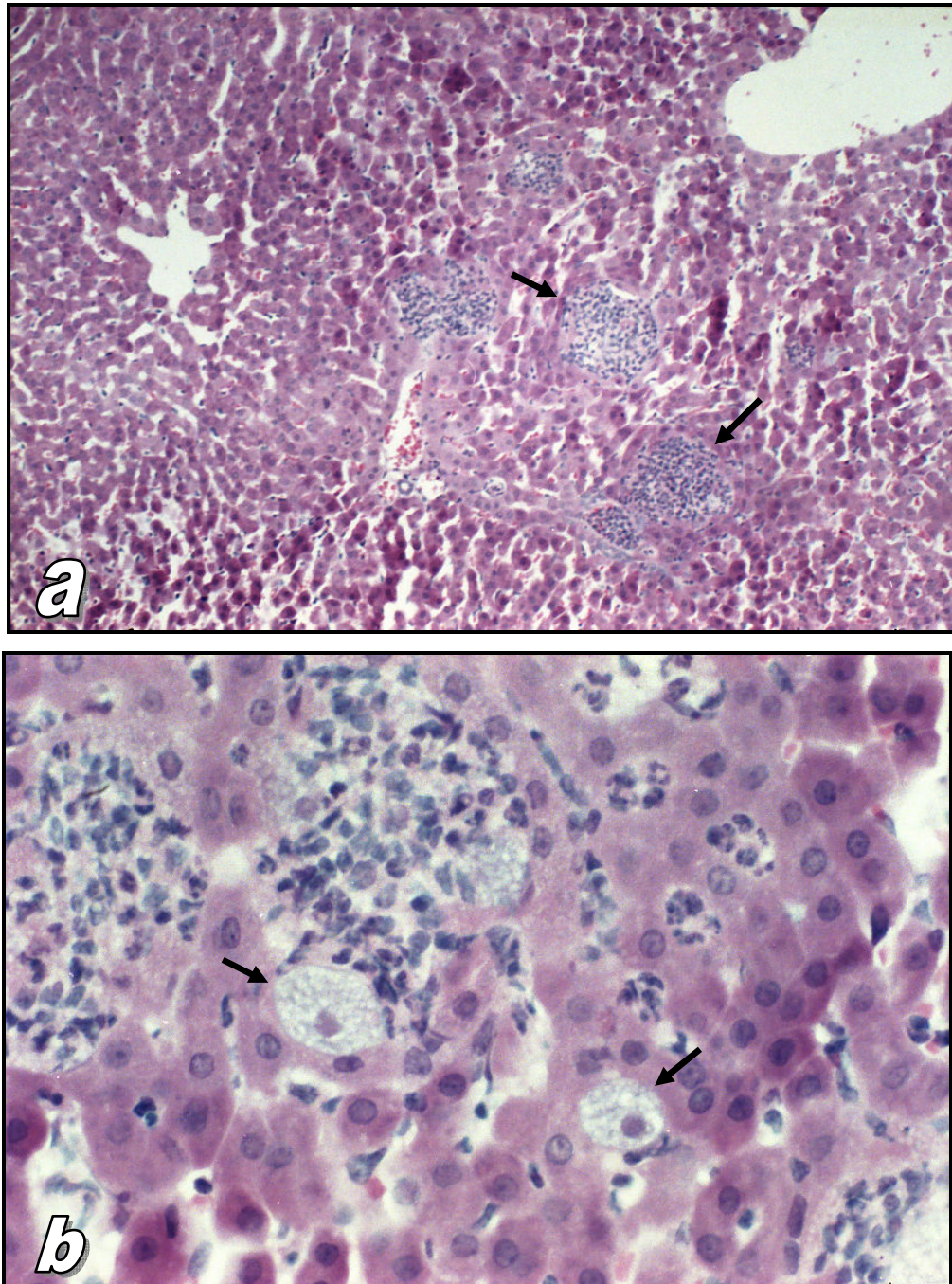
---

**Sete dias :** Fígado aderido à face diafragmática e visceral, com ampla área pálida ocupando mais da metade do órgão em todo o lóbulo esquerdo e parte do lóbulo médio. Presença de uma grande lesão esbranquiçada e dura, localizada nas faces diafragmática e visceral, com consistência firme ao corte. Microscopicamente, observou-se extensas áreas de necrose, praticamente não visualizaram-se trofozoítos de *E. dispar*, somente restos amebianos ou algumas amebas com morfologia atípica. Havia também hemorragia intensa, com núcleos de hepatócitos picnóticos. Não foi incluída figura por ser ela muito semelhante à anterior.

---

#### 5.1.1.2. Cepa ICB-EGG monoxênica (*E. histolytica*)

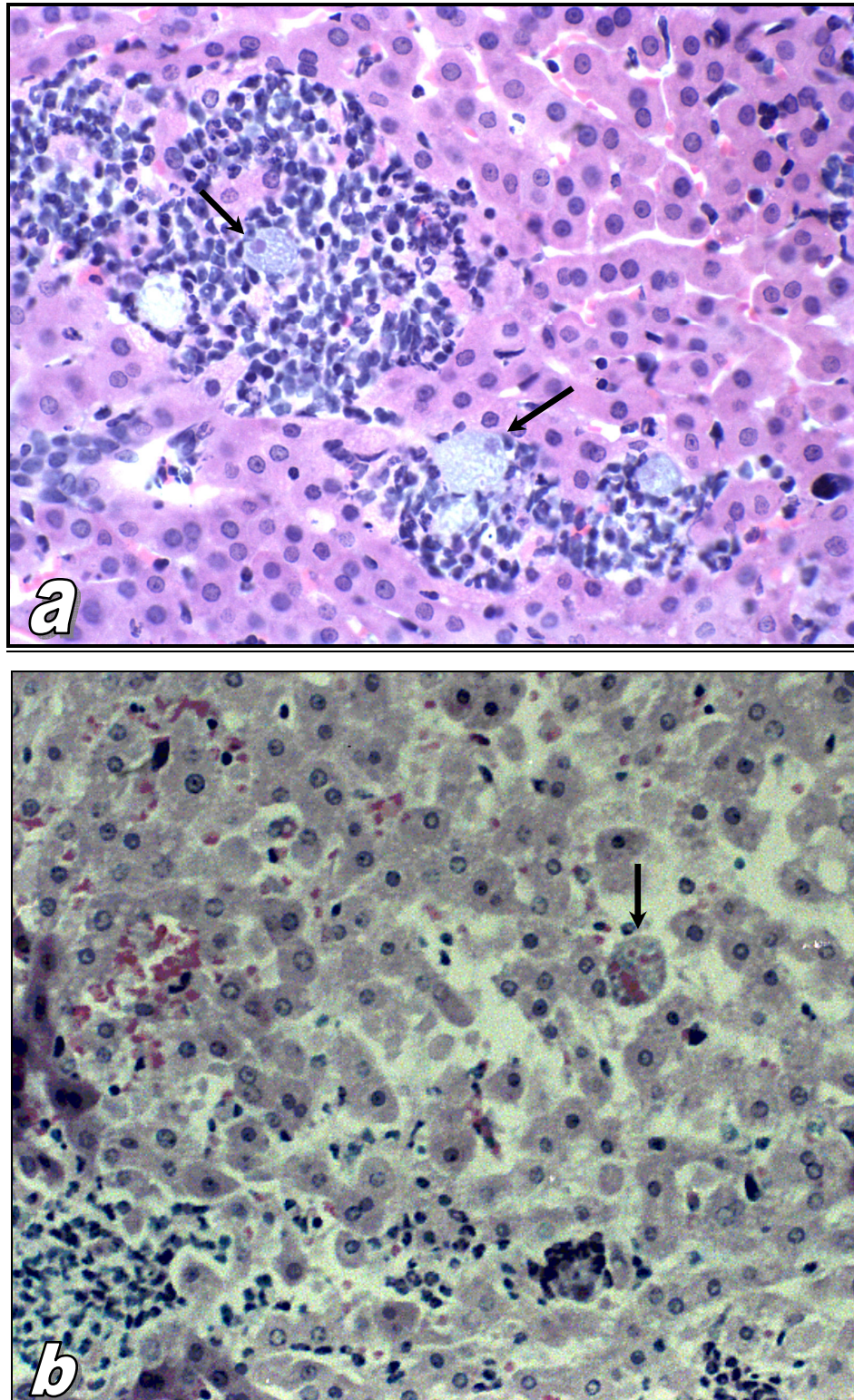
**Uma hora** : Macroscopicamente, o fígado apresentou-se congesto, com numerosos pontos esbranquiçados, alguns também na face visceral. Microscopicamente, vários focos de infiltrados inflamatórios, com amebas envoltas por PMN, algumas apresentando eritrócitos em seu interior. Também visualizaram-se amebas em sinusóides (figura 9).



**Figura 9.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster uma hora pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. a) Numerosos focos inflamatórios (setas) dispersos pelo tecido hepático. b) Trofozoítos bem preservados (setas) em contato direto com hepatócitos. Objetivas: (a) 20x, (b) 60x. Coloração HE.

---

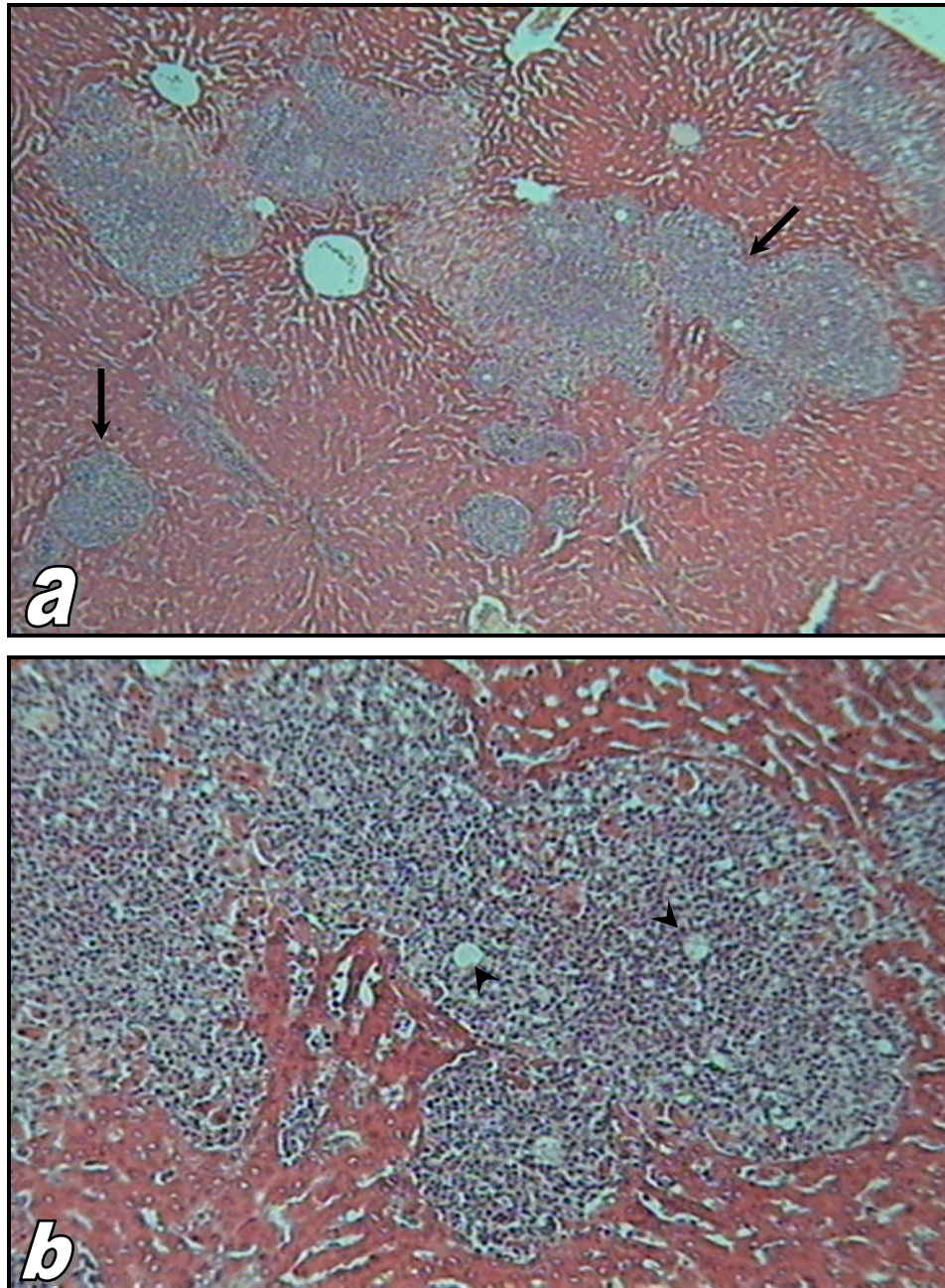
**Três horas** : Fígado apresentando pequenos pontos inflamatórios, que se encontram principalmente em face diafragmática e pouco na visceral. Microscopicamente, os focos inflamatórios aumentaram notavelmente em tamanho e número, com amebas presentes nos focos. Áreas de necrose com presença de amebas, apresentando eritrócitos em seu interior (figura 10). Alguns trofozoítos foram visualizados com eritrócitos fagocitados. Observou-se também cordões de hepatócitos com vacuolização do citoplasma.



**Figura 10.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster três horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. (a) Trofozoítos cercados por PMNs (setas). (b) Área de necrose, apresentando trofozoíto contendo eritrócitos em seu interior (seta). Objetivas: (a) 40x, (b) 60x. Coloração HE.

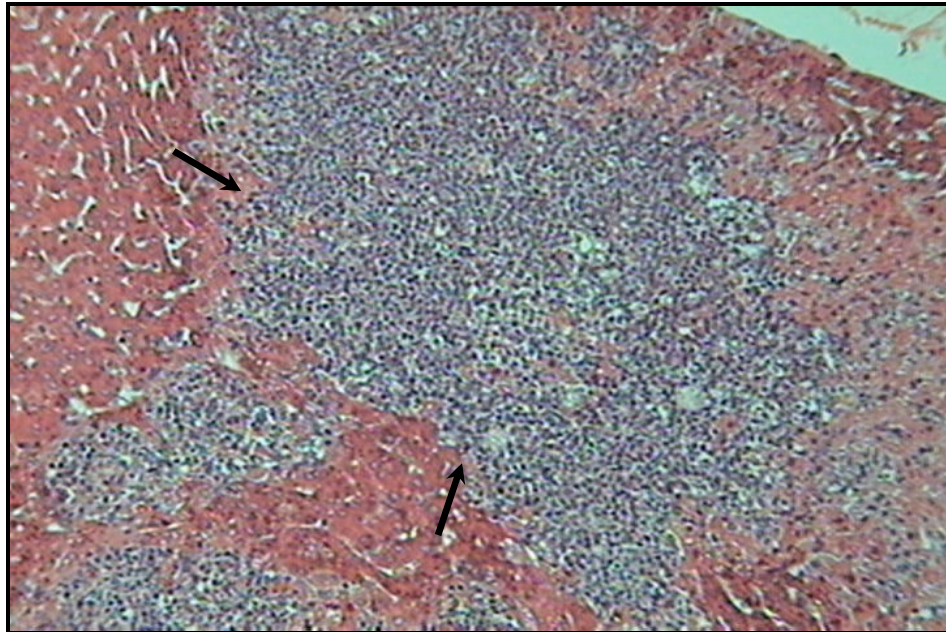
---

**Seis horas:** Fígado apresentando lesões puntiformes esbranquiçadas, que tendem a se unir e originar lesões maiores, presentes principalmente em face diafragmática. Microscopicamente, o infiltrado de PMNs está mais intenso (figura 11) com aumento das áreas de necrose dos hepatócitos e presença de trofozoítos próximos a essas áreas.



**Figura 11.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster seis horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. a) e b) Numerosos focos inflamatórios (setas) dispersos pelo tecido hepático, com trofozoítos (cabeças de seta) envoltos por PMN. Objetivas: (a) 4x, (b) 10x. Coloração HE.

**Doze horas:** Macroscopicamente, observaram-se lesões puntiformes esbranquiçadas em face diafragmática e visceral. Microscopicamente, encontrou-se aumento considerável das áreas de necrose, com confluência de algumas áreas lesionadas e destruição de hepatócitos, além da presença de alguns focos hemorrágicos (figura 12).

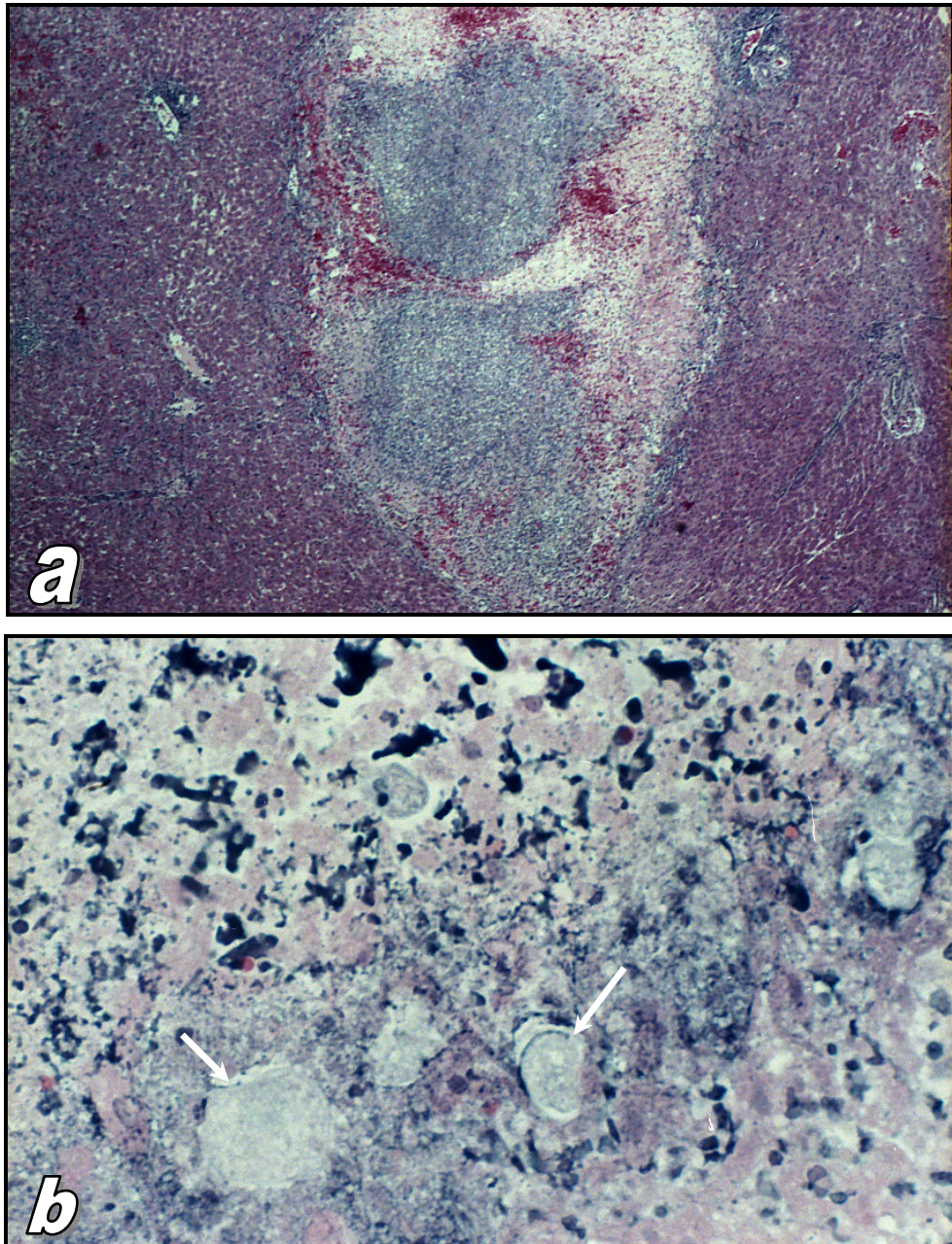


**Figura 12.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster doze horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. Observa-se grande área de necrose, com destruição de hepatócitos e numerosos PMNs (setas). (a) 10x. Coloração HE.



