



THIAGO GUIMARÃES PIRES CORDEIRO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA VIRULÊNCIA DE
CEPAS DE *ENTAMOEBAS HISTOLYTICA* / *ENTAMOEBAS DISPAR***

Niterói
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

THIAGO GUIMARÃES PIRES CORDEIRO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA
VIRULÊNCIA DE CEPAS DE
*ENTAMOEBAS HISTOLYTICA/ENTAMOEBAS DISPAR***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Investigativa

**Orientadoras: Profa. Dra. Heloisa Werneck de Macedo
Profa. Dra. Maria Angélica Guzmán-Silva**

Niterói
2008

Cordeiro, Thiago Guimarães Pires

Modelo experimental para o estudo da virulência de cepas de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* / Thiago Guimarães Pires Cordeiro Niterói, 2008.

111 f.

Dissertação de Mestrado (Patologia Investigativa – Programa de Pós-graduação em Patologia) – Universidade Federal Fluminense).
Orientadoras: Heloisa Werneck de Macedo e Maria Angélica Guzmán-Silva

Bibliografia: f. 95 - 104

1. ENTAMOEBA HISTOLYTICA/ENTAMOEBA DISPAR. 2. ABSCESO HEPÁTICO. 3. PATOLOGIA EXPERIMENTAL. I. Universidade Federal Fluminense. II. Título.

THIAGO GUIMARÃES PIRES CORDEIRO

**MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DA VIRULÊNCIA DE CEPAS DE
*ENTAMOEBA HISTOLYTICA/ENTAMOEBA DISPAR***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Investigativa

Aprovado em _____ de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Kalil Madi (examinador prévio)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Doutor José Roberto Machado e Silva
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Doutora Regina Helena Saramago Peralta
Universidade Federal Fluminense

Dedico este trabalho aos meus pais (Gilio e Cristina), pelo exemplo de perseverança, amor e dedicação e à minha namorada (Patricia), pelo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar forças e sempre estar ao meu lado. Aos meus pais Gilio e Cristina pela dedicação incondicional, apoio e fomentos (Fundação Gilio Filho). Aos meus irmãos Marcel e Manoella e minha família pelo enorme apoio. A minha namorada Patricia pelo amor, carinho, compreensão, apoio e GRANDE paciência.

A professora Heloisa pelos conselhos e incentivos e por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de fazer este trabalho. A professora Maria Angélica pela grande ajuda e compreensão.

A professora Lúcia, minha eterna orientadora e amiga.

Ao professor Edward pela grande colaboração e hospitalidade. Ao Joãozinho e Edna pelo ensinamento e por tornarem minha “longa” estadia em Belo Horizonte mais aprazível.

Ao professor Peralta por ter me acolhido tão bem em seu laboratório.

A minha amiga e braço direito Helena que tanto me ajudou e não me deixou desistir.

Aos alunos do Programa de Pós-graduação em Patologia pelos bons momentos de descontração e compartilhamento de stress.

Ao pessoal da técnica histológica (Antônio Carlos, Lívia e Aline).

Finalmente as amebas e aos hamsters, pois sem eles, nada disso teria acontecido.