---

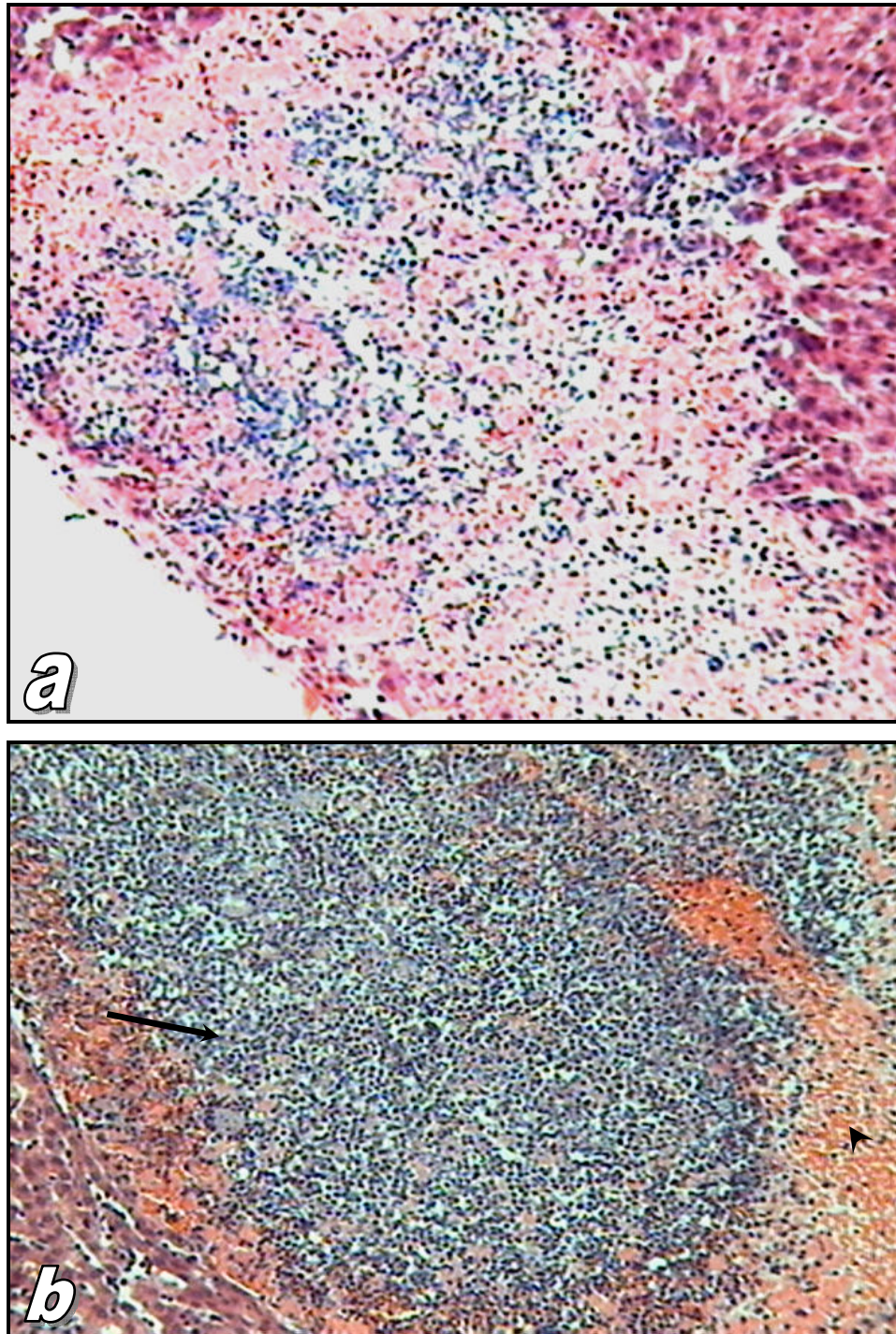
**Vinte e quatro horas** : Fígado com lesões esbranquiçadas, às vezes avermelhadas, não confluentes, principalmente em face diafragmática. Microscopicamente, observaram-se numerosos focos inflamatórios de grande tamanho, alguns rodeados por amplas áreas confluentes de necrose com numerosos trofozoítos (figura 13), com áreas apresentando hemorragia perivascular, parenquimatosa e na cápsula de Glisson.



**Figura 13.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 24 horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. a) Extensa área de necrose no parênquima hepático. b) Numerosos trofozoítos em áreas necróticas (setas). Objetivas: (a) 10x, (b) 40x. Coloração HE.

---

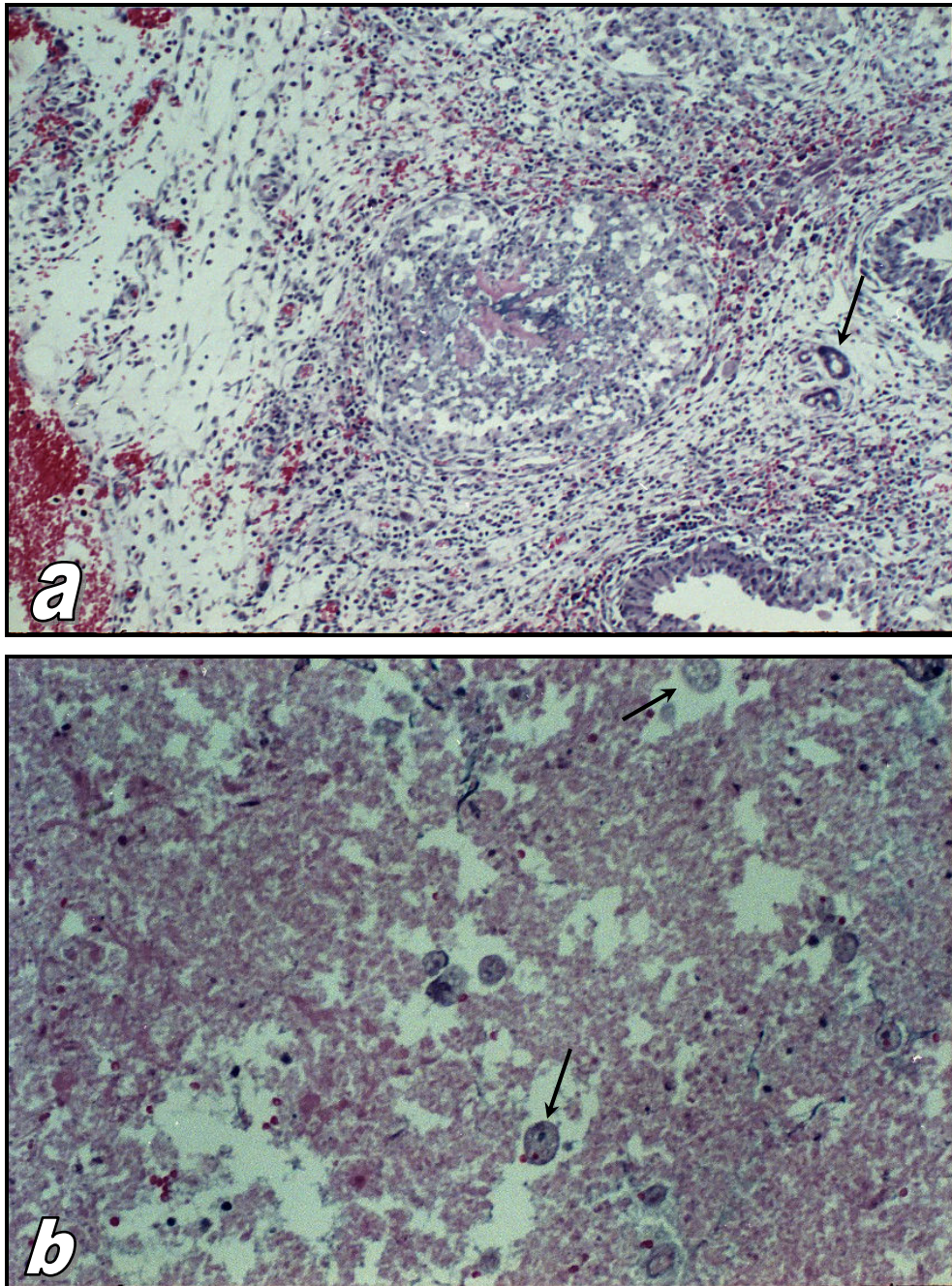
**Quarenta e oito horas** : Áreas de hemorragia intensa com necrose e congestão vascular. Próximo a cápsula observaram-se lesões necróticas com numerosos trofozoítos (alguns com eritrócitos) e restos de células inflamatórias (figura 14).



**Figura 14.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster 48 horas pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*. a) Extensa área de necrose no parênquima hepático, próximo à cápsula de Glisson. b) Extensa área de necrose com numerosos PMNs (seta) e presença de hemorragia (cabeça de seta). Objetivas: (a) 40x, (b) 10x. Coloração HE.

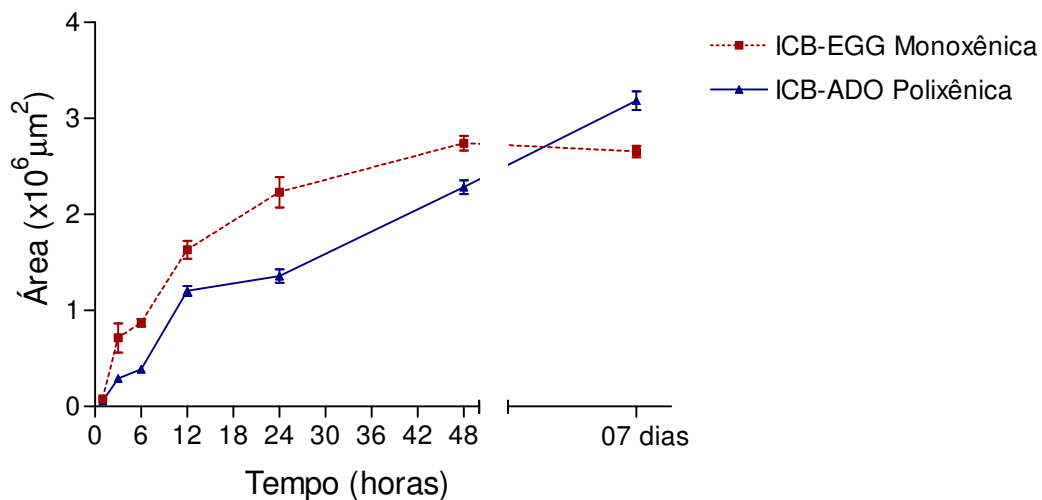
---

**Sete dias** : Lesão firme ao corte, de cor branca, localizada no lóbulo esquerdo nas faces visceral e diafragmática, ocupando praticamente todo o lóbulo. Microscopicamente, observou-se necrose de tipo liquefativa com numerosos trofozoítos e debris basofílicos. Em áreas próximas à necrose visualizou-se intensa fibroplasia com neoformação de fibroblastos e fibras colágenas. Numerosos trofozoítos e proliferação de condutos biliares. Presença de hepatócitos de neoformação. Presença de tecido conectivo intenso (fibroblastos e colágeno). Notam-se células inflamatórias de tipo agudo e crônico, com hemorragia moderada e numerosos trofozoítos associados à inflamação cronicada e também livres em áreas de lise (figura 15).



**Figura 15.** Aspecto histopatológico de lesões em fígado de hamster sete dias pós-inoculação com  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos a cepa ICB-EGG monoxênica. a) Extensa área de necrose contendo numerosos trofozoítos e proliferação de ductos biliares (seta). b) Trofozoítos em áreas de lise contendo hemácias em seu interior (setas). Objetivas: (a) 10x. (b) 40x. Coloração HE.

Através da análise morfométrica foi possível quantificar a área total de necrose e infiltrado inflamatório em diferentes períodos pós-infecção, onde verificou-se que a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* é capaz de ocasionar lesões tão extensas quanto à cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* aos sete dias pós-inoculação. Porém, o desenvolvimento das lesões acontece de forma mais lenta nos tempos iniciais, conforme demonstrado na figura 16.



**Figura 16.** Distribuição do somatório das áreas de necrose e infiltrado inflamatório em diferentes períodos de infecção por cepas de *E. histolytica* (ICB-EGG monoxênica) e *E. dispar* (ICB-ADO polixênica).

#### 5.1.1.3. Inoculação de meio de cultura

**Seis horas:** Fígado com coloração e aspecto normais. Microscopicamente, observou-se discreto infiltrado perivascular de PMNs, principalmente em veias centrolobulares.

**Vinte e quatro horas:** As características encontradas foram semelhantes a seis horas.

**07 dias:** Não se observou alterações a nível macroscópico ou microscópico.

---

#### 5.1.1.4. Inoculação de bactérias da cepa ICB-ADO polixênica

**Seis horas:** Fígado apresentando pequenos pontos esbranquiçados no lóbulo inoculado, somente em face diafragmática. Microscopicamente, visualizaram-se focos inflamatórios e ligeira congestão vascular em ramos da veia-porta.

**Vinte e quatro horas:** As características encontradas foram semelhantes a seis horas.

**Sete dias:** Fígado com coloração e aspecto normais. Microscopicamente, observou-se discretos focos inflamatórios perivasculares de PMNs.

#### 5.1.1.5. Inoculação de trofozoítos fixados com glutaraldeído

**Seis horas:** Fígado apresentando numerosos pontos esbranquiçados no lóbulo inoculado, somente visualizados em face diafragmática. Microscopicamente, os trofozoítos apresentavam-se rodeados por camadas de PMNs, sem presença de necrose.

**Vinte e quatro horas:** Observou-se, macroscopicamente, pequenos pontos esbranquiçados no lóbulo inoculado, que não atingiam face visceral. Microscopicamente, observou-se numerosos pontos de infiltrado inflamatório, com amebas destruídas localizadas no centro do foco inflamatório.

**Sete dias:** Fígado com aspecto macroscópico normal. Microscopicamente, observou-se escassos focos inflamatórios distribuídos pelo parênquima hepático, sem presença de amebas.

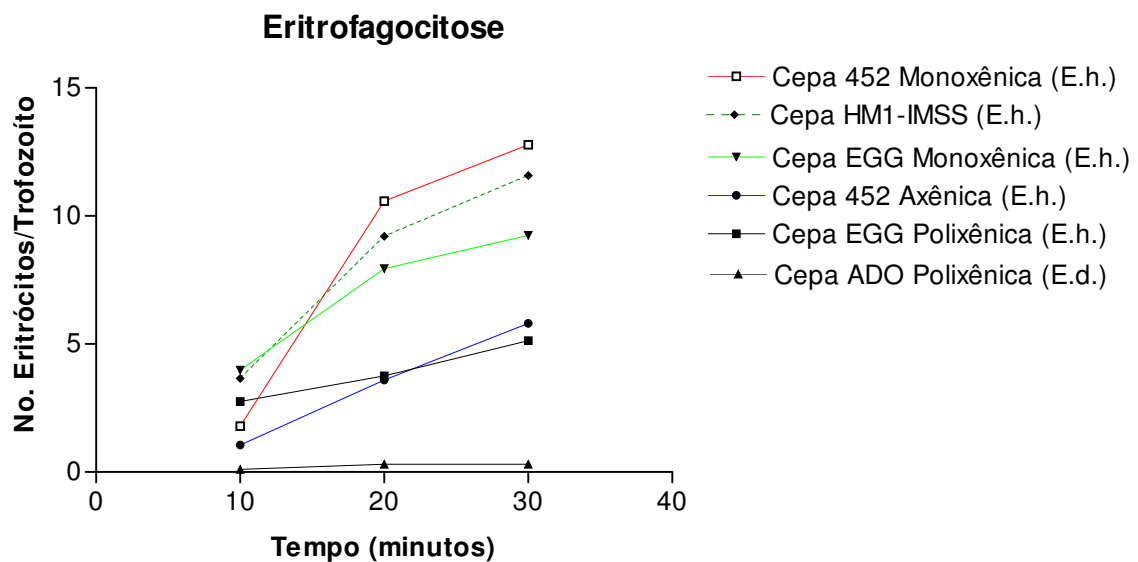


---

### 5.1.2. Estudos *in vitro*

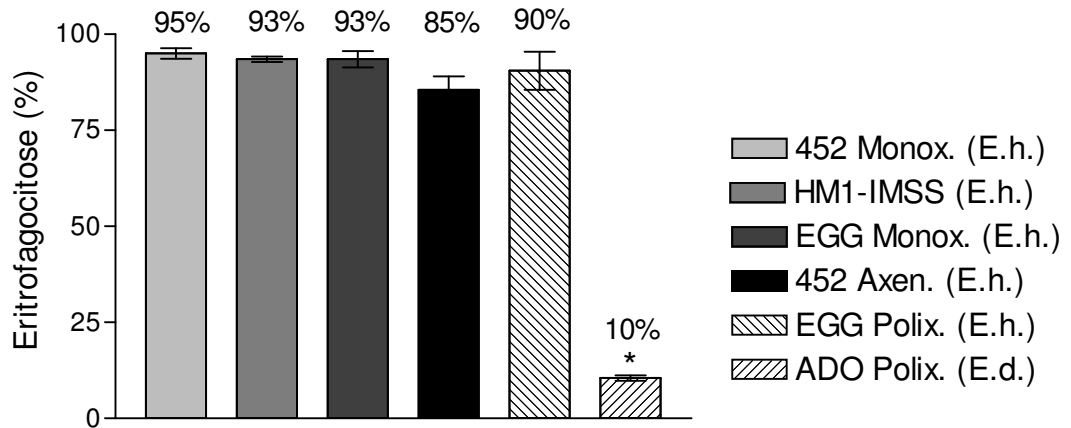
#### 5.1.2.1. Eritrofagocitose

Utilizando a técnica descrita por Trissl et al. (1978), foi observada uma maior capacidade de eritrofagocitose nas cepas ICB-452 monoxênica e ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica*, enquanto a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* apresentou baixa atividade fagocitária (figura 17). Em média, foi encontrada a seguinte relação eritrócitos/trofozoíto para as cepas estudadas aos 30 minutos: 12,78 para a cepa ICB-452 monoxênica (*E. histolytica* não virulenta), 11,58 para a cepa HM1-IMSS axênica (*E. histolytica* virulenta), 9,24 para a cepa ICB-EGG monoxênica (*E. histolytica* virulenta), 5,81 para a cepa ICB-452 axênica (*E. histolytica* não virulenta), 5,13 para a cepa ICB-EGG polixênica (*E. histolytica* virulenta) e 0,30 para ICB-ADO polixênica (*E. dispar* virulenta).



**Figura 17.** Fagocitose de eritrócitos humanos por cepas de *E. histolytica* (E.h.) e *E. dispar* (E.d.). Foi utilizada uma relação de um trofozoíto para 100 eritrócitos.

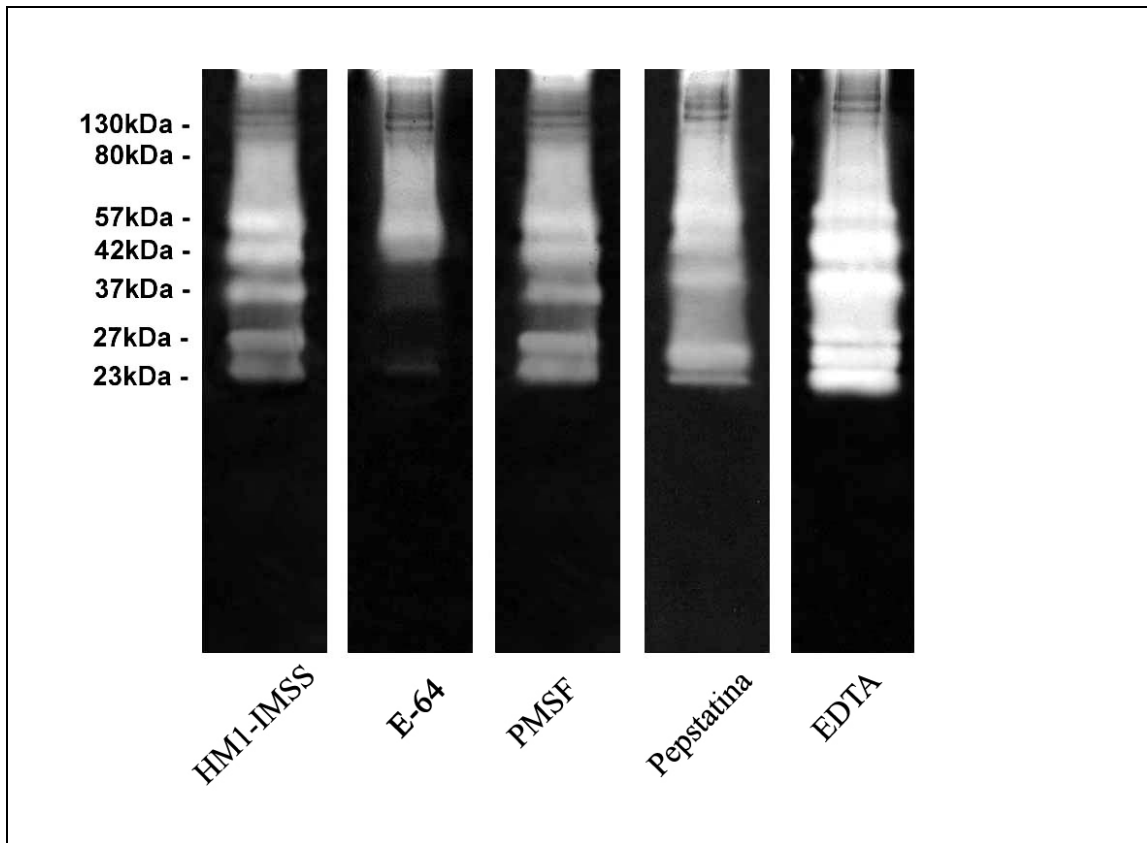
Quando se compara a porcentagem de trofozoítos que realizaram a fagocitose de eritrócitos humanos (figura 18), observa-se que o número de trofozoítos de *E. histolytica* que fagocitaram hemácias foi superior ao de *E. dispar*, porém sem diferenças significativas entre as diferentes cepas de *E. histolytica*.



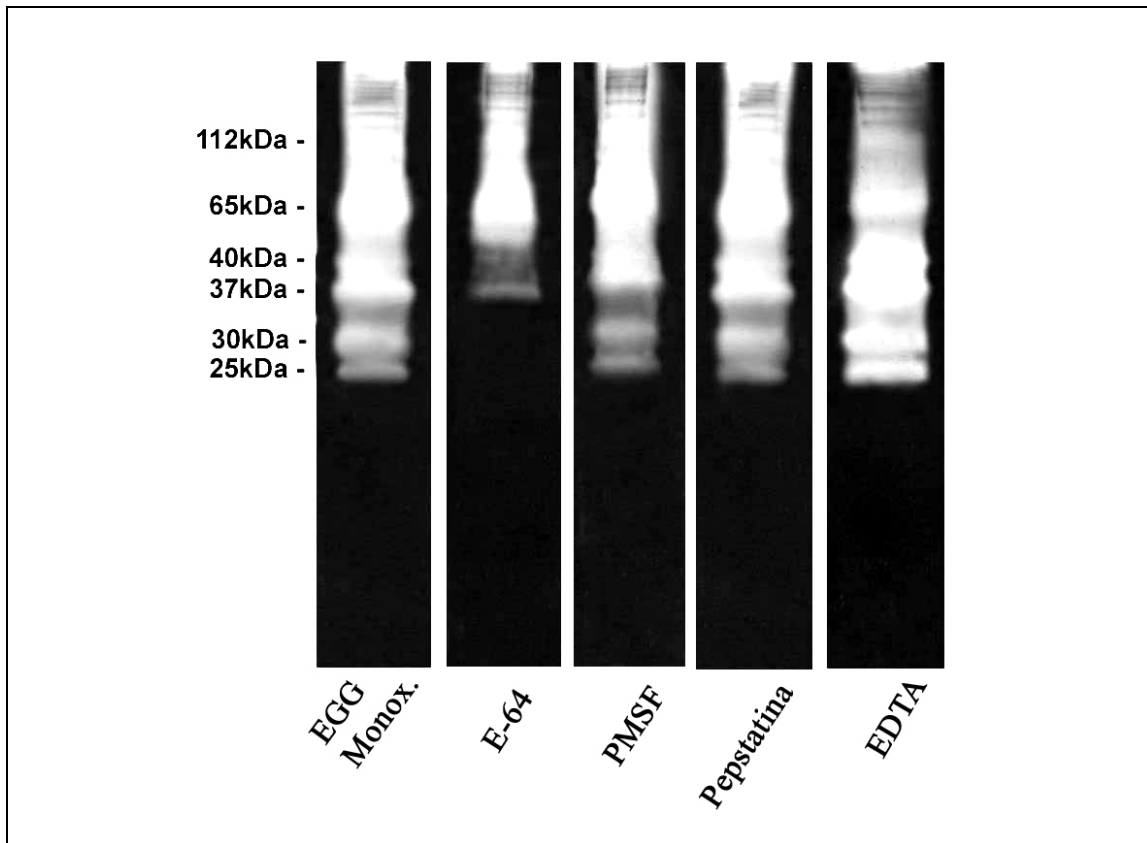
**Figura 18.** Porcentagem de trofozoítos de cepas de *E. histolytica* (E.h.) e *E. dispar* (E.d.) que fagocitaram eritrócitos humanos após 30 minutos de interação. (\* =  $p < 0.05$ )

#### 5.1.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida

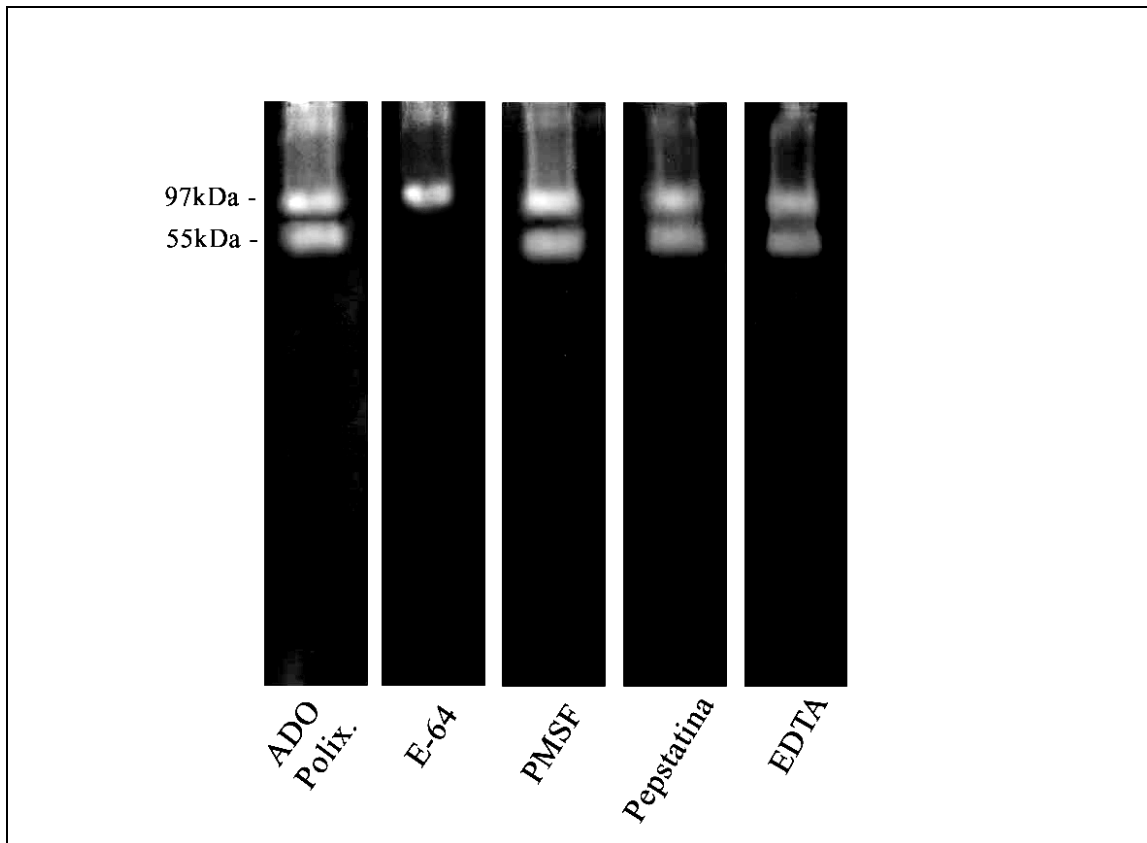
Foram encontradas diferenças entre os padrões proteolíticos em géis de poliacrilamida dos extratos totais da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* e da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* quando comparados com o padrão proteolítico da cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*. Enquanto as cepas de *E. histolytica* mostraram perfis semelhantes de proteases (figuras 19 e 20), a cepa de *E. dispar* (figura 21) somente apresentou duas bandas (97 e 55kDa). Em todas as amostras, o inibidor de cisteínoprotease E-64 inibiu a atividade proteolítica presente nos extratos totais.



**Figura 19.** Atividade proteolítica de extratos totais da cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie.



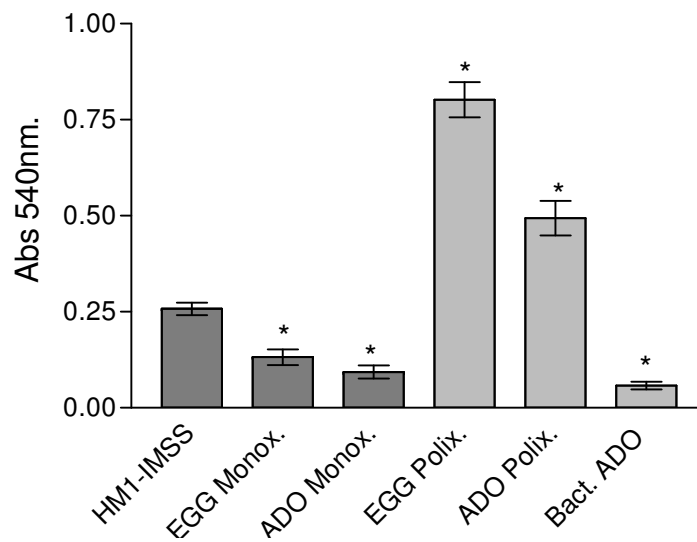
**Figura 20.** Atividade proteolítica de extratos totais da cepa ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie.



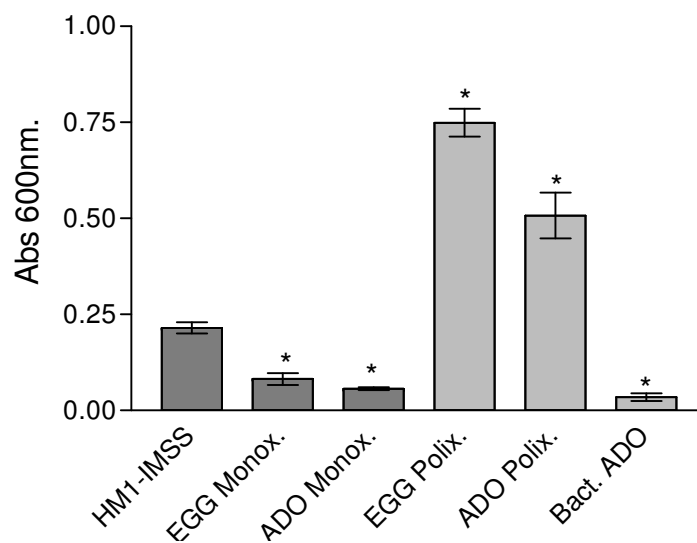
**Figura 21.** Atividade proteolítica de extratos totais da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* e efeito de inibidores de proteases em SDS-PAGE a 12% copolimerizado com 0,1% de gelatina de pele porcina e corado pelo azul de Coomassie.

#### 5.1.2.3. Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll

Observou-se nos extratos totais das cepas ICB-EGG (*E. histolytica*) e ICB-ADO (*E. dispar*) monoxênicas, uma menor atividade proteolítica quando comparada com a cepa HM1:IMSS (*E. histolytica*). Porém, extratos provenientes de cultivos polixênicos apresentaram uma maior atividade proteolítica (figuras 22 e 23). Os dados obtidos representam a média  $\pm$  dp de três experimentos independentes realizados em triplicata.

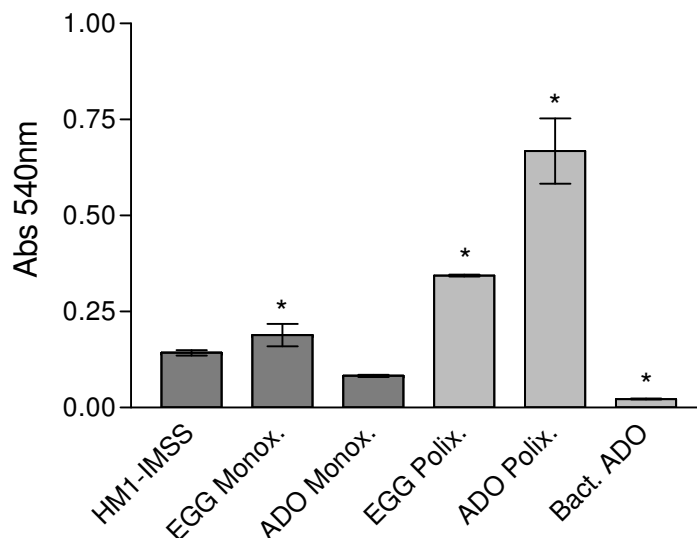


**Figura 22.** Atividade proteolítica de extrato total de trofozoítos de *E. histolytica* (cepas ICB-EGG) e *E. dispar* (cepas ICB-ADO) com substrato azocoll. (\* =  $p < 0.05$ )

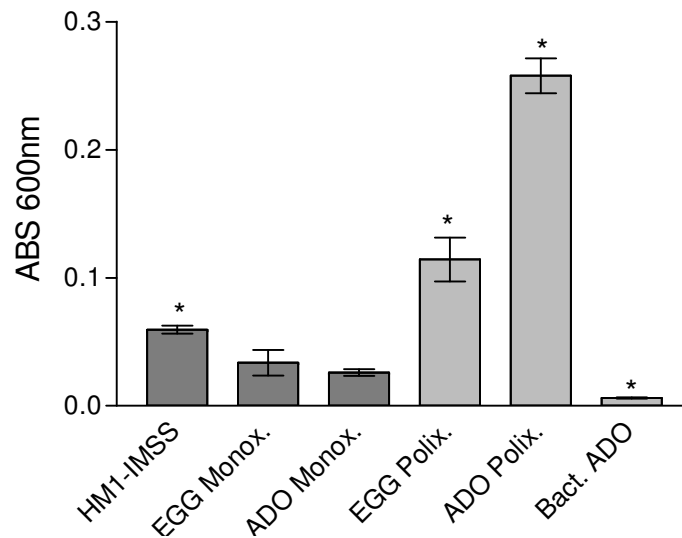


**Figura 23.** Atividade proteolítica de extrato total de trofozoítos de *E. histolytica* (cepas ICB-EGG) e *E. dispar* (cepas ICB-ADO) com substrato azure. (\* =  $p < 0.05$ )

Resultados semelhantes foram observados quando utilizados meios condicionados (figuras 24 e 25) porém apresentando valores mais baixos de atividade. Os meios condicionados obtidos de cultivos polixênicos apresentam uma maior atividade proteolítica, quando comparada com cultivos monoxênicos. Deve-se destacar que, neste caso, a cepa ICB-ADO polixênica apresentou a maior atividade proteolítica, ou seja, essa cepa é a que libera maiores quantidades de proteases ao meio.