*As pessoas são solitárias porque
constroem muros ao invés de
pontes.*

autor desconhecido

RESUMO

A amebíase é a segunda principal causa de morte por parasito em todo o mundo. O protozoário responsável, *Entamoeba histolytica*, apresenta elevada patogenicidade. É capaz de secretar proteases que dissolvem o tecido do hospedeiro, matar suas células por contato, fagocitar eritrócitos e invadir a mucosa intestinal causando a colite amebiana. Em alguns casos, este parasito é capaz de romper a barreira da mucosa intestinal e chegar ao fígado por meio da circulação porta, onde pode causar abscesso que cresce rapidamente e é quase sempre fatal. Evidências baseadas apenas na morfologia apontavam a existência de uma única espécie. No entanto, estudos mais modernos mostraram que, na realidade, há duas espécies geneticamente bem distintas, denominadas *Entamoeba histolytica* (patogênica) e *Entamoeba dispar* (não patogênica ou comensal). Trabalhamos com a cepa 03C de *E. dispar* e com as cepas HM1-IMSS e EGG de *E. histolytica* que foram inoculadas em fígado de hamster. Utilizamos como controle a flora do cultivo da cepa 03C e o meio de cultura Pavlova, modificado por [Silva \(1972\)](#). As lesões hepáticas foram verificadas em três diferentes períodos, 1, 3 e 6 dias pós-inoculação. A caracterização molecular das cepas foi efetuada mediante reação Multiplex-PCR, utilizando os primers EdP1/EdP2 e EhP1/EhP2. As cepas de *E. histolytica* (EGG e HM1) e de *E. dispar* (03C) foram capazes de causar lesão hepática. A cepa EGG provocou extensos abscessos hepáticos e vários trofozoítos foram encontrados nas lesões ao longo dos 3 períodos de estudo. A cepa HM1 provocou abscessos menores quando comparados à cepa EGG, porém só foram observados trofozoítos íntegros nos períodos 1 e 3 dias pós-inoculação. A cepa 03C provocou abscesso intermediário quando comparado aos provocados pelas outras duas cepas. Foram observados trofozoítos em todos os períodos do estudo. A cepa EGG apresentou evolução progressiva da lesão, diferentemente das cepas HM1 e 03C. O processo de reparo teve início no período 3 dias pós-inoculação, sendo mais adiantado nas cepas 03C e HM1 no último período observado. As características histopatológicas das lesões variaram de acordo com o período de observação e com a cepa inoculada.

Palavras-chave: *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, fígado, hamster, abscesso hepático, amebíase.

ABSTRACT

Amoebiasis is the second leading cause of mortality from parasitic disease worldwide. The causative protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, is a potent pathogen. *E. histolytica* trophozoites secrete proteinases that dissolve host tissues, kill host cells and engulf red blood cells invading the intestinal mucosa and causing amoebic colitis. In some cases amoebas breach the mucosal barrier and travel through the portal circulation to the liver, where they cause abscesses. Amoebic liver abscesses grow inexorably and are almost always fatal. Evidences based on morphology pointed out for a single species in the past, but are, in fact, two genetically distinct species, termed *Entamoeba histolytica* (pathogenic) and *Entamoeba dispar* (non pathogenic or commensal). We worked with the strain 03C of *E. dispar* and with two strains of *E. histolytica* (HM1-IMSS and EGG). They were inoculated in hamster liver. We used the 03C's flora and the medium Pavlova modified by Silva (1972) as control groups. The injury made by them was observed in three different periods, 1, 3 and 6 days after inoculation. The molecular characterization of strains was made by Multiplex-PCR reaction, using the EdP1/EdP2 and EhP1/EhP2 primers. The *E. histolytica* strains EGG and HM1 and *E. dispar* 03C were capable of causing hamster hepatic lesion. The EGG strain provoked extensive hepatic abscesses and some trophozoites were found in lesions throughout the three periods of study. HM1 strain provoked smaller abscesses when compared with EGG lesions, however, trophozoites were observed 1 and 3 days after-inoculations. The 03C strain provoked intermediate abscesses when compared with the two others strains. Trophozoites were observed in all days of study. EGG strain presented gradual evolution of the injury, differently from HM1 and 03C strains. The repair process begun 3 days after inoculation, being more advanced in 03C and HM1 strains at day 6. The histopathological characteristics of the lesions varied in accordance with the strain inoculated and period of observation.

Key words: *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, liver, hamster, liver abscess, amoebiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – *Entamoeba histolytica*. Forma cística – resistência – do parasito e forma vegetativa – trofozoíto – do parasito ??
- Figura 2** - Ciclo de vida do protozoário *Entamoeba histolytica* ??
- Figura 3** - Mapa do Estado do Rio de Janeiro com a localização do Município de Sumidouro ??
- Figura 4** - Produtos amplificados através de Multiplex-PCR com primers EdP1/P2 e EhP1/P2 ??
- Figura 5** - Aspecto macroscópico do fígado de hamster 1 dia pós-inoculação ??
- Figura 6** - Aspecto macroscópico do fígado de hamster 3 dias pós-inoculação ??
- Figura 7** - Aspecto macroscópico do fígado de hamster 6 dias pós-inoculação ??
- Figura 8** - Evolução do peso do fígado dos animais sacrificados nos períodos 1, 3 e 6 dias pós-inoculação ??
- Figura 9** - Evolução da relação % peso do fígado/peso corporal dos animais sacrificados nos períodos 1, 3 e 6 dias pós-inoculação ??