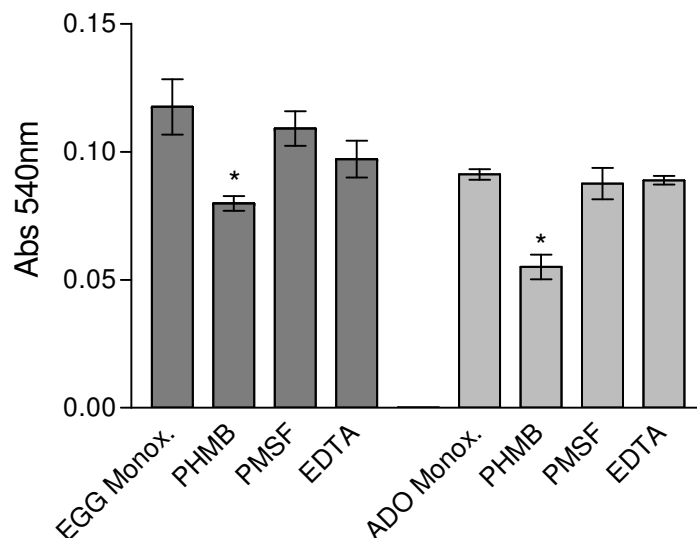
**Figura 24.** Atividade proteolítica de meio condicionado de *E. histolytica* (cepas ICB-EGG) e *E. dispar* (cepas ICB-ADO) com substrato azocoll. (\* =  $p < 0.05$ )



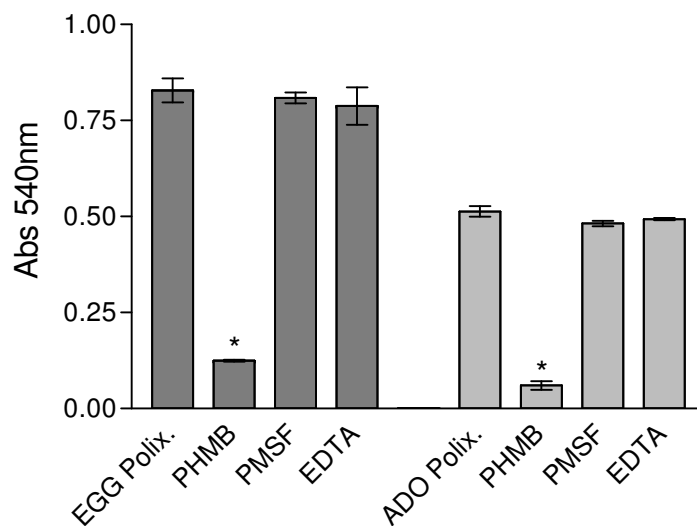
**Figura 25.** Atividade proteolítica de meio condicionado de *E. histolytica* (cepas ICB-EGG) e *E. dispar* (cepas ICB-ADO) com substrato azure. (\* =  $p < 0.05$ )

Para avaliar a natureza da atividade proteolítica observada nos extratos totais, inibidores de cisteína, serina e metaloproteases foram utilizados. Empregou-se o substrato azocoll para todos os inibidores. O inibidor para cisteínaprotease PHMB aboliu de forma efetiva a atividade proteolítica presente nos extratos das cepas polixênicas (figura 27). O mesmo ocorreu com os extratos das cepas monoxênicas, porém de forma menos intensa (figura 26). Os inibidores PMSF e EDTA não apresentaram reduções significativas nas atividades proteolíticas em estudo. Os dados obtidos representam a média  $\pm$  dp de três experimentos independentes realizados em triplicata.





**Figura 26.** Inibição da atividade proteolítica de extratos totais de trofozoítos de *E. histolytica* (cepa ICB-EGG monoxênica) e *E. dispar* (cepa ICB-ADO monoxênica), utilizando como substrato azocoll. (\* =  $p < 0.05$ )



**Figura 27.** Inibição da atividade proteolítica de extratos totais de trofozoítos de *E. histolytica* (cepa ICB-EGG polixênica) e *E. dispar* (cepa ICB-ADO polixênica), utilizando como substrato azocoll. (\* =  $p < 0.05$ )

---

#### 5.1.2.4. Efeito Citopático sobre Células MDCK

Quando utilizou-se a relação de dois trofozoítos/célula MDCK, observou-se a destruição total das células em monocamadas após 15 minutos de interação. Desta forma, a proporção foi invertida para 1:2 trofozoíto/células, sendo assim possível observar em tempos iniciais a interação de trofozoítos com células MDCK em monocamadas.

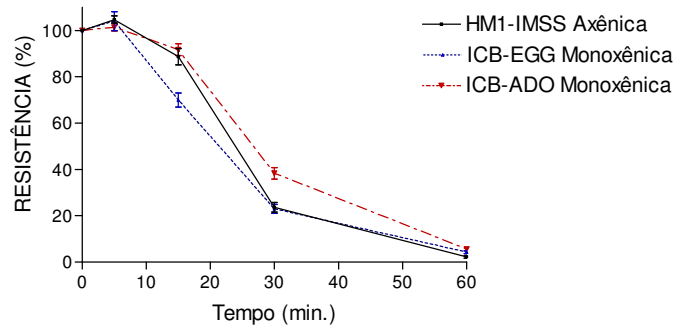
As cepas HM1:IMSS axênica e EGG monoxênica (ambas *E. histolytica* patogênicas) apresentaram grau semelhante de destruição aos 30 e 60 minutos de interação. Já a cepa ICB-ADO monoxênica (*E. dispar*) ocasionou um dano menor às células em monocamadas, apresentando menos de 50% do total de área destruída quando comparado com a cepa HM1:IMSS (tabela 1). As cepas ICB-ADO polixênica (*E. dispar*) e ICB-EGG polixênica (*E. histolytica*) apresentaram danos menores, porém não menos significativos.

| Cepa              | % destruição da monocamada |        |        |
|-------------------|----------------------------|--------|--------|
|                   | 15 min                     | 30 min | 60 min |
| HM1-IMSS (E.h.)   | 27                         | 55     | 89     |
| EGG Monox. (E.h.) | 19                         | 58     | 94     |
| ADO Polix. (E.d.) | 17                         | 31     | 60     |
| EGG Polix. (E.h.) | 19                         | 42     | 71     |
| ADO Monox. (E.d.) | 13                         | 18     | 37     |

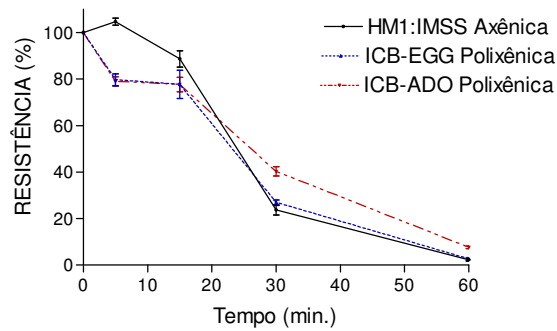
**Tabela 1.** Efeito citopático de cepas de *E. histolytica* (E.h.) e *E. dispar* (E.d.) sobre monocamadas de células MDCK.

#### 5.1.2.5. Medida da Resistência Transepitelial (R<sub>Te</sub>)

A queda da R<sub>Te</sub> utilizando a cepa ICB-ADO (*E. dispar*) é mais lenta, quando comparada com as cepas de *E. histolytica*. Aos 30 minutos, a medida da R<sub>Te</sub> das cepas ICB-ADO monoxênica e polixênica é maior que aquela observada para as cepas HM1:IMSS e ICB-EGG (figuras 28 e 29). Porém, aos 60 minutos de interação, todas as cepas apresentaram uma perda total da R<sub>Te</sub>, com exceção da cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*.



**Figura 28.** Efeito de trofozoítos de *E. dispar* (ICB-ADO monoxênica) e *E. histolytica* (ICB-EGG monoxênica) na resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas.

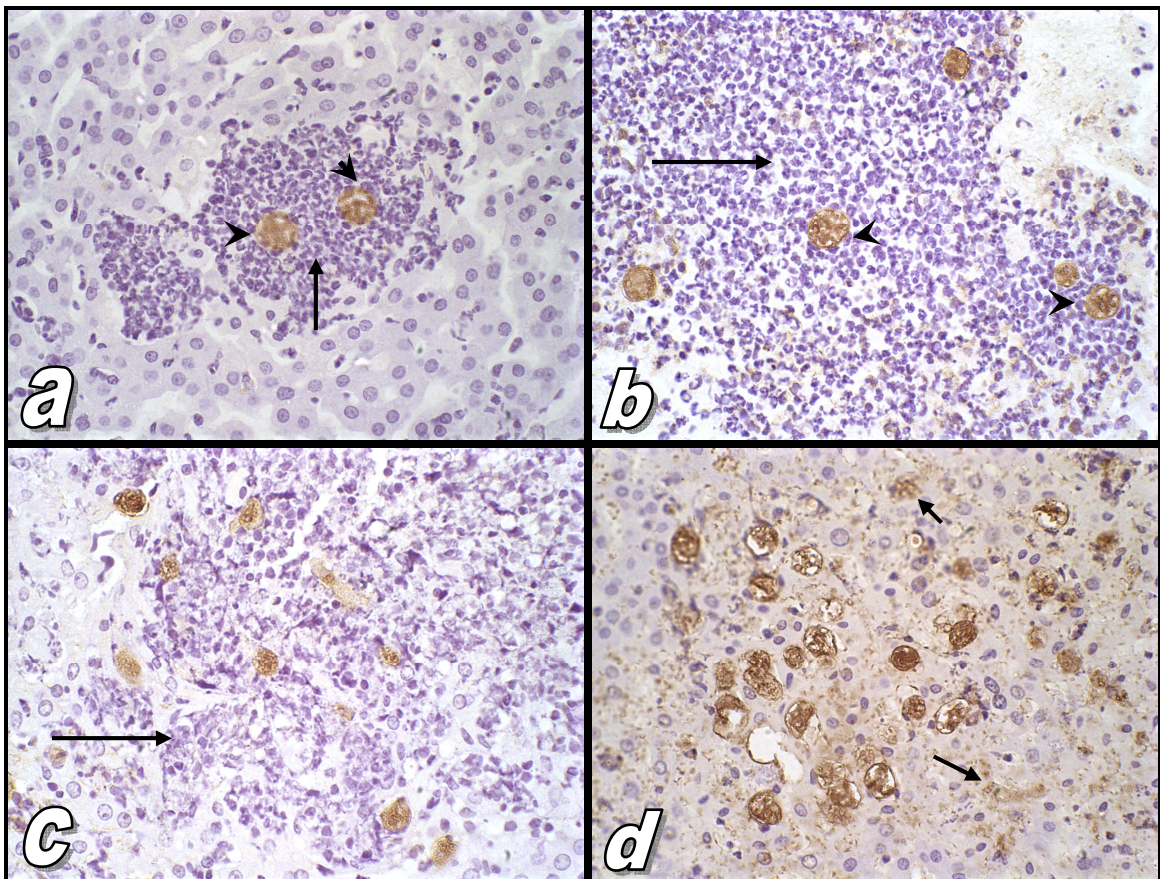


**Figura 29.** Efeito de trofozoítos de *E. dispar* (ICB-ADO polixênica) e *E. histolytica* (ICB-EGG polixênica) na resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas.

---

#### 5.1.2.6. Imunohistoquímica

Não observou-se a difusão de antígenos amebianos nos tecidos estudados. Enquanto os trofozoítos se marcavam fortemente pela peroxidase, o mesmo não ocorreu com as células endoteliais, parênquima hepático ou PMNs presentes nos focos inflamatórios (figura 30). Em áreas onde havia grande número de amebas destruídas, notou-se uma forte marcação do tecido, resultado da dispersão de antígenos liberados pela lise dos trofozoítos.



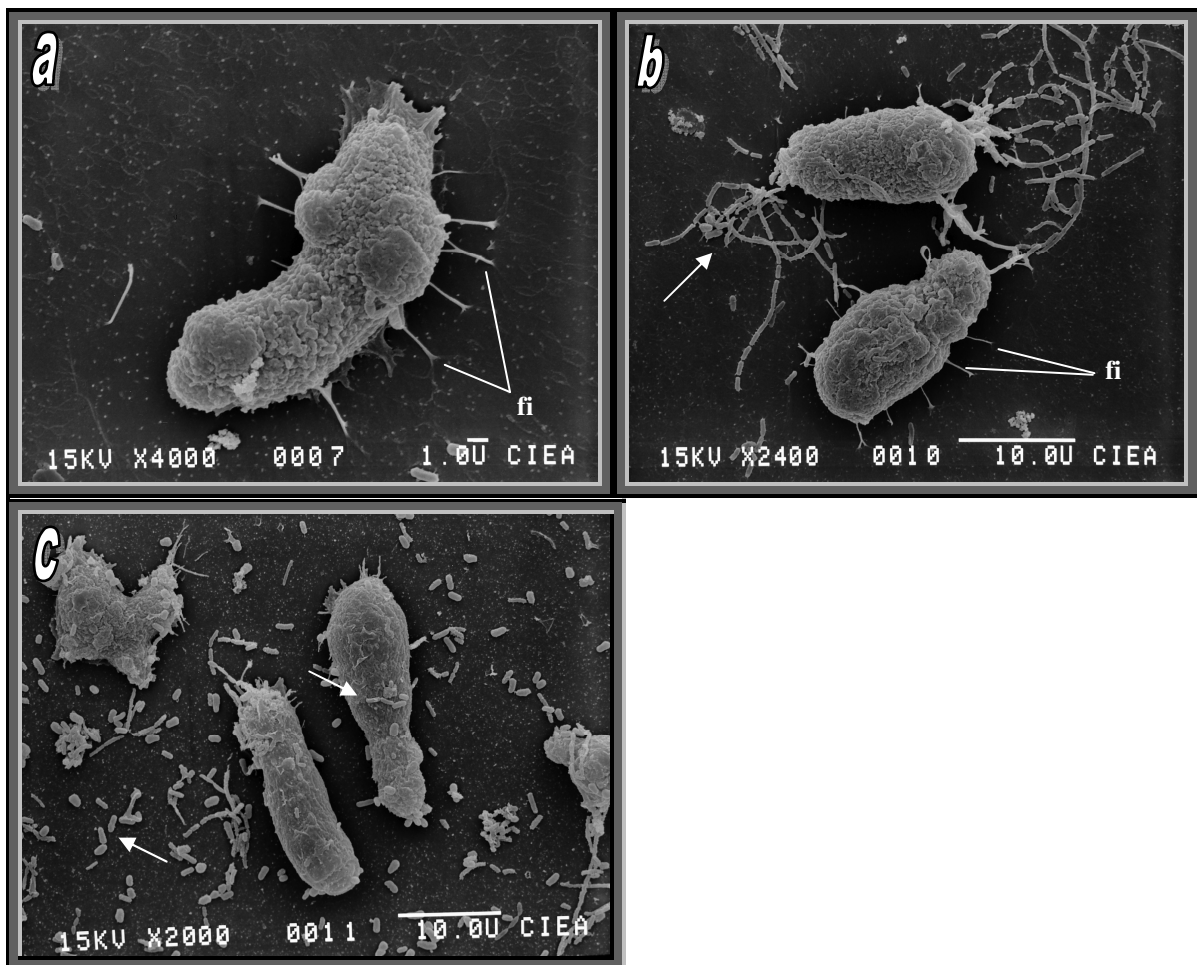
**Figura 30.** Interação *in vivo* em diferentes tempos pós-inoculações de trofozoítos de *E. dispar* (cepa ICB-ADO polixênica) com hepatócitos de hamsters, utilizando peroxidase marcada contra anticorpos policlonais de *E. dispar*. a) três horas. Observa-se dois trofozoítos (cabeça de seta) cercados por camadas de PMNs (seta). b) 12 horas. Trofozoítos fortemente marcados (cabeça de seta) porém, infiltrado de PMN sem imunomarcagem (seta). c) 24 horas. Também não foram observadas marcas em PMN (seta) ou em hepatócitos adjacentes a zona de inflamação. d) Amebas lisadas, seis horas pós-inoculação, com forte marcação do tecido hepático (setas). Objetivas: 40x. Coloração Hematoxilina.

---

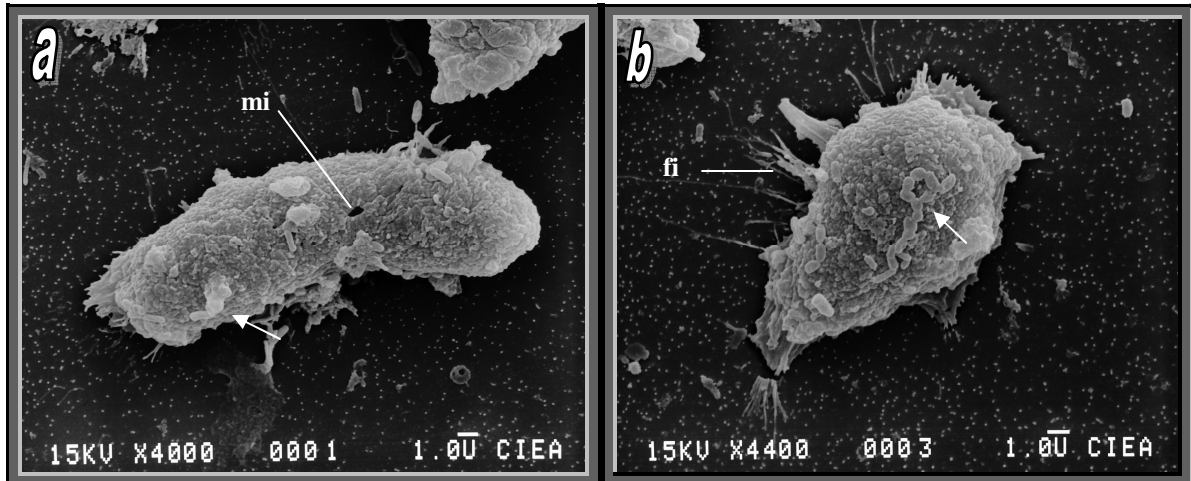
## 5.2. Estudos de Ultraestrutura

### 5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

As cepas estudadas apresentaram-se bastante pleomórficas. Trofozoítos de *E. dispar* (cepa ICB-ADO) possuíam aspecto mais alongado e com um maior número de filopódios quando comparados com trofozoítos de *E. histolytica* (cepa ICB-EGG), principalmente quando oriundos de cultivos polixênicos (figuras 31 e 32). A cepa ICB-EGG, continha escassos filopódios, que localizavam-se principalmente na região do uróide (figuras 33 e 34). Estruturas como formações esferoidais e estomas de micro e macropinocitose podem ser visualizados em algumas formas.

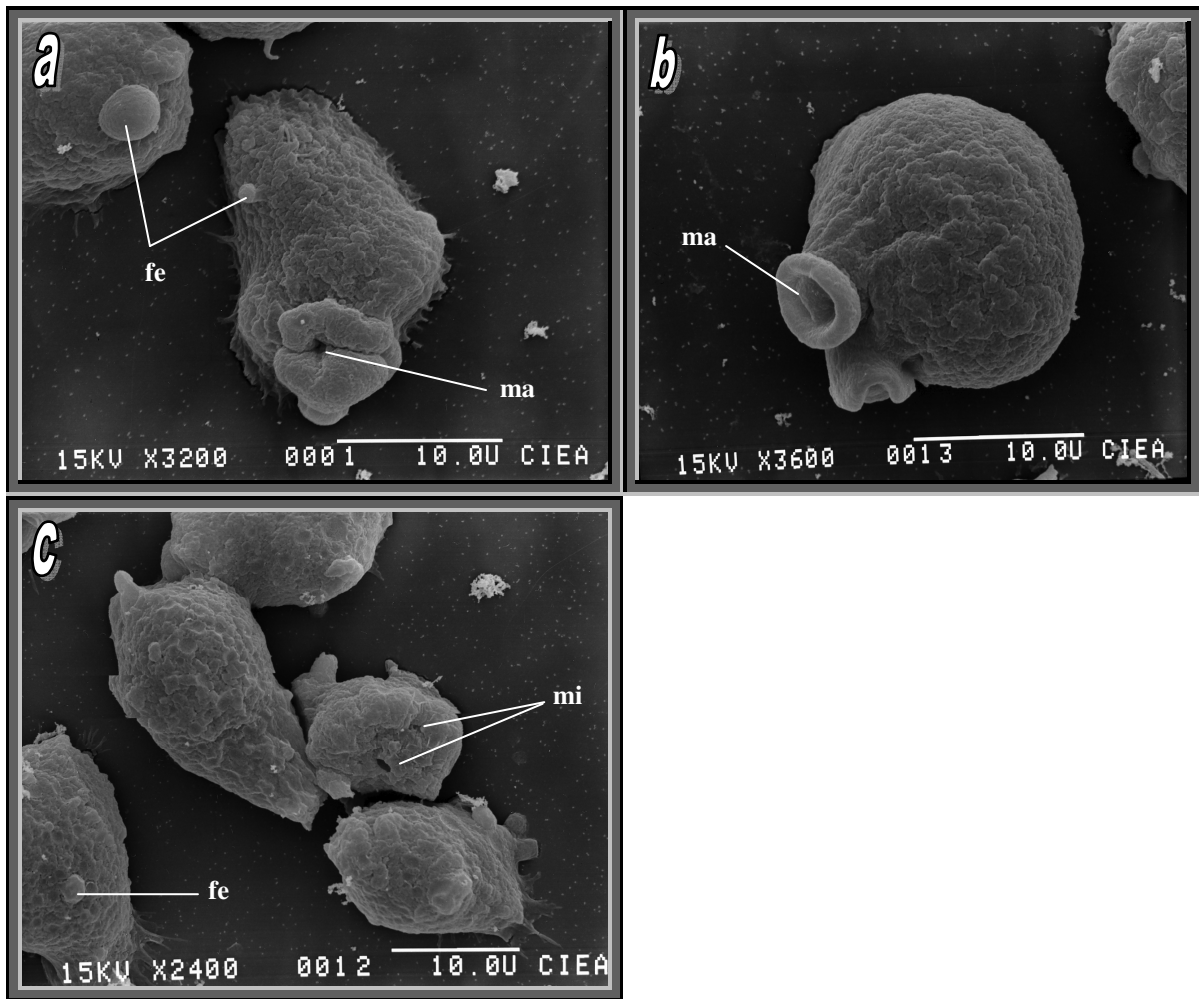


**Figura 31.** Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica (*E. dispar*) apresentando delgados filopódios (fi) aderidos ao substrato. Inúmeras bactérias encontram-se aderidas ao substrato e às membranas das amebas (setas). Barra: (a) 1 $\mu$ m, (b) e (c) 10 $\mu$ m.

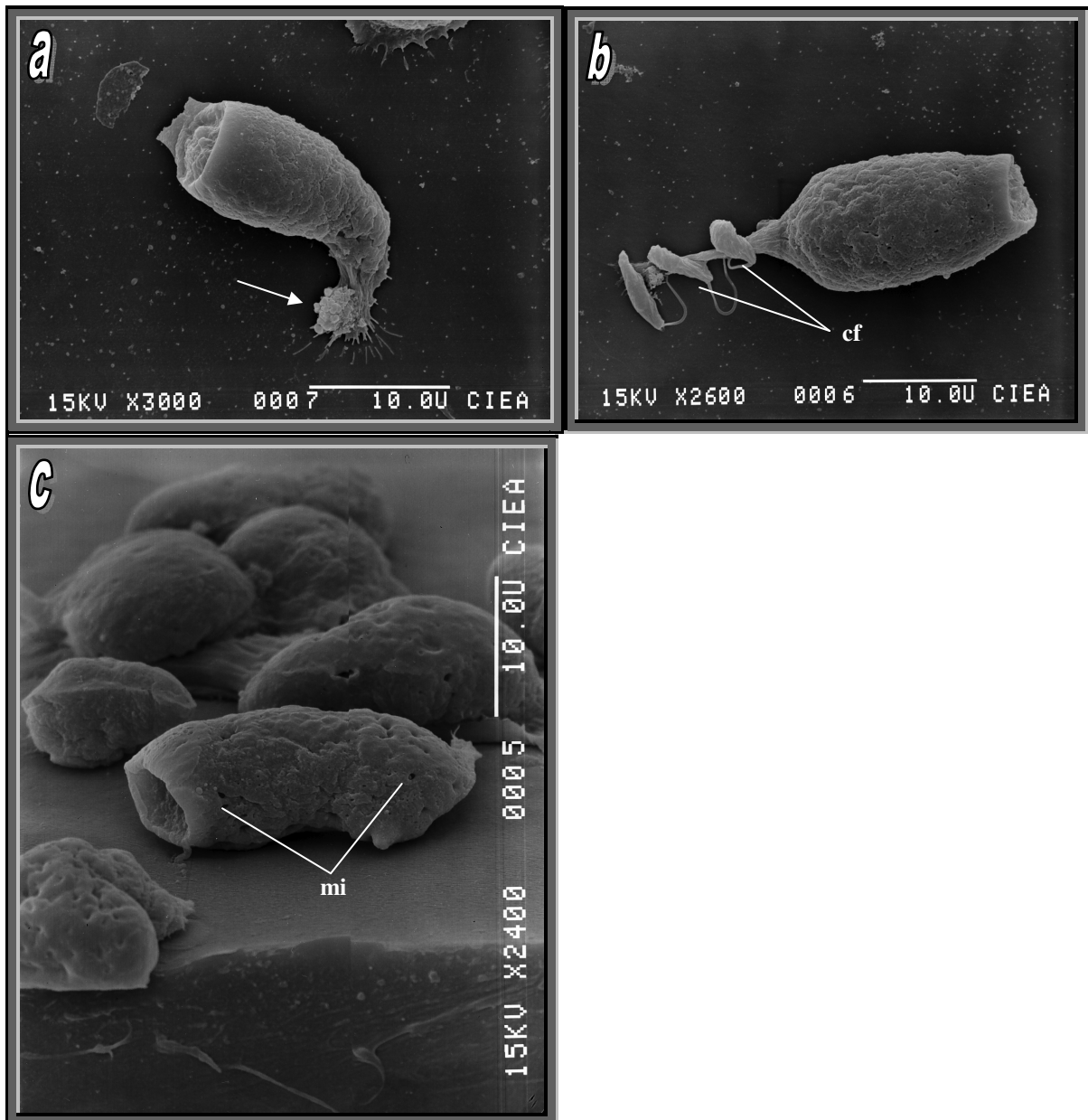


**Figura 32.** Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-EGG polixênica (*E. histolytica*). Nota-se bactérias aderidas às membranas das amebas (setas). mi = estoma de micropinocitose, fi = filopódios. Barra: (a) e (b) 1  $\mu$ m.





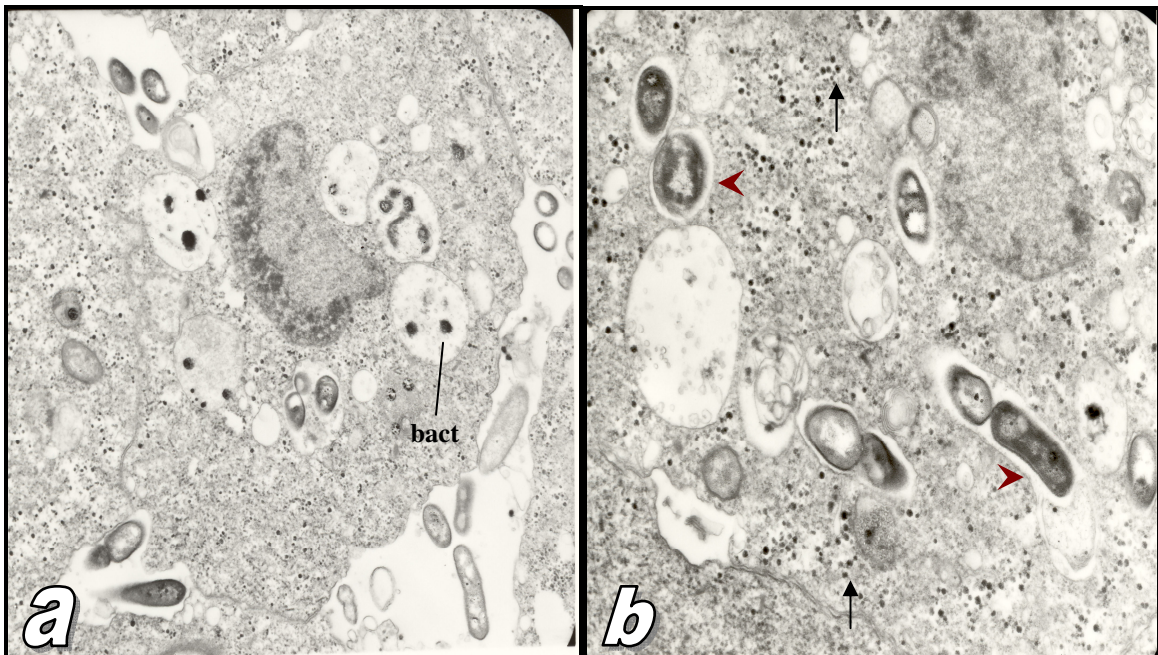
**Figura 33.** Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-ADO monoxênica (*E. dispar*). Nota-se na superfície do parasito estomas de micropinocitose (mi), macropinocitose (ma) e formações esferoidais (fe). Barra: (a), (b) e (c) 10 $\mu$ m.



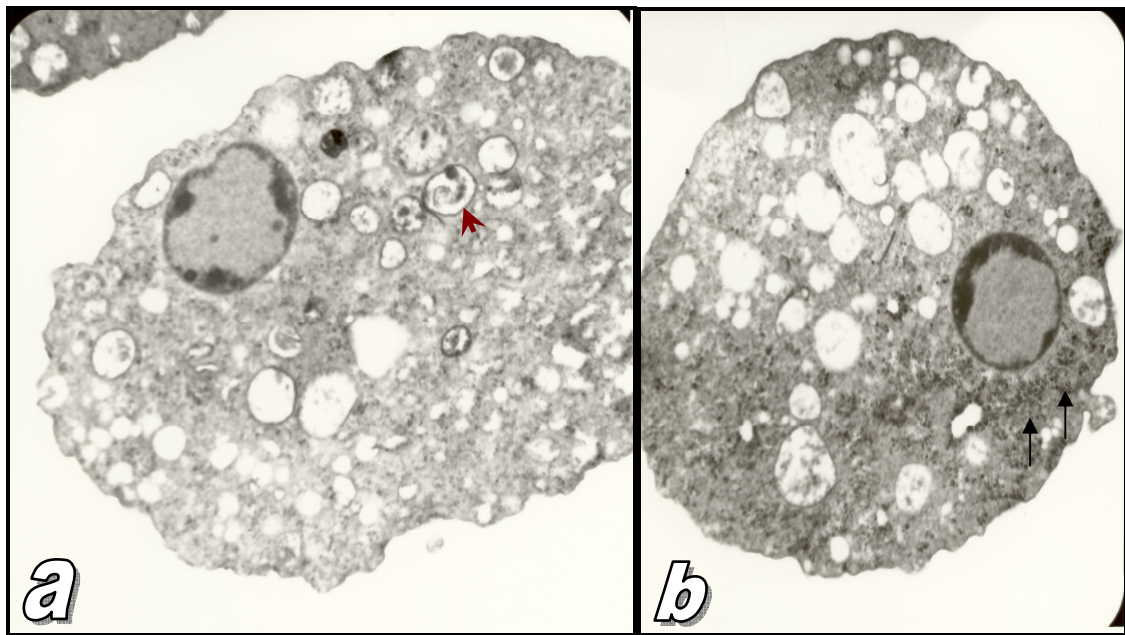
**Figura 34.** Microscopia eletrônica de varredura de trofozoítos da cepa ICB-EGG monoxênica (*E.histolytica*), onde observa-se a região do uróide (seta) com a presença de microfilopódios. Nota-se numerosos estomas de micropinocitose (mi) na superfície de alguns trofozoítos, além de algumas formas de *Crithidia fasciculata* (cf), um tripanosomatídeo adicionado ao meio de cultivo. Barra: (a), (b) e (c) 10 $\mu$ m.

### 5.2.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão

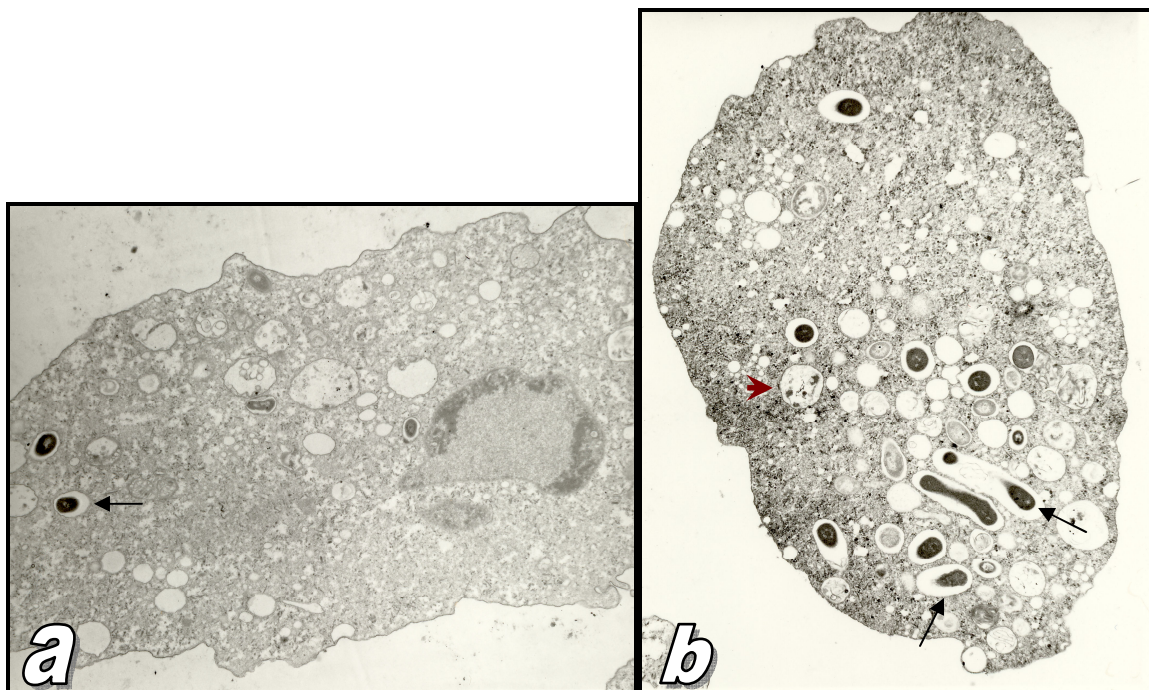
Foram observadas diferenças entre as cepas ICB-EGG polixênica e monoxênica de *E. histolytica* e as cepas ICB-ADO polixênica e monoxênica de *E. dispar*, através da microscopia eletrônica de transmissão. Os núcleos de trofozoítos mantidos em cultivo polixênico apresentaram-se irregulares, com uma cromatina mais frouxa e menos organizada, também foram visualizadas grandes quantidades de glicogênio no citoplasma de cepas polixênicas (figuras 35 a 37). Tanto cepas polixênicas como monoxênicas apresentaram vacúolos de diferentes formas e tamanhos, distribuídos por toda a matriz citoplasmática, porém cultivos polixênicos apresentaram um menor número de vacúolos quando comparados com cepas provenientes de cultivos monoxênicos, tanto para a cepa ICB-ADO de *E. dispar*, como para a cepa ICB-EGG de *E. histolytica*.



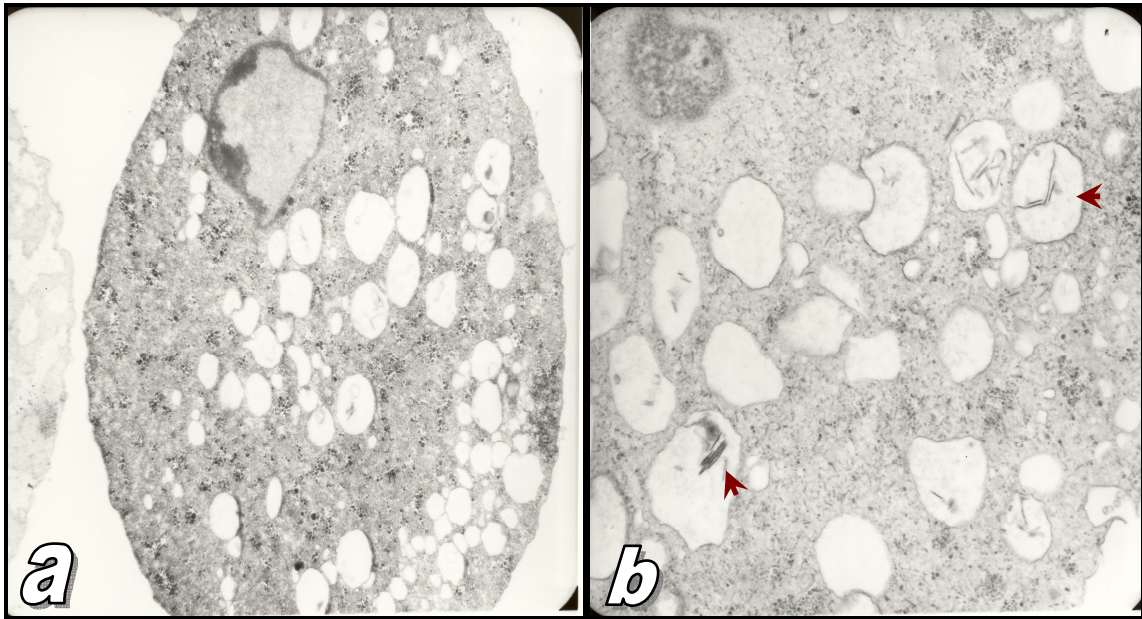
**Figura 35.** Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica (*E. dispar*). Observar restos de bactérias (bact) nos vacúolos fagocíticos. Bactérias são encontradas em contato direto com o citoplasma da célula (cabeças de seta). Numerosos grânulos de glicogênio podem ser observados dispersos pelo citoplasma (setas). Ampliação: (a) 6.000x, (b) 10.000x.