LISTA DE ABREVIATURAS

03C	Cepa de <i>Entamoeba dispar</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EGG	Cepa de <i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
<i>E. moshkovskii</i>	<i>Entamoeba moshkovskii</i>
Gal/GalNAc	Galactose e N-acetil-D-galactosamina
HE	Hematoxilina-eosina
HM1-IMSS	Cepa de <i>Entamoeba histolytica</i>
PAS	Periodic acid-Schiff (ácido periódico de Schiff)
pb	Pares de base
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)
PCR	Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (ácido ribonucléico ribossômico)
TBE	Tris-borate-EDTA buffer (tampão tris-borato-EDTA)

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 DEFINIÇÃO	??
2.2 HISTÓRICO	??
2.3 IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO	??
2.4 O PARASITO	??
2.5 CICLO EVOLUTIVO	??
2.6 VIRULÊNCIA	??
2.7 ASPECTOS CLÍNICOS	??
2.8 DIAGNÓSTICO	??
2.9 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	??
2.10 AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL EM HAMSTER	??
2.11 HIPÓTESE	??
3 OBJETIVOS	??
3.1 OBJETIVO GERAL	??
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	??
4 MATERIAL E MÉTODOS	??
4.1 CEPA DE <i>E. DISPAR</i>	??
4.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS	??
4.2.1 <i>E. histolytica</i>	??
4.2.2 <i>E. dispar</i>	??
4.3 CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEPAS	??
4.3.1 Congelamento	??
4.3.2 Descongelamento	??
4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS	??
4.4.1 Extração do DNA	??

4.4.2 Reação de amplificação (Multiplex-PCR)	??
4.4.3 Detecção do produto amplificado	??
4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FLORA BACTERIANA	??
4.6 ESTUDO <i>IN VIVO</i>	??
4.6.1 Preparação das culturas para inoculação	??
4.6.1.1 Crescimento das bactérias	??
4.6.1.2 Interação ameba-bactérias	??
4.6.1.3 Preparação das células para as inoculações	??
4.6.1.3.1 <i>E. dispar</i>	??
4.6.1.3.2 <i>E. histolytica</i>	??
4.6.1.3.3 bactérias	??
4.6.2 Inoculação em fígado de hamster	??
4.6.2.1 Animais	??
4.6.2.2 Inoculações	??
4.6.3 Estudo macroscópico	??
4.6.4 Estudo histopatológico	??
5 RESULTADOS	??
5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS	??
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FLORA BACTERIANA	??
5.3 MACROSCOPIA	??
6 DISCUSSÃO	??
7 CONCLUSÕES	??
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	??
9 ANEXOS	??

1 INTRODUÇÃO

O protozoário parasita *Entamoeba histolytica* é o agente causador da amebíase, uma doença humana caracterizada pela disenteria e abscesso hepático. Este parasito normalmente vive no intestino grosso do homem, porém, ocasionalmente pode penetrar na mucosa intestinal e se disseminar para outros órgãos. *E. histolytica* é responsável por 100.000 mil mortes anuais, sendo considerada a segunda causa de mortalidade por protozoário parasita.

No final do século XIX, acreditava-se que muitos indivíduos, aparentemente infectados por *E. histolytica*, não apresentavam sintomas e que a infecção era espontaneamente curada. Isso foi interpretado por muitos autores como sendo uma variação na virulência do parasito. Porém, em 1925, Emile Brumpt sugeriu uma explicação alternativa para este fato, sendo assim, proposta a hipótese da existência de duas espécies distintas. Uma capaz de causar a doença invasiva e a outra incapaz de causar a doença. A segunda foi chamada de *Entamoeba dispar*. Porém, esta hipótese não foi aceita por outros autores na época. Na década de 70

do século passado, o acúmulo de várias evidências passou a sustentar a hipótese de Brumpt de que o organismo conhecido como *E. histolytica* na realidade compreendia duas espécies distintas. O surgimento de técnicas de bioquímica, imunologia e biologia molecular mais avançadas levaram, em 1993, a uma redescritção da *E. histolytica*, separando-a da *E. dispar*. Muitos autores acreditam que apenas *E. histolytica* é capaz de causar a forma invasiva da doença. Porém alguns estudos mostraram que determinadas cepas de *E. dispar* apresentam certo grau de virulência e são capazes de causar a doença em animais de laboratório, sugerindo assim, a capacidade de causar a doença invasiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DEFINIÇÃO