**Figura 36.** Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-ADO monoxênica (*E. dispar*). Observa-se restos de *C. fasciculata* dentro de um vacúolo fagocítico (cabeça de seta). Também observa-se aumento de glicogênio no citoplasma do parasito (setas). Ampliação: (a) e (b) 4.000x.



**Figura 37.** Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-EGG polixênica (*E. histolytica*). Bactérias podem ser encontradas no interior de vacúolos fagocíticos (setas), assim como debris resultantes da lise dessas bactérias (cabeça de seta). Ampliação: (a) e (b) 4.000x.



**Figura 38.** Eletromicrofotografia de trofozoítos da cepa ICB-Egg monoxênica (*E. histolytica*). Observa-se restos de *C. fasciculata* dentro de vacúolos fagocíticos (cabeça de seta). Ampliação: (a) 4.000x e (b) 8.000x.

---

## 6. DISCUSSÃO

---

### **6.1. Estudos *in vivo* - Cinética da Formação das Lesões Hepáticas em Hamsters**

A inoculação intra-hepática de trofozoítos em animais de experimentação é um procedimento útil para estudos de virulência e da resposta imune (Tsutsumi, 1984; Tsutsumi, 1988; Meerovitch & Chadee, 1988; Tsutsumi & Shibayama, 2006) embora não seja a via comum da chegada do parasito a este órgão. Em nossos modelos experimentais utilizou-se inicialmente a concentração de  $2,5 \times 10^5$  trofozoítos em 0,20mL de meio, inoculados em hamsters provenientes do biotério de criação do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG. Estes animais apresentavam aproximadamente 45 dias de idade e pesavam entre 90-100g. Quando trabalhamos com hamsters provenientes do biotério de criação do Centro de Investigação e Estudos Avançados (CINVESTAV) do Instituto Politécnico Nacional – México, esta relação foi aumentada para  $5,0 \times 10^5$  trofozoítos em 0,20mL de meio. O aumento da quantidade de trofozoítos administrada foi necessário para se conseguir um padrão de lesão hepática semelhante ao observado nos animais fornecidos pelo biotério de criação do ICB/UFMG. Isso se deve, provavelmente, a uma melhor alimentação dos animais provenientes do CINVESTAV, além do controle mais rigoroso do manejo e tratamento desses animais (como controle de temperatura, luminosidade, ecto e endoparasitos). A mudança dos reagentes que compõem o meio de cultivo também podem estar relacionados a alteração da virulência da cepa. No CINVESTAV, utilizamos soro comercial bovino (Gibco-Invitrogen Corp.), enriquecidos com vitaminas de Diamond (SAFC Biosciences), enquanto no ICB/UFMG utilizamos soro obtidos diretamente de sangue bovino, além de prepararmos a mistura de vitaminas para ser adicionada ao meio de cultivo. Dessa forma, o meio de cultivo utilizado em nosso laboratório no ICB/UFMG pode apresentar-se mais rico em nutrientes, o que acarretaria um aumento da virulência das cepas patogênicas, sendo necessário uma quantidade menor de trofozoítos para ocasionar lesões significativas.

---

A cepa HM1-IMSS é considerada uma cepa de referência de *E. histolytica* a nível mundial, sendo utilizada na maior parte das investigações sobre amebíase. Essa cepa foi isolada de la Torre et al. (1971), sendo desde então submetida a diversas condições de cultivo em diversos laboratórios, com o objetivo de manter a sua virulência e patogenicidade.

Utilizando a cepa HM1-IMSS, Tsutsumi et al. (1984) estudaram a sequência de eventos morfológicos durante a produção do abscesso hepático amebiano (AHA), desde o alojamento das amebas nos sinusóides hepáticos até a necrose extensa do fígado. Observaram que em tempos iniciais (1-12 horas) há um infiltrado de PMN rodeando os trofozoítos. Os hepatócitos próximos aos focos inflamatórios apresentaram mudanças degenerativas e foi raro observar o contato direto entre hepatócito e ameba. Depois de 12 horas de inoculação diminuíram os PMN, sendo substituídos por células mononucleares; com três dias de inoculação, observaram a presença de células epitelióides com formação de granulomas e áreas de necrose, que aumentaram progressivamente. Os autores concluíram que na formação do AHA, o dano ao tecido hepático não é por contato direto com os trofozoítos e sim, resultado da lise dos leucócitos e macrófagos presente ao redor das amebas, que liberam grandes quantidades de enzimas líticas ao meio e isto, indiretamente, afeta aos hepatócitos.

Em nosso trabalho foram utilizadas as cepas ICB-EGG de *E. histolytica* e ICB-ADO de *E. dispar* para o estudo da cinética das lesões, em cultivos monoxênico (com *C. fasciculata*) e polixênico, respectivamente.

A inoculação da cepa ICB-ADO polixênica resultou em lesões hepáticas graves, ultrapassando em 40% o peso total do órgão. Esse resultado nos levou a questionar os eventos celulares que antecedem a formação das lesões, culminando no estudo da cinética das lesões, como realizado anteriormente por Tsutsumi et al. (1984).

Na análise da sequência dos eventos celulares e histológicos apresentados pela inoculação da cepa ICB-ADO polixênica, algumas



---

diferenças foram observadas quando comparadas com o modelo descrito por Tsutsumi et al. (1984).

Em tempos iniciais (1-12hs.) também observou-se, microscopicamente, focos inflamatórios que tendem a aumentar de tamanho, porém o número de trofozoítos associados a esses focos foi pequeno, estando grande parte deles lisados. O aparecimento e predomínio de polimorfonucleares (PMN) caracterizou sempre os tempos curtos de infecção. Outro fato importante foi a presença de trofozoítos em contato direto com hepatócitos após seis horas de inoculação, sendo também encontrado 24 horas após o desafio amebiano. Este achado difere do modelo anteriormente descrito, indicando que a ameba pode estar lisando diretamente os hepatócitos com os quais está em contato e assim, contribuindo para o dano hepático ocasionado pela lise de células inflamatórias. Também não foram visualizados granulomas típicos conforme reportado por Tsutsumi et al., havendo sim uma reação inflamatória mais intensa na qual não há tempo para a formação do granuloma, resultando em extensas áreas necróticas. A medida que a lesão aumenta de tamanho, as áreas ocupadas por células inflamatórias lisadas são mais abundantes e extensas.

Outro fato observado foi a ausência de eritrócitos no interior dos trofozoítos de *E. dispar*, cepa ICB-ADO polixênica. Apesar da grande virulência dessa cepa, em nenhum dos tempos observados foram encontrados trofozoítos com eritrócitos fagocitados. Esse dado comprova a baixa capacidade de eritrofagocitose observada para essa cepa, reforçando a idéia de que esta propriedade, provavelmente, não está correlacionada diretamente com a virulência.

A cepa ICB-EGG monoxênica apresentou uma cinética de formação de lesões semelhante à descrita por Tsutsumi et al. e, assim como a cepa ICB-ADO polixênica, em tempos iniciais também observou-se uma hepatite focal e disseminada com focos de PMNs dispersos pelo parênquima hepático porém com amebas bem definidas e conservadas. Também não observamos a formação de abscessos hepáticos amebianos bem caracterizados, talvez pela rápida destruição e

---

necrose que essa cepa ocasiona no fígado de seu hospedeiro, não havendo tempo para a organização celular e posterior organização do granuloma amebiano.

Macroscopicamente, entre a primeira hora e 24 horas após a inoculação das amebas, observou-se pequenos pontos de cor branca no lóbulo inoculado, os quais originaram lesões extensas a partir de 48 horas após a inoculação dos trofozoítos. Devemos recordar que ambas as cepas foram recentemente isoladas (ICB-EGG – 1988; ICB-ADO – 1997) e pouco manuseadas desde então. Diferentemente da cepa HM1-IMSS, não é necessária a passagem constante da cepa ICB-EGG (*E. histolytica*) por fígado de hamster para manter a virulência. Esse diferencial pode explicar as diferenças encontradas entre as cepas, não estando as cepas ICB-EGG e ICB-ADO alteradas e adaptadas ao sistema imune do hospedeiro como ocorre com a HM1-IMSS.

Alguns estudos sugerem que trofozoítos de *E. histolytica* em cultivo polixênico poderiam sofrer mudanças moleculares, resultando em aumento da resistência a lise pelo complemento e/ou modificação de antígenos de superfície da ameba, alterando a capacidade do sistema imune de reconhecer e eliminar o parasito (Bhattacharya et al., 1992; Campos-Rodrigues & Jarillo-Luna, 2005). Este fato pode explicar a presença de trofozoítos da cepa ICB-ADO polixênica em contato direto com hepatócitos após seis horas de inoculação.

A inoculação das bactérias associadas ao cultivo polixênico da cepa ICB-ADO diretamente ao fígado de animais experimentais não resultou em lesões significativas, sendo observados pequenos focos inflamatórios periportais após sete dias, descartando assim sua ação direta sobre a formação das lesões.

---

## 6.2. Estudos *in vitro*

### 6.2.1. Eritrofagocitose

A eritrofagocitose é uma das mais destacadas atividades desempenhadas pelos trofozoítos de *E. histolytica* durante o processo invasivo de tecidos. Muitos autores discordam que essa atividade estaria correlacionada com a virulência de cepas de *E. histolytica*. Trissl et al. (1978) e Silva (1997) demonstraram que a atividade fagocítica em cepas virulentas é um processo mais rápido e eficiente que em cepas não virulentas. Orozco et al. (1983), utilizando clones de *E. histolytica* deficientes em fagocitose, demonstraram que esse isolado era incapaz de produzir abscessos hepáticos, mesmo com inóculos elevados. Estes pesquisadores ainda afirmaram que a fagocitose dependeria de outros fatores como condições de cultivo, pH, temperatura, presença de carboidratos e concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio de cultivo. Por sua vez, Montfort et al. (1992) descreveram cultivos de *E. histolytica* que, mesmo perdendo sua patogenicidade (como a capacidade de produzir abscesso hepático), ainda mantiveram um alto grau de eritrofagocitose. No mesmo ano, Tsutsumi et al. (1992) utilizando três linhas da cepa HM1-IMSS, afirmaram que a eritrofagocitose pode ser considerada somente como um marcador qualitativo da patogenicidade de cepas axênicas de *E. histolytica* e não um indicador quantitativo do grau de virulência *in vivo*.

Podemos afirmar, de acordo com os resultados obtidos em nossos experimentos, que a eritrofagocitose não se correlaciona diretamente com a virulência da cepa. Em nossos estudos a cepa ICB-452 monoxênica de *E. histolytica* foi a que apresentou maior quantidade de eritrócitos fagocitados (média de 12,78 aos trinta minutos), porém é uma cepa que não ocasiona lesões nos animais inoculados. Esse fato pode ser explicado pela presença constante de *C. fasciculata* no meio de cultivo, o que facilitaria a fagocitose de células maiores quando presentes, porém não ocasionaria aumento da virulência da cepa quando inoculada em animais de experimentação (Silva, 1997). Esse valor caiu

---

aproximadamente 50% quando utilizamos a cepa ICB-452 axênica (média de 5,81 aos trinta minutos), demonstrando assim a importância do tripanossomatídeo presente no meio de cultivo para a maior fagocitose. Essa mesma característica ainda pode ser observada nas cepas monoxênica e polixênica de ICB-EGG, ambas patogênicas para animais de experimentação. A cepa monoxênica com *C. fasciculata* apresentou uma média de 9,24 trofozoítos/ameba, enquanto a polixênica apenas 5,13.

Por outro lado, a cepa polixênica ICB-ADO de *E. dispar* apresentou uma baixa capacidade de eritrofagocitose (média de apenas 0,30 aos trinta minutos). Essa cepa ocasiona lesões severas em hamsters quando inoculada diretamente ao fígado dos animais, o que nos leva a questionar, novamente, o papel da associação bactérias/trofozoítos no cultivo polixênico.

Quando comparamos a porcentagem de trofozoítos que realizaram a fagocitose de eritrócitos humanos, observamos não haver diferenças significativas entre as cepas de *E. histolytica*, mesmo entre aquelas que fagocitaram menores quantidades de hemácias. Esses resultados, em conjunto, comprovam que a virulência da cepa não tem relação direta com o grau de eritrofagocitose apresentado pela mesma.

#### 6.2.2. Atividade Proteolítica em Géis de Poliacrilamida e Determinação Quantitativa da Atividade Proteolítica com Azure e Azocoll

Proteases são enzimas proteolíticas capazes de catalizar a degradação de ligações peptídicas em proteínas e peptídeos, amplamente encontradas nos reinos vegetal e animal. Entre as principais funções desempenhadas por essas enzimas podemos citar: invasão de tecidos do hospedeiro, facilitada pela degradação de tecidos conectivos; evasão do sistema imune através da degradação ou ativação de moléculas imunes do hospedeiro; mudanças morfológicas do parasito entre um estágio e outro; degradação de proteínas do citoesqueleto durante a invasão ou ruptura de células do hospedeiro (North et al., 1990).

---

Proteases liberadas por trofozoítos de *E. histolytica* podem ocasionar danos às células e tecidos, contribuindo para destruição dos tecidos do hospedeiro e invasão do mesmo pelo parasito (McKerrow, 1992). Estudos realizados por diversos autores identificaram cisteínaproteases como enzimas de maior atividade em *E. histolytica*, estando correlacionada com a virulência da cepa (Gadasi & Kobiler, 1983; Keene et al, 1986). Reed et al. (1989) observaram que pacientes com amebíase invasiva apresentavam anticorpos contra cisteínaprotease, correlacionando o nível de atividade dessa enzima com a severidade da doença ocasionada pelo parasito.

Com o objetivo de conhecer o perfil zimográfico das cepas ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* e ICB-ADO polixênica de *E. dispar*, foram confeccionados géis de poliacrilamida para observar possíveis diferenças entre os padrões proteolíticos dos extratos totais das duas cepas. Enquanto a cepa ICB-EGG monoxênica apresentou um perfil muito semelhante à cepa HM1-IMSS de *E. histolytica*, com um quadro de aproximadamente seis bandas de 25 a 112kDa, a cepa ICB-ADO apresentou um perfil bastante distinto, com somente duas bandas visíveis no gel de poliacrilamida (55 e 97kDa). Em ambos os casos, o efeito proteolítico foi parcialmente inibido pela adição de E-64, um inibidor de cisteínaprotease.

Apesar do menor número de bandas observadas nos géis de poliacrilamida, a cepa ICB-ADO polixênica, ao lado da cepa ICB-EGG polixênica, apresentou as maiores atividades proteolíticas tanto para os extratos totais, quanto para os meios condicionados, quando se utilizou Azure Hide Powder e Azocoll, substratos cromógenos para proteases. Esse foi um resultado surpreendente, uma vez que dados da literatura apontam a *E. dispar* como uma má secretora de proteases (Talamás-Rohana et al., 1999). Porém, devemos lembrar que a cepa de *E. dispar* utilizada por aqueles pesquisadores era uma cepa axênica (cepa SAW) incapaz de ocasionar lesões em animais experimentais.

Outro dado interessante surge quando comparamos as atividades proteolíticas das cepas monoxênica e polixênica ICB-EGG de *E. histolytica*. A cepa polixênica apresentou, assim como no caso da

---

cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*, uma maior capacidade de degradação dos substratos quando comparada à cepa monoxênica, novamente colocando em evidência o papel das bactérias presentes no meio de cultivo.

Muito se tem especulado sobre o papel que a bactéria exerce sobre os trofozoítos de *E. histolytica* mantidos em cultivo polixênico (Silva, 1997). Vários estudos têm proposto que a associação bactéria/*E. histolytica* tem um profundo efeito no comportamento da ameba, modulando mudanças fenotípicas e de suas propriedades de virulência (Bhattacharya et al., 1992; Spice & Ackers, 1993; Silva, 1997; Bhattacharya et al., 1998). Porém, estudos empregando cepas polixênicas de *E. dispar* são escassos na literatura científica (Furst et al., 2000; Costa et al., 2006) e, ainda mais raras, são as tentativas de tentar correlacionar ou explicar a influência das bactérias sobre essas cepas.

Trabalho publicado por Spice & Ackers (1993) demonstrou que cepas axênicas de *E. histolytica* produzem maiores quantidades de enzimas proteolíticas quando comparadas com cepas polixênicas. Em nosso estudo, utilizando substratos inespecíficos para proteases como Azure e Azocool, observamos que a atividade proteolítica da cepa polixênica de *E. histolytica* foi superior àquela das cepas axênica ou monoxênica com *C. fasciculata*. O mesmo se sucede com a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* onde, embora a comparação visual das bandas com a cepa HM1-IMSS nos géis de poliacrilamida esteja mais tênue, a atividade proteolítica com Azure e Azocool se mostrou mais forte, tanto com os extratos brutos quanto com os meios condicionados. Realmente, as bactérias parecem exercer uma pressão positiva na virulência das cepas, tanto de *E. histolytica* como de *E. dispar*. Enquanto Spice & Ackers se basearam apenas nas observações visuais obtidas das géis de poliacrilamida, nossos dados foram corroborados pela dosagem da atividade proteolítica e, embora apresentando um número menor de bandas nos géis, a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* apresentou uma maior atividade proteolítica quando comparada com a cepa HM1-IMSS.

---

Nossos estudos sugerem que a associação de algumas bactérias da flora bacteriana exerce um profundo efeito no comportamento fisiológico das amebas, influenciando suas propriedades de virulência. Estudos moleculares mais aprofundados têm que ser realizados, visando conhecer quais genes se tornam ativos na presença das bactérias que tornam possível uma maior expressão de sua virulência, principalmente nas cepas de *E. dispar*.

### 6.2.3. Efeito Citopático sobre Células MDCK e Medida da Resistência Transepitelial (R<sub>Te</sub>)

MDCK é uma linha epitelial de origem renal estabelecida em 1958 (Shannon, 1972) amplamente caracterizada quanto a suas propriedades morfológicas, bioquímicas e fisiológicas. Em geral, é similar a todo epitélio permeável de transporte e em particular ao epitélio intestinal. Assim sendo, e pelo fato de ter sido amplamente utilizada em estudos de relação parasito-hospedeiro em *E. histolytica* (Orozco et al., 1980; Orozco et al., 1982b), a escolhemos como modelo experimental para investigar o dano epitelial com trofozoítos de *E. histolytica* e *E. dispar*. A medida da resistência elétrica transepitelial (R<sub>Te</sub>) é uma técnica altamente sensível para detectar o dano inicial produzido pelos trofozoítos amebianos em células de cultivo (Orozco et al., 1982b). O dano à monocamadas celulares depende da cepa e da relação entre trofozoítos/células epiteliais que é utilizada.