A amebíase é uma parasitose humana causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, com o indivíduo podendo ou não apresentar sintomas (WHO, 1997). O parasito vive normalmente no intestino grosso, porém, em alguns casos, ele pode se estabelecer em outros órgãos como fígado (sítio extra-intestinal mais freqüente), pulmão e cérebro. Atualmente, é aceita a existência de *Entamoeba dispar*, uma outra espécie envolvida na amebíase. Juntas, *E. dispar* e *E. histolytica* formam o complexo *E. histolytica/E. dispar*. A primeira considerada patogênica, e a segunda considerada incapaz de invadir a mucosa intestinal, estando associada à amebíase não invasiva ou luminal. Ambas são morfológicamente idênticas, mas geneticamente distintas. Sendo assim, o termo amebíase deve abranger não só a infecção por *E. histolytica* e seu amplo quadro clínico, como também a infecção por *E. dispar*.

2.2 HISTÓRICO

As disenterias e as diarréias parecem ser aspectos clínicos conhecidos desde a Idade Antiga. Os gregos foram os primeiros a descrevê-las e diferencia-las. Hoje sabemos que a disenteria é uma infecção do intestino grosso que provoca usualmente fortes dores abdominais, ulceração das mucosas, tenesmo e diarréia, sempre acompanhada de muco e sangue, após estágio inicial de diarréia aquosa. Já a diarreia consiste no aumento do número de evacuações (fezes não necessariamente líquidas) e/ou a presença de fezes amolecidas ou até líquidas nas evacuações e que normalmente não são graves e prolongam-se pelo máximo de sete dias. Porém, seus agentes causadores só foram recentemente conhecidos, e dentre eles destaca-se o protozoário *E. histolytica*.

A primeira descrição de *E. histolytica* foi feita pelo médico russo Lösch, em 1875, na cidade de São Petersburgo (antiga Leningrado). Ele infectou cães com fezes frescas de um paciente que apresentava disenteria persistente com fezes mucossanguinolentas. A necropsia em um dos animais mostrou ulcerações no intestino grosso e amebas no conteúdo intestinal. O mesmo quadro foi observado na necropsia do paciente. Lösch denominou estas amebas de *Amoeba coli*.

Em 1887, Koch, após estudo sobre cólera realizado no Egito e na Índia, analisou amostras de fezes e necropsias de pacientes. Ele observou cinco casos de disenteria, dois dos quais apresentaram abscessos no fígado e amebas idênticas às encontradas por Lösch.

Councilman & Lafleur, em 1891, deram o nome de *Entamoeba dysenteriae*, ao parasito causador da amebíase, após o estudo detalhado do quadro clínico de 15 casos de amebíase intestinal e hepática. Foram eles também, os primeiros a empregarem os termos “disenteria amebiana” e “abscesso amebiano do fígado” e a sugerirem a existência de outra espécie de ameba, que seria não patogênica.

Em 1903, Schaudinn diferenciou duas amebas do trato intestinal humano. Uma patogênica chamada *E. histolytica* e a outra não patogênica denominada *Entamoeba coli*. Esta hipótese foi confirmada em 1913, por Walker & Sellards, após obterem experimentalmente a disenteria amebiana em voluntários humanos que foram infectados por cistos isolados de portadores assintomáticos.

Após várias divergências sobre nomenclatura e comportamento quanto aos efeitos patogênicos de *E. histolytica*, Dobell, em 1919, formulou a teoria unicista a qual postulava que toda *E. histolytica* seria invasiva, ou seja, capaz de produzir lesões e que em alguns casos, os trofozoítos viveriam em estado de equilíbrio com o hospedeiro, causando lesões que se curam, não determinando uma sintomatologia importante.

Em 1925, Brumpt procurando explicar a grande freqüência de indivíduos infectados assintomaticamente e as diferenças geográficas em relação à gravidade das formas clínicas, formulou a teoria Dualista, segundo a qual duas espécies morfológicamente semelhantes estariam envolvidas na amebíase. *Entamoeba dysenteriae*, patogênica, responsável pelas formas sintomáticas e *Entamoeba dispar*, que viveria como comensal na luz do intestino. As idéias de Brumpt foram

amplamente recusadas na época, pois não haviam métodos capazes de distinguir os dois organismos.

Em 1925, Boeck & Drbohlav cultivaram pela primeira vez *E. histolytica*, o que possibilitou novos estudos sobre o parasito. Porém, maiores avanços foram obtidos por Diamond, em 1961, quando foi desenvolvido o cultivo axênico.

Em 1961, foi lançada por Hoare, na reunião de Paris, a teoria Neodualista, segundo a qual a virulência de *E. histolytica* seria uma característica instável, sujeita a variações devido a fatores desconhecidos. Esta teoria também ficou conhecida como Pluralista, pois defendia a idéia da existência de cepas de *E. histolytica* com diferentes graus de virulência, causando desde infecções assintomáticas a formas graves da doença.

Em 1978, Sageant *et al.* demonstraram diferenças bioquímicas usando como parâmetro o perfil de isoenzimas (zimodemos) de isolados denominados “patogênicos” e “não patogênicos”. Estes dois grupos apresentavam diferenças na virulência quando submetidos a testes biológicos. De forma geral, o zimodema das cepas se correlacionava com a forma clínica e com parâmetros biológicos. Posteriormente, com o avanço tecnológico, a distinção entre as duas formas (patogênica e não-patogênica) pôde ser realizada a nível molecular. A partir disso, a Organização Mundial de Saúde e os pesquisadores presentes no Seminário de Amebíase realizado no México em 1997, anuíram que *E. histolytica* e *E. dispar* eram duas espécies morfológicamente idênticas à microscopia óptica e que formavam o complexo *E. histolytica/E. dispar*.

E. histolytica será citada com mais frequência nesta revisão pelo fato dela ser a espécie mais estudada e pela maioria dos estudos terem sido realizados com suas cepas. Sendo assim, a *E. dispar* será mencionada quando os estudos forem pertinentes à mesma.

2.3 IMPORTÂNCIA E DISTRIBUIÇÃO

E. histolytica encontra-se distribuída amplamente em todo o mundo. Sua prevalência é maior nos países das zonas tropicais e subtropicais, onde a população é carente e apresenta baixo nível de saneamento (STAUFFER & RAVDIN, 2003). Porém, a crescente migração de pessoas de países em desenvolvimento para países desenvolvidos, permitiu que o parasito se disseminasse por todo o mundo. Até mesmo regiões frias como o Canadá, Norte dos Estados Unidos e Europa, apresentam grande quantidade de pessoas infectadas.

Este parasito representa grande risco à saúde, principalmente nos lugares onde as barreiras entre fezes humanas e alimentos e/ou água são inadequadas. Atualmente, as prevalências mundiais e regionais das infecções causadas por *E. histolytica* estão sendo analisadas por outra ótica, graças ao avanço da biologia molecular que permitiu que o organismo, que até meados da década de 90 era chamado *E. histolytica*, pudesse ser diferenciado em duas espécies distintas, porém, morfologicamente idênticas.

Antigamente, estimava-se que 500 milhões de pessoas estariam contaminadas por *E. histolytica* em todo o mundo. Porém, hoje se sabe que muitos destes indivíduos são colonizados pela forma não patogênica do parasito (*E. dispar*) (STANLEY, 2003).

Segundo estimativas, de 40 a 100 mil indivíduos morrem anualmente vítimas de amebíase, fazendo dela a segunda principal causa de morte por infecção causada por protozoário parasito (WHO, 1997; STANLEY, 2003). A mortalidade entre as pessoas com abscesso hepático é de 2 a 10% e chega a 70% nos casos de colite fulminante (GUERRANT, 1986).