Inicialmente, foi utilizada a proporção 2:1 de trofozoítos/células. Porém, observamos que ocorria a destruição da monocamada em tempos iniciais de interação (15 minutos). Invertendo a proporção para 1:2 trofozoítos/células foi possível observar a cinética da interação até uma hora pós-interação. Foi observado que as cepas HM1-IMSS e ICB-EGG monoxênica (ambas *E. histolytica* patogênicas) apresentaram grau semelhante de destruição nos tempos observados (15, 30 e 60 minutos). As cepas polixênicas ICB-ADO (*E. dispar*) e ICB-EGG (*E. histolytica*) apresentaram danos menores aos observados, porém não menos significativos. A adesão é uma propriedade importante e provavelmente

---

indispensável para a produção de dano celular por parte dos trofozoítos de *E. histolytica* (Ravdin & Guerrant, 1982; Silva, 1997). A presença das bactérias recobrando parte dos trofozoítos talvez possa explicar a menor destruição observada quando utilizamos cepas polixênicas. Destruição essa que foi ainda menor quando utilizada a cepa ICB-ADO monoxênica de *E. dispar*, que não apresenta bactérias associadas ao seu cultivo. Esse resultado reforça a idéia que somente a adesão não é suficiente para iniciar o processo lesivo, sendo necessário outros fatores para que o dano celular possa ter início. A comparação entre as cepas de *E. dispar* utilizadas novamente sugere a influência das bactérias na expressão de sua patogenicidade. Estes resultados demonstram uma nítida correlação entre o efeito citopático e a virulência das cepas. Trabalho semelhante foi realizado por Costa et al. (2006), porém com culturas de células VERO, obtendo valores menores de destruição tanto para a cepa ICB-ADO monoxênica quanto para a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*. Essas diferenças podem ser explicadas pela maior força de união entre as células VERO em monocamadas utilizadas pelos autores, uma vez que mesmo entre culturas diferentes de células MDCK isso pode ser observado. Com base nos resultados anteriores, se realizou a medida da resistência transepitelial das monocamadas de células MDCK, visando determinar a perda da integridade funcional do epitélio que ocorre, primeiramente, através das aberturas dos espaços intercelulares devido à separação gradual das células adjacentes após a adição dos trofozoítos. Através dos registros eletrofisiológicos da RTe foi possível observar que os danos ocasionados pelos trofozoítos foram progressivos através do tempo e máximos para as cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* após uma hora de interação, com exceção da cepa ICB-ADO monoxênica de *E. dispar*. Trabalhos realizados por Espinosa-Cantellano et al. (1998), utilizando uma cepa axênica de *E. dispar* (SAW) demonstraram que trofozoítos dessa cepa apresentam um discreto efeito citopático sobre células MDCK, demorando o dobro do tempo observado para cepas virulentas de *E. histolytica* para romper a resistência transepitelial da monocamada de células MDCK. Esse fato também foi observado em



---

nossos experimentos, tanto para a cepa ICB-ADO monoxênica (avirulenta) como para a cepa ICB-ADO polixênica (virulenta) de *E. dispar*, porém a cepa monoxênica não conseguiu abolir totalmente a resistência transepitelial após 60 minutos.

#### 6.2.4. Imunohistoquímica

Diversos autores demonstraram que moléculas de *E. histolytica* como proteases (Que & Reed, 1997; Talamas-Rohana et al., 1999), proteínas formadoras de poros – amebaporos (Leippe, 1997), adesinas (Arroyo & Orozco, 1987), lectinas (Petri et al. 1990) e collagenases (Muñoz et al., 1982) podem participar na agressão hepática e contribuir para a formação do abscesso amebiano. Trabalho realizado por Ventura-Juaréz et al. (2002) confirmou que moléculas liberadas por trofozoítos de *E. histolytica* podem causar danos hepáticos em animais de laboratório. Em seu trabalho, as 3, 6, 12 e 24 horas pós-inoculação, foi possível detectar moléculas liberadas por trofozoítos formando um padrão radial até as células vizinhas, sendo detectadas em PMNs e hepatócitos vizinhos às áreas de necrose. Essas moléculas difundidas causariam efeitos citotóxico e inflamatório induzindo a secreção de enzimas ou citocinas inflamatórias em outras células como leucócitos, macrófagos e células endoteliais. Pensamos que a cepa polixênica de *E. dispar*, por ser uma cepa que ocasiona extenso dano hepático, também apresentasse essa característica. Porém, embora os trofozoítos tenham se marcado pela imunoperoxidase, o mesmo não ocorreu com as células endoteliais e PMNs, não havendo assim difusão de antígenos de extrato total como observado para cepas de *E. histolytica*. Desta forma, observamos que o comportamento da cepa ICB-ADO de *E. dispar* é diferente do observado para *E. histolytica*. Podemos propor que, apesar de existirem grandes quantidades de proteases, como observado nos experimentos anteriores, há pequenas quantidades de lectina, amebaporos e de outras moléculas que possam ativar células inflamatórias e assim destruir o tecido hepático. Devemos considerar também que, como proposto por Tsutsumi et al. (1984), as bactérias

---

presentes no cultivo polixênico poderiam ser um fator atrativo de células inflamatórias, as quais contribuiriam para o desenvolvimento da lesão, propiciando um ambiente adequado para a multiplicação dos trofozoítos e progressão das lesões.

### 6.3. Estudos de Ultraestrutura

Espinosa-Cantellano et al. (1998) através de estudos ultraestruturais comparativos entre *E. histolytica* e *E. dispar*, ambas as cepas obtidas de cultivos axênicos, demonstraram existir diferenças morfológicas entre as duas espécies: através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) observaram que trofozoítos de *E. histolytica* apresentavam-se mais arredondados e com uróide pouco frequente; trofozoítos de *E. dispar*, por sua vez, apresentavam-se mais alongados, com a região anterior rica em pseudópodes e uróide geralmente bem visível. Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), estes autores observaram que em trofozoítos de *E. histolytica* a membrana plasmática apresentava-se uniforme, com vacúolos distribuídos uniformemente por todo o citoplasma e núcleo com cromatina mais espessa, enquanto trofozoítos de *E. dispar* possuíam uma membrana plasmática interrompida em diferentes áreas, com uma pequena quantidade de vacúolos concentrados em algumas regiões citoplasmáticas e núcleo com cromatina menos densa, além da existência de áreas no citoplasma contendo largos depósitos de grânulos de glicogênio. Pimenta et al. (2002) estudaram, através da MET, as interações entre cepas de *E. histolytica* (SAW 755 CR, zimodema XIV) e *E. dispar* (SAW 760RR, zimodema I) com bactérias originais da flora intestinal do hospedeiro: em *E. dispar* observaram vacúolos contendo não mais de uma bactéria, além da presença de bactérias em contato direto com o citoplasma amebiano. Algumas bactérias se encontravam em processo de digestão, enquanto outras pareciam estar se dividindo no interior dos vacúolos. Em *E. histolytica*, os vacúolos observados frequentemente tinham mais de uma bactéria, além de não serem observadas bactérias em contato

---

direto com o citoplasma do parasito. Outro dado observado por esses autores foi o maior número de vacúolos em *E. histolytica*, quando comparada com a cepa de *E. dispar*.

Gonzalez-Robles & Martinez-Palomo (1992) demonstraram que trofozoítos da cepa HM1-IMSS apresentavam filopódios basais escassos se localizando fundamentalmente na região do uróide, sendo que o resto da superfície celular apresentava poucas prolongações filiformes.

Através da MEV observamos que as cepas ICB-ADO monoxênica e polixênica de *E. dispar* também apresentaram-se com trofozoítos mais alongados que aqueles obtidos das cepas ICB-EGG de *E. histolytica*. Os trofozoítos das cepas polixênicas possuíam mais filopódios que aqueles provenientes de cultivos monoxênicos. Utilizando a MET, observamos que trofozoítos oriundos de cultivos polixênicos apresentavam um menor número de vacúolos citoplasmáticos, sejam eles da espécie *E. histolytica* ou *E. dispar*. Ao contrário do reportado por Espinosa-Cantellano et al. (1998), não observamos diferenças quanto à quantidade de vacúolos entre as cepas monoxênicas de *E. histolytica* ou de *E. dispar* estudadas, talvez pelo fato destas cepas serem cultivadas monoxênicamente com o tripanossomatídeo *C. fasciculata*; porém, como relatado por estes autores, observamos também nas cepas ICB-ADO de *E. dispar* estudadas, áreas no citoplasma com maior quantidade de depósitos de glicogênio, quando comparadas com as cepas ICB-EGG de *E. histolytica*. Cepas polixênicas também apresentaram um núcleo com cromatina menos densa e organizada.

Finalmente os autores reconhecem que embora a *E. dispar* esteja bem caracterizada com uma espécie distinta através de estudos de biologia molecular e bioquímicos, alguns aspectos de sua patogenicidade e virulência necessitam de novos estudos. Pesquisas com um maior número de cepas isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas bem caracterizadas são necessárias. Outro aspecto intrigante que merece novos estudos é a interação entre determinadas cepas de *E. dispar* e alguns tipos de bactérias presentes na flora original do hospedeiro e mantidas em cultivo polixênico.

---

## 7. CONCLUSÕES

- 
1. Nas inoculações experimentais em fígado de hamsters, as cepas HM1-IMSS e ICB-EGG monoxênica de *E. histolytica* apresentam um padrão semelhante de lesões; a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* apresenta um desenvolvimento mais lento e gradual das lesões, porém não menos agressivo aos sete dias pós-inoculação.
  2. Em experimentos de eritrofagocitose, a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar* apresenta índice de fagocitose significativamente menor que o observado para as cepas HM1-IMSS, ICB-EGG e ICB-452 de *E. histolytica*, independente da virulência dessas cepas.
  3. As cepas polixênicas ICB-ADO de *E. dispar* e ICB-EGG de *E. histolytica* apresentam uma maior atividade proteolítica quando comparadas com culturas monoxênicas com *Crithidia fasciculata* e axênicas. A ação proteolítica é parcialmente inibida pela adição de E-64 e PHMB, inibidores para cisteínaprotease.
  4. A cepa ICB-ADO de *E. dispar* ocasiona a destruição e a queda da medida da resistência transepitelial de células MDCK em monocamadas de forma mais lenta e gradual que as cepas de *E. histolytica* estudadas.
  5. Em inoculações experimentais intra-hepáticas em hamsters com a cepa ICB-ADO polixênica de *E. dispar*, não ocorre difusão de antígenos amebianos.
  6. Estudos ultraestruturais com as cepas ICB-ADO de *E. dispar* e ICB-EGG de *E. histolytica* foram semelhantes aos já existentes na literatura, porém verificamos que as cepas em cultivo polixênico apresentam um núcleo com cromatina menos densa e organizada.
  7. A presença de *E. coli* e *Shigella sp.* no cultivo polixênico de *E. dispar* demonstrou ser um fator importante na modulação da virulência da cepa ICB-ADO.

---

## **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ACUNA-SOTO, R.; SAMUELSON, J.; De GIROLAMI, P.; ZARATE, L.; MILLAN-VELASCO, F.; SCHOOLNICK, G. & WIRTH, D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **48**: 58-70, 1993.

ANAYA-VELAZQUEZ, F.; PADILLA-VACA, F.; BARRIOS-RODILES, M.; VACA-CHAVES, A. & GONZALEZ-ROBLES, A. Selective interaction of *Entamoeba histolytica* with lactobacilli and other intestinal bacteria. **Arch. Med. Res.**, **28**: 195-196, 1997.

ARAUJO, C.F. & FERNANDEZ, C.L. Prevalence of intestinal parasitosis in the city of Eirunepe, Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **38**: 69, 2005.

ARROYO, R. & OROZCO, E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. **Mol. and Biochem. Parasitol.**, **23**: 151-158, 1987.

BAILEY, G.B.; NUDELMAN, E.D.; DAY, D.B.; HARPER, C.F. & GILMOUR, J.R. Specificity of glycosphingolipid recognition by *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Infect. Immun.**, **58**(1): 43-47, 1990.

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

BARBOUR, G.L. & JUNIPER, K. Jr. A clinical comparison of amebic and pyogenic abscess of the liver in sixty-six patients. **Am. J. Med.**, **53**(3): 323-334, 1972.

BHATTACHARYA, A.; GHILDYAL, R.; PRASAD, J.; BHATTACHARYA, S. & DIAMOND L.S. Modulation of cell surface antigens of *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. **Infect. Immun.**, **60**: 711-713, 1992.

BHATTACHARYA, A.; ANAND, M.T.; PAUL, J.; YADAV, N. & BHATTACHARYA, S. Molecular changes in *Entamoeba histolytica* in response to bacteria. **J. Euk. Microbiol.**, **45**: 28-33, 1998.

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

---

BLANC, D.S. Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* zymodemes using isoenzyme analysis. **J. Protozool.**, **39**: 471-479, 1992.

BOECH, W.C. & DRBOHLAV, J. The cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Am. J. Hyg.**, **5**: 371-407, 1925.

BOUVIER, J.; BORDIER, C.; VOGEL, H.; REICHEL, R. & ETGES, R. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **37**: 235-245, 1989.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.

BRAGA, L.L.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C.A.; SALES, A.; CAVALCANTE, A.L. & MANN, B.J. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, **36**: 3044-3045, 1998.

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

BRUMPT, E. Étude sommaire de l'*Entamoeba dispar* n. sp. Amibe à kystes quadrinucléés, parasite de l'homme. **Bull. Acad. Med. (Paris)**, **94**: 943-952, 1925.

CALDERON, J.; De LOURDES MUÑOZ, M. & ACOSTA, H. M. Surface redistribution and release of antibody-induced caps in entamoebae. **J. Exp. Med.**, **151**(1): 184-93, 1980.

CALIARI, M.V. Princípios de morfometria digital: KS 300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997. 149p.

CAMPBELL, D. & CHADEE, K. Survival strategies of *Entamoeba histolytica*: Modulation of cell-mediated immune responses. **Parasitology Today**, **13**: 184-189, 1997.

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

CARVALHO, M.G.; GUIMARÃES, S. & SILVA, E.F. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in individuals with intestinal amoebiasis



---

presenting cysts and/or trophozoites in the feces. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, **33**: 379-83, 1991.

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

CHADEE, K.; JOHNSON, M.L.; OROZCO, E.; PETRI, W.A. & RAVDIN, J.L. Binding and internalization of rat colonic mucins by the galactose/N-acetyl-D-galactosamine adherence lectin of *E. histolytica*. **J. Infect. Dis.**, **158**: 398-406, 1988.

CHAVES, L.C. Abcesso amebiano do fígado. In: Tópicos em gastroenterologia. Castro, L.P.; Rocha, P.R.S. & Cunha, A.S. - Belo Horizonte, Medsi, 1991, p 317-332.

CHAVEZ, A.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. & de la TORRE, M. Ultramicroscopic structure of the cyst wall of *Entamoeba invadens*, *E. histolytica* and *E. coli*. **Arch. Invest. Med.**, **9**: 113-116, 1978

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTANON, G. & MARTINEZ-PALOMO, A. Ultrastructural evidence of smooth endoplasmic reticulum and golgi-like elements in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Arch. Med. Res.**, **31**: S165-167, 2000.

CLARK, C.G. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. **J. Eukar. Microbiol.**, **42**: 590-593, 1995.

CLARK, C.G. *Entamoeba dispar*, an organism reborn. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **92**: 361-364, 1998.

CLEVELAND, L.R. & SANDERS, E.P. The virulence of a pure line and several strains of *Entamoeba histolytica* for the liver of cats and the relation of bacteria, cultivation, and liver passage to virulence. **Am. J. Hyg.**, **12**: 569-571, 1930.

CORTEZ-MENDONZA, E. "Of 728 cases of Amoebiasis in Colombia". **Rev. Fac. Med. Bogotá**, **24**: 779-784, 1956.

COSTA, A.O.; VIANA, J.C.; ASSIS, D.; ROCHA, O.A. & SILVA, E.F. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. **Arch. Med. Res.**, **31**: S247-S248, 2000.

COSTA, A.O. Aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares de *Entamoeba dispar* submetida a diferentes condições de cultivo em comparação com a *E. histolytica*. Belo Horizonte : Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2001. 128p. (Tese de Doutorado).

---

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

COUNCILMAN, W.T. & LAFLEUR, H.A. Amoebic dysentery. **Bull. Johns Hopkins Hosp. Rept.**, **2**: 395-548, 1891.

CRAIG, C.F. The classification of the parasitic amebae of man. **J. Med. Res.**, **35**: 425, 1917.

CREVENNA, P.B.; CRUZ DE SOUZA, L. & DEL CARMEM VELASCO, M. Prevalence of amebic infection in different sexes, ages and social classes of Mexico City by means of indirect hemagglutination. **Rev. Invest. Salud Publica**, **32**: 68-80, 1972.

CUNHA, A.S.; SILVA, E.F.; RASO, P. & MELLO, S.M. Pathogenesis of amebiasis. 1. Clinical aspects of amebiasis in Brazil. Study of 3 groups of population of 3 different geographic regions. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **19**: 289-300, 1977.

CUNNINGHAM, D.D. *A report on cholera*. Calcutta (From: Ann. Rept. Of Sanitary Commissioners with gout of Indian) 1871. Apud: Dobell, C. "The Amoebae living in man, 1919".

D'ANTONI, J.S. Concepts and misconceptions in amebiasis. **Am. J. Trop. Med.**, **1**: 146-154, 1952.

De la TORRE, M.; de la HOZ-COUTURIER, R.; LANDA, L. & SEPÚLVEDA, B. Cultivos axênicos de *Entamoeba histolytica*. **Arch. Invest. Med.**, **2**: 165-172, 1971.

DE MENEZES, L.F.M. *Aspectos da amebíase intestinal e hepática no Hospital Universitário Getúlio Vargas, Manaus-AM*. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG – Dissertação de Mestrado em Parasitologia, 98p, 1986.

DIAMOND, L.S. Amebiasis: a problem solved. What now? **Arch. Med. Res.**, **23(4)**: 157-161, 1992.

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

DOBELL, C. *The amoebae living in man*. John Bale, Sons & Danielsson LTD., London, 1919, 168p.

---

DODSON, J.M.; CLARK, C.G.; LOCKHART, L.A.; LEO, B.M.; SCHROEDER, J.W. & MANN, B.J. Comparison of adherence, cytotoxicity and Gal/GalNAc lectin gene structure in *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Parasitol. International**, **46**: 225-235, 1997.

ELSDON-DEW, R. The epidemiology of amoebiasis. **Adv. Parasitol.**, **6**: 1-62, 1968.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; CASTAÑON, G. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. *In vivo* pathogenesis of *Entamoeba dispar*. **Arch. Med. Res.**, **28(Suppl.)**: 204-206, 1997.

ESPINOSA-CANTELLANO, M.; GONZALEZ-ROBLES, A.; CHAVEZ, B.; CASTAÑON, G.; ARGÜELLO, C.; LAZARO-HALLER, A. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. **J. Eukar. Microbiol.**, **45(3)**: 265-272, 1998.

ESPINOSA-CANTELLANO, M. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clin. Microbiol. Review**, **13(2)**: 318-331, 2000.

FAUST, E.C.; HEILBRUNN, I.; LEWIS, R. & MURRAY, M.L. Differences in culturability, infectivity and pathogenicity of human strains of *Entamoeba histolytica*. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **63**: 270-276, 1946.

FURST, C.; GOMES, M.A.; TAFURI, W.L. & SILVA, E.F. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. **Pathologica**, **94(1)**: 22-27, 2000.

GADASI, H. & KOBILER, D. *Entamoeba histolytica*: correlation between virulence and content of proteolytic enzymes. **Exp. Parasitol.** **55**: 105-110, 1983.

GATHIRAM, V. & JACKSON, T.F.H.G. A longitudinal study of asymptomatic carriers of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*. **S. Afr. Med. J.**, **72**: 669-672, 1987.

GONZALEZ-ROBLES, A. & MARTINEZ-PALOMO, A. Morfología de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* en substratos naturales. Estudio mediante microscopía electrónica de barrido. **Arch. Invest. Méd.**, **13**: 145-157, 1982.

GONZALEZ-ROBLES, A. & MARTINEZ-PALOMO, A. Scanning electron microscopy of attached trophozoites of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **J. Protozool.**, **30(4)**: 692-700, 1983.

---

GONZALEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R. & REHMAN, T. Diagnosis of amebic dysentery by detection of *Entamoeba histolytica* fecal antigen by an invasive strain-specific, monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, **32(4)**: 964-970, 1994.

GRIFFIN, J.L. & JUNIPER, K. Ultrastructure of *Entamoeba histolytica* from human amebic dysentery. **Arch. Pathol.**, **91(3)**: 271-280, 1971.

GUERRANT, R.L. The global problem of amebiasis: current status, research needs and opportunities for progress. **Rev. Infect. Dis.**, **8(2)**: 218-227, 1986.

HAQUE, R.; KRESS, K. & WOOD, S. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. **J. Infect. Dis.**, **167**: 2476-2479, 1993.

HAQUE, R.; HUSTON, C.D.; HUGHES, M.; HOUP, E. & PETRI, W.A. Amebiasis. **N. Engl. J. Med.**, **348**: 1565-1573, 2003.

HEUSSEN, C. & DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrate. **Analytical Biochem.**, **102**: 196-202, 1980.

HOARE, C.A. Considerations sur l'etiologie de l'amibiase d'apres le rapport hote-parasite. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **54(3)**: 429-441, 1961.

KARTULIUS, S. Zur Aetiologie der Dysenterie in Aegypten. **Arch. F. Path. Anat.**, **105**: 521-531, 1886.

KEENE, W.E.; PETITT, M.G.; ALLEN, S. & MCKERROW, J.H. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.**, **163**: 536-549, 1986.

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

KETTIS, A. A. & SUNDQVIST, K. G. Dynamics of the interaction between *Entamoeba histolytica* and components of the immune response. I. Capping and endocytosis; influence of inhibiting and accelerating factors; variation of the expression of surface antigens. **Scand. J. Immunol.**, **7(1)**: 35-44, 1978.

---

KÖCH, R. & GRAFFKI, G. Bericht über die Thatigkeit der zur Erforschung der Cholera im Jahre 1883 nach Egypten und Indien entsandten Kommission. **Arbeit. Kaiserlichen Gesundheitsamte**, 1887.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **277**: 680-685, 1970.

LAMBL, W. Beobachtungen und studien aus den Gebiete der pathologischen Anatomic Und Histologie Aus dem Franz Josef-Kinder-Spitale in Prag (Loschner & Lambl) I Theil, sect XIII(6). "**Zur Pathologie des Darms**", **365**. 1860. In: Dobell, C. "The Amoebae living in man, 1919".

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

LEROY, A.; LAUWAET, T.; BRUYNE, G.; CORNELISSEN, M. & MAREEL, M. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. **FASEB J.**, **14**: 1139-1146, 2000.

LÖSH, F. Massenhafte Entwicklung von Amoeben in Dickdarm. **Arch. F. Path. Anat.**, **65**: 196-211, 1875. Apud: Kean, B.H.; Mott, Q.E. & Russel, A. **J. Trop. Med. Parasit. Classic Investigations**, **1**: 71-79, 1978.

LYNCH, E. C.; ROSEMBERG, I. M. & GITLER, C. An ion-channel forming protein produced by *Entamoeba histolytica*. **EMBO J.**, **1**(7): 801-804, 1982.

MARTÍNEZ-PALOMO, A.; GONZALEZ-ROBLES, A. & de la TORRE, M. Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by Con-a. **Nature New Biol.**, **245**(145): 186-187, 1973.

MARTÍNEZ-PALOMO, A. The biology of *Entamoeba histolytica*. Chichester, Research Studies Press, 161p, 1982.

MARTÍNEZ-PALOMO, A.; GONZALEZ-ROBLEZ, A., CHAVEZ, B.; OROZCO, E.M.; FERNANDEZ-CASTELO, S. & CERVANTES, A. Structural bases of the cytolytic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J. Protozool.**, **32**(1): 166-175, 1985.

MARTÍNEZ-PALOMO, A. & ESPINOSA-CANTELLANO, M. Amoebiasis: new understanding and new goals. **Parasitol. Today**, **14**: 1-3, 1988.

MARTÍNEZ-PALOMO, A.; TSUTSUMI, V.; ANAYA-VELÁSQUEZ, F. & GONZALEZ-ROBLES, A. Ultrastructure of experimental intestinal invasive amebiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **41**: 273-279, 1989.

---

McKERROW, J.H.; NEWPORT, G. & FISHELSON, Z. Recent insights into the structure and function of a larval proteinase involved in host infection by a multicellular parasite. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, **197(2)**: 119-124, 1991.

McKERROW, J.H. Pathogenesis in amebiasis: is it genetic or acquired? **Infect. Agent. Dis.**, **1**: 11-14, 1992.

McKERROW, J.H.; SUN, E.; ROSENTHAL, P.J. & BOUVIER, J. The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. **Annu. Rev. Microbiol.**, **47**: 821-853, 1993.

MEEROVITCH, E. & CHADDE, K. In vivo models for pathogenicity in amebiasis. In: Ravdin, J.I., ed. **Amebiasis. Human infection by *Entamoeba histolytica***. New York: John Wiley & Sons; pp. 177-190, 1988.

MIRELMAN, D.; BRACHA, R. & SARGEAUNT, P.G. *Entamoeba histolytica*: Virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites. **Exp. Parasitol.**, **57**: 172-177, 1984.

MONTFORT, I.; OLIVOS, A. & PÉREZ-TAMAYO, R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **Arch. Med. Res.**, **23**: 177-179, 1992.

MUÑOZ, A.A.; CALDERÓN, J. & ROJKIND, M. The collagenase of *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.**, **155**: 42-51, 1982.

MUÑOZ, A.A.; CABALLEIRA, A.A.; GUERRA-VALES, J.M.; CASTEL, E.V.R. & TELLACHE, A.P. Amebiasis invasiva. I. Etiología, patogenia, epidemiología y transmisión. Amebiasis intestinal y sus complicaciones. **Rev. Clin. Española**, **176 (5)**: 215-220, 1985.

NORTH, M.J.; MOTTRAM, J.C. & COOMBS, G.H. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. **Parasitol. Today**, **6**: 270-275, 1990.

OLIVOS-GARCIA, A.; TELLO, E.; NEQUIZ-AVENDAÑO, M.; GONZÁLEZ-CANTO, A.; LÓPEZ-VANCELL, R.; GARCÍA DE LEÓN, M.C.; MONTFORT, I. & PÉREZ-TAMAYO, R. Cysteine proteinase activity is required for survival of the parasite in experimental acute amoebic liver abscess in hamsters. **Parasitology**, **129**: 19-25, 2004.

OROZCO, M.E.; MARTINEZ-PALOMO, A. & GUARNEROS, G. Virulencia y propiedades de superficie de varias cepas axénicas de *Entamoeba histolytica*. **Arch. Invest. Méd.**, **11**: 153-158, 1980.

OROZCO, M.E.; GAURNEROS, G. & MARTINEZ-PALOMO, A. Clones of *E. histolytica* deficient in phagocytosis present a deficiency in virulence. **Arch. Invest. Med.**, **3**: 137-143, 1982a.

---

OROZCO, M.E.; FERNANDEZ-CASTELO, S. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. Detección del daño celular temprano producido por *Entamoeba histolytica* sobre epitelios. **Arch. Invest. Med.**, **13**: 169-175, 1982b.

OROZCO, M.E.; GUARNEROS, G.; MARTINEZ-PALOMO, A. & SANCHEZ, T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. **J. Exp. Med.**, **158**: 1511-1521, 1983.

PEREZ-TAMAYO, R. Pathology of amebiasis. In: Martínez-Palomo, A. ed. *Amebiasis – Human Parasitic Diseases*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 45-94, 1986.

PETRI, W.A. & RAVDIN, J.I. Cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*: the role of amebic adherence and contact-dependent cytolysis in pathogenesis. **Eur. J. Epidemiol.**, **3(2)**: 123-136, 1987.

PETRI, W.A.; JACKSON, T.F.H.G.; GATHIRAM, V.; KREWSS, K.; SAFFER, L.D.; SNOGDGRASS, T.L.; CHAPMAN, M.D.; KEREN, Z. & MIRELMAN, D. Pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* can be differentiated by monoclonal antibodies to the galactose-specific adherence lectin. **Infect. Immun.**, **58**: 1802-1806, 1990.

PETRI, W.A. & RAVDIN, J.I. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **Infect. Immun.**, **59(1)**: 97-101, 1991.

PETRI, W.A. & SINGH, U. State of art: diagnosis and management of amebiasis. **Clin. Infect. Dis.**, **29**: 1117-1125, 1999.

PHILLIPS, B.P. Studies on the cultivation of *Entamoeba histolytica* with *Trypanosoma cruzi*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **56(5)**: 1028-1032, 1953.

PIMENTA, P.F.P.; DIAMOND, L.S. & MIRELMAN D. *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925: Differences in their Cell Surfaces and in the Bacteria-containing Vacuolos. **J. Eukar. Microbiol.**, **49**: 209-219, 2002.

PINHEIRO, S.M.; CARNEIRO, R.M.; ACA, I.S.; IRMAO, J.I.; MORAIS, M.A.; COIMBRA, M.R. & CARVALHO, L.B. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **70**: 221-224, 2004.

PITTMAN, F.E.; EL-HASHIMI, W.K. & PITTMAN, J.C. Studies of human amebiasis. II. Light and electron-microscopic observations of colonic mucosa and exudate in acute amebic colitis. **Gastroenterology**, **65(4)**: 588-603, 1973.

---

PROCTOR, E.M. & GREGORY, M.A. Ultrastructure of cysts of *Entamoeba histolytica*. **Int. J. Parasitol.**, **3**: 455-456, 1973.

PROWAZEK, S.V. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Entamoeben. **Arch. F. Protistenk.**, **26**: 241-249, 1912.

PROWAZEK, S.V. Weiterer Beitrag zur Kenntnis der Entamoeben. **Arch. F. Protistenk.**, **26**: 241-249, 1912.

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

QUE, X. & REED, L. Cysteine Proteinases and the Pathogenesis of Amebiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **13**: 196-206, 2000.

QUINCKE, H. & ROOS, E. Ueber Amöben-Enteritir. **Klin. Wchenschr.**, **30**: 1089, 1893.

RAVDIN, J.I. & GUERRANT, R.L. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.**, **152**: 377-390, 1980.

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

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

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

REED, S.L. Amebiasis: an update. **Clin. Infect. Dis.**, **14**: 385-393, 1992.

REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, **17**: 208-213, 1963.

ROSALES-ENCINA, J.L.; MEZA, I.; TALAMÁS-ROHANA, P. & ROJKIND, M. Isolation of a 220-Kilodalton protein with lectin properties from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. **J. Infect. Dis.**, **156**: 790-797, 1987.

ROSENTHAL, P.J.; KIM, K.; MCKERROW, J.H. & LEECH, J.H. Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. **J. Exp. Med.**, **166**: 816-821, 1987.



---

SARGEAUNT, P.G. & WILLIAMS, J.E. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **72**: 519-554, 1978.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E. & NEAL, R.A. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9, etc.), "E. histolytica-like" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **74(4)**: 469-474, 1980.

SARGEAUNT, P.G.; JACKSON, T.F.H.G. & SIMJEE, A.E. Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. **Lancet**, **1**: 1386-1388, 1982.

SARGEAUNT, P.G. Zymodemes expressing possible genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **79(1)**: 86-89, 1985.

SARGEAUNT, P.G. "*Entamoeba histolytica*" is a complex of two species [letter]. **Trans. R. Soc. Trop. med. Hyg.**, **86(6)**: 167-172, 1986.

SCHAUDIN, F. Untersuchungen über die Fortpflanzung einiger Rhizopoden. **Arbeit. Kaiserlichen Gesundheitsamte**, **19**: 547-576, 1903.

SERRANO-LUNA, J. de J.; CERVANTES-SANDOVAL, I.; CALDERON, J.; NAVARRO-GARCIA, F.; TSUTSUMI, V. & SHIBAYAMA, M. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. **Can. J. Microbiol.**, **52(1)**: 16-23, 2006.

SHANNON, J.E. (ed.): The american type culture collection registry of animal cell lines, Rockville, 1972.

SILVA, E.F.; GOMES, M.A. & BARRAL DE MARTINEZ, A.M. *Entamoeba histolytica*: axenization and characterization of isolated samples from asymptomatic and asymptomatic patients from different regions of Brazil. **Arch. Med. Res.**, **28**: 288-289, 1997.

SILVA, E.F. *Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade "in vivo" e "in vitro"., Belo Horizonte : Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 384p., 1997. (Tese de Doutorado)

SPICE, W.M. & ACKERS, J.P. The amoeba enigma. **Parasitol. Today**, **8(12)**: 402-406, 1992.

---

SPICE, W.M. & ACKERS, J.P. Influence of bacteria on electrophoretic proteinase patterns of *Entamoeba histolytica* isolates. **Int. J. Parasitol.**, **23**: 671-674, 1993.

STANLEY, S.L. Amoebiasis. **Lancet**, **361**: 1025-1034, 2003.

STAUFFER, W. & RAVDIN, J.I. *Entamoeba histolytica*: an update. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, **16**: 479-485, 2003.

STOSSEL, T.P. Phagocytosis. **N. Engl. J. Med.**, **290(13)**: 717-723, 1974.

STRACHAN, W.D.; CHIODINI, P.L.; SPICE, W.M.; MODDY, A.H. & ACHERS, J.P. Immunological differentiation of pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. **Lancet**, **12(1)**: 561-563, 1988.

SUBRAMANIAN, R. Amebiasis. Extraintestinal manifestation. **J. Assoc. Physicians India**, **16(5)**: 291-294, 1968.

TACHIBANA, H.; KOBAYASHI, S.; TAKEKOSHI, M. & IHARA, S. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, **164**: 825-826, 1991.

TAKEUCHI, A. & PHILLIPS, B.P. Electron microscope studies of experimental *Entamoeba histolytica* infection in the guinea pig. I. Penetration of the intestinal epithelium by trophozoites. [Am. J. Trop. Med. Hyg.](#), **24(1)**: 34-48, 1975.

TALAMÁS-ROHANA, P.; AGUIRRE-GARCÍA, M.M.; ANAYA-RUIZ. & ROSALES-ENCINA, J.L. *Entamoeba dispar* contains but does not secrete acid phosphatase as does *Entamoeba histolytica*. **Exp. Parasitol.**, **92**: 219-222, 1999.

TANNICH, E.; HORSTMANN, R.D.; KNOBLOCH, J. & ARNOLD, H.H. Genomic DNA differences between pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, **86(13)**: 5118-5122, 1989.

TANNICH, E. & BURCHARD, G.D. Differentiation of pathogenic from nonpathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis of a single gene amplified *in vitro*. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 250-255, 1991.

TANNICH, E.; BRUCHAUS, I; WALTER, R.D. & HORSTMANN, R.D. Pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*: identification and molecular cloning of an iron-containing superoxide dismutase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **49**: 61-72, 1991.

---

TORIAN, B.E.; LUKEHART, S.A. & STAMM, W.E. Use of monoclonal antibodies to identify, characterize, and purify a 96,000-Dalton surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **J. Infect. Dis.**, **156**: 334-343, 1987.

TRISSEL, D.; MARTÍNEZ-PALOMO, A; ARGUELLO, C.; de la TORRE, M. & de la HOZ, R.. Surface properties related to concavalin A-induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. **J. Exp. Med.**, **145**: 652-665, 1977.

TRISSEL, D.; MARTÍNEZ-PALOMO, A.; de la TORRE, M.; de la ROZ, R. & SUAREZ, P. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **J. Exp. Med.**, **148(5)**: 1137-1143, 1978.

TRUDEL, P. & GICQUAUD, C. Endocytosis of liposomes by *Entamoeba histolytica* and transport of encapsulated molecules toward the cytoplasm. **Eur. J. Cell Biol.**, **38(1)**: 27-33, 1985.

TSUTSUMI, V.; MENA-LÓPEZ, R.; ANAYA-VELASQUEZ, F. & MARTÍNEZ-PALOMO, A.; Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. **Am. J. Pathol.**, **117**: 81-91, 1984.

TSUTSUMI, V. Pathology of experimental amebiasis. In: Ravdin JJ, ed. **Amebiasis. Human Infection by *Entamoeba histolytica***. New York: John Wiley & Sons; pp. 147-176, 1988.

TSUTSUMI, V. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis: an ultrastructural study. **Am. J. Pathol.**, **130**: 112-119, 1988.

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

VENTURA-JUARÉZ, J.; CAMPOS-RODRIGUEZ, R. & TSUTSUMI, V. Early interactions of *Entamoeba histolytica* trophozoites with parenchymal and inflammatory cells in the hamster liver: an immunocytochemical study. **Can. J. Microbiol.**, **48**: 123-131, 2002.

WALKER, E.L. & SELLARDS, A.W. Experimental entamoebic dysentery. **Phillip. J. Sci.(B)**, **8**: 253-331, 1913.

WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis, estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Rev. Infect. Dis.**, **8(2)**: 228-238, 1986.

WATSON, M.L. Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, **4**: 475-478, 1958.

---

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) – Informal Meeting on Strategies for Control of Amoebiasis, Geneva, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - PAHO - UNESCO - Report of a consultation of experts on amoebiasis - 1997 - México.