Algumas regiões da África, Ásia, América Central e do Sul se destacam no cenário mundial, devido aos baixos níveis sócio-econômicos e higiênico-sanitários da população (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

Em 1996, 1,3 milhão de casos de amebíase intestinal foi relatado no México, e provavelmente este valor incluía infecções por *E. dispar*. Este dado é condizente com estudos posteriores de sorologia, que mostraram que mais de 8% da população mexicana já tivera amebíase (CABALLERO-SALCEDO *et al.*, 1994).

Entre 1990 e 1998, em Hue (Vietnam) Blessmann relatou pouco mais de 2.000 casos de abscesso hepático amebiano, indicando uma incidência de 21 casos da doença para cada 100.000 habitantes (BLESSMANN *et al.*, 2002).

No Egito, um estudo feito por Abd-Alla, mostrou que 38% dos indivíduos que apresentaram diarreia aguda, tinham colite amebiana (ABD-ALLA & RAVDIN, 2002).

Nos EUA, assim como nos países desenvolvidos, a amebíase é relatada em homossexuais do sexo masculino, imigrantes, turistas que viajam para áreas endêmicas, pessoas imunodeprimidas pelo vírus HIV (TANYUKSEL & PETRI, 2003) e em pessoas que vivem em áreas de fronteira com o México (STANLEY, 2003). Em 1993, foram relatados 2.970 casos de amebíase nos EUA, dos quais 33% em imigrantes do México e América do Sul e Central e 17% em imigrantes da Ásia e Ilhas do Pacífico (STANLEY, 2003).

O Brasil, em virtude de sua localização geográfica, condições climáticas e graves problemas sanitários enfrentados por grande parte da população, apresenta altos índices de parasitoses, tanto em áreas urbanas quanto rurais (MORAES *et al.*, 2003; GIATTI *et al.*, 2004; CARVALHO-ALMEIDA *et al.*, 2006). Por apresentar uma grande extensão territorial, ainda não tem uma estimativa da prevalência da amebíase em seu território.

A prevalência das enteroparasitoses varia de acordo com a região e com a população estudada (GATTI *et al.*, 1999). A prevalência de infecções por parasitos intestinais é, portanto, considerada um dos principais parâmetros de avaliação do status da saúde pública de uma região, ou mesmo de um país (GONÇALVES *et al.*, 1990; COSTA-MACEDO *et al.*, 1998).

No Brasil, a presença do Complexo *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* tem sido relatada em vários estados como Rondônia (ORLANDI *et al.*, 2001), Amazonas (NOZAKI *et al.*, 1990); Pará (MIRANDA *et al.*, 1998); São Paulo (FERREIRA *et al.*, 1994; LUDWIG *et al.*, 1999); Minas Gerais (ROCHA *et al.*, 1994; REZENDE *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 2000); Piauí (OLIVEIRA *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2003); Ceará (BRAGA *et al.*, 2001b), Rio de Janeiro (MACEDO & REY, 1996), entre outros. Aqui, a prevalência e a gravidade da amebíase não é tão elevada quanto no México, entretanto, apresenta grande diversidade no número de indivíduos infectados ou com sintomatologia da doença, variando de região para região. No Sul e Sudeste, a prevalência varia de 2,5% a 11%, na região Amazônica é em torno de 19% e nas demais regiões aproximadamente 10%, provavelmente em função das condições sanitárias e socioeconômicas da população, principalmente em relação às condições de habitação, presença de esgoto e água tratada (SILVA, 2003).

2.4 O PARASITO

E. histolytica é considerada uma das formas mais primitivas de protozoário, sendo extremamente frágil, pleomórfico e sensível a mudanças de temperatura (MARTINEZ-PALOMO, 1988). Pertence a um grupo maior de amebas, da família Entamoebidae, que são parasitos comuns da espécie humana. É colocada no grupo das *Entamoebas*, que significa amebas interiores, por geralmente serem encontradas no interior de animais vertebrados. Segundo o Comitê de

Sistemática da Sociedade Internacional de Protozoologia, *E. histolytica* e *E. dispar* são classificadas como protozoários pertencentes ao filo Sarcomastigophora, subfilo Sarcodina, superclasse Rhizopoda, classe Lobosia, subclasse Gymnamoebida, ordem Aemoebida, subordem Tubulina, família Entamoebida e gênero *Entamoeba* (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

O ciclo biológico do parasito apresenta dois estágios básicos e bem definidos: trofozoítos e cistos.

Os trofozoítos ou forma vegetativa apresentam formas e tamanhos variados, medindo entre 10 e 60 μ m. Apresentam forma amebóide, núcleo com cariossoma central e cromatina periférica distribuídos regularmente na membrana nuclear. Albach, 1989, demonstrou que esta cromatina é responsável por grande parte da síntese e acúmulo de rRNA, sendo assim, equivalente ao nucléolo. Esta estrutura é totalmente diferente da encontrada em outros eucariontes. Na microscopia eletrônica de varredura é possível observar os pseudópodos, que são projeções citoplasmáticas responsáveis pela movimentação e alimentação do parasito. Outra característica importante da ameba observada na microscopia eletrônica de transmissão é a grande quantidade de vesículas e vacúolos de diferentes tamanhos encontradas no citoplasma (CHÁVEZ-MUNGUÍA *et al.*, 2004; De SOUZA, 2006). Essas vesículas e vacúolos são as responsáveis pela produção e armazenamento da grande quantidade de enzimas capazes de destruir tecidos (figura 1).

A forma cística ou forma de resistência é uma estrutura esférica que apresenta 10 a 20 μ m de diâmetro. Sua parede é rígida e resistente, devido à

presença de quitina e glicoproteínas. Contêm de um a quatro núcleos, com as mesmas características dos núcleos dos trofozoítos. No citoplasma dos cistos, observa-se a presença de vacúolos de glicogênio e de corpos cromatóides em forma de bastonetes com ponta arredondada. À medida que amadurecem, os corpos cromatóides e os vacúolos vão desaparecendo. Segundo Ravdin (1988), os corpos cromatóides são massas de ribossomas e estão envolvidos com a síntese de proteínas (figura 1).

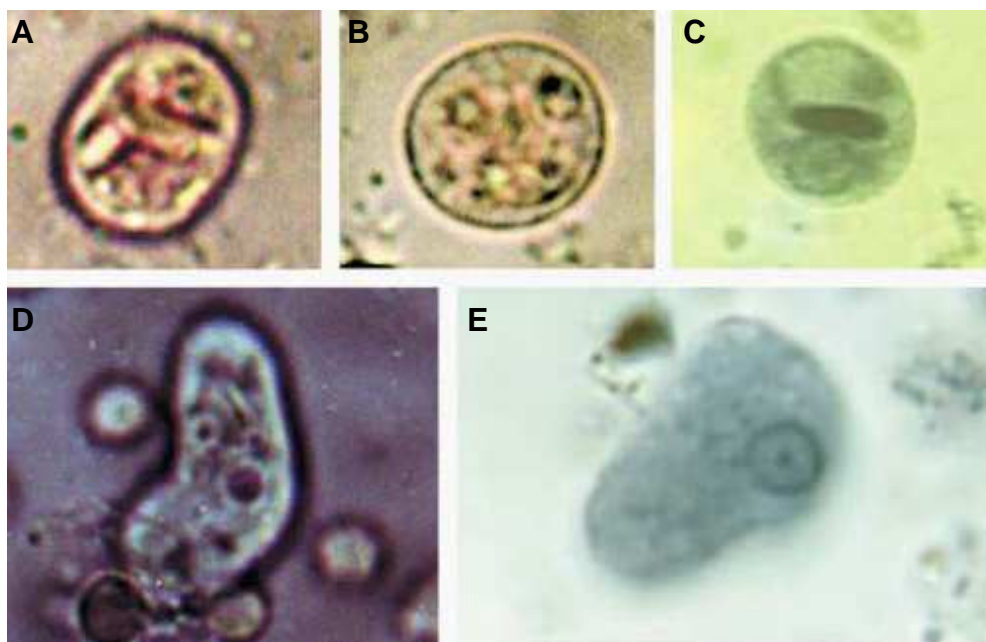


Figura 1 – *Entamoeba histolytica*. Forma cística - resistência - do parasito (A, B e C) e forma vegetativa – trofozoíto – do parasito (D e E). * Haque *et al.*, 2003

Os trofozoítos de *E. histolytica* são considerados microaerófilos, por não possuírem mitocôndrias e citocromos, mas executam a via metabólica clássica,

apresentando o sistema de malato desidrogenase e álcool desidrogenase. Eles apresentam uma limitada capacidade de consumir oxigênio, sendo capazes de crescerem em uma atmosfera contendo até 5% de oxigênio (SILVA, 1997). Os parasitos fagocitam bactérias e partículas de alimento e se reproduzem por divisão binária.

Vários genes como o da galactose, lectina, ameboporos, hemolisinas e cisteíno-protease são expressos tanto em *E. histolytica* quanto em *E. dispar*, porém, a diferença quantitativa e qualitativa da expressão entre ambas as espécies é o que torna uma invasiva e a outra não-invasiva (QUE *et al.*, 2002).

Mesmo sendo vários os argumentos a favor na literatura e o reconhecimento pela Organização Mundial de Saúde, estudos ainda mostram certas controvérsias e muitas dúvidas quanto à separação rígida do complexo *E. histolytica/E. dispar* em duas espécies distintas (COSTA *et al.*, 2000; ESPINOSA-CANTELLANO & MATÍNEZ-PALOMO, 2000; COSTA *et al.*, 2006; CORDEIRO & MACEDO, 2007).

2.5 CICLO EVOLUTIVO

O homem se infecta ingerindo a forma cística madura contida em alimentos, água ou por qualquer tipo de contato fecal-oral. Também são possíveis

formas menos usuais de transmissão, incluindo o sexo anal e oral e equipamentos de lavagem intestinal contaminados (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

O desencistamento ocorre no intestino delgado e os trofozoítos liberados migram para o intestino grosso. Lá, eles utilizam receptores de Gal/GalNAc presentes na membrana do trofozoíto, para aderirem à mucina do cólon e colonizarem o órgão. Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária e estes sofrem o processo de encistamento, originando novos cistos que são eliminados nas fezes. Devido à proteção conferida por sua parede, os cistos podem sobreviver dias a semanas no meio ambiente. Os trofozoítos podem ser eliminados em fezes diarréicas, mas são rapidamente destruídos no meio externo e, se ingeridos, não sobrevivem às enzimas digestivas (SILVA, 1997; SANTOS, 2005).

Para serem eliminados pelas fezes em forma de cistos, os trofozoítos se arredondam (pré-cisto), reduzem seu metabolismo e começam a sintetizar a parede cística. Aparecem no citoplasma os corpos cromatóides e os vacúolos de glicogênio. O núcleo sofre divisões múltiplas, podendo dar origem a até 4 novos núcleos, que são resultado de duas divisões sucessivas. Outros sinais de um cisto maduro são percebidos também pela diminuição do número de corpos cromatóides e do tamanho do vacúolo de glicogênio. O cisto eliminado é então capaz de resistir às condições desfavoráveis do meio ambiente externo, podendo, deste modo, infectar um outro indivíduo, um novo hospedeiro (RAVDIN, 1988).

Na forma não invasiva os trofozoítos permanecem confinados no lúmen intestinal dos portadores assintomáticos, que eliminam os cistos em suas fezes (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Na forma invasiva os trofozoítos invadem a mucosa intestinal. As células do epitélio intestinal morrem quando em contato com os trofozoítos. Esta destruição produz mediadores inflamatórios que atraem neutrófilos e macrófagos para a região da infecção. A transmigração dos neutrófilos para a superfície luminal, cria canais que facilitam a invasão do parasito. Quando os neutrófilos entram em contato com os trofozoítos, muitos são mortos, liberando mediadores que causam mais estragos às células epiteliais intestinais adjacentes. Os macrófagos liberam outros mediadores que contribuem para o desenvolvimento da inflamação (HAQUE *et al.*, 2003; STANLEY, 2003) (figura 2).

Os trofozoítos que invadem a mucosa multiplicam-se ativamente no interior das úlceras e através da corrente sanguínea atingem outros órgãos como fígado, pulmão e encéfalo, causando doença extra-intestinal (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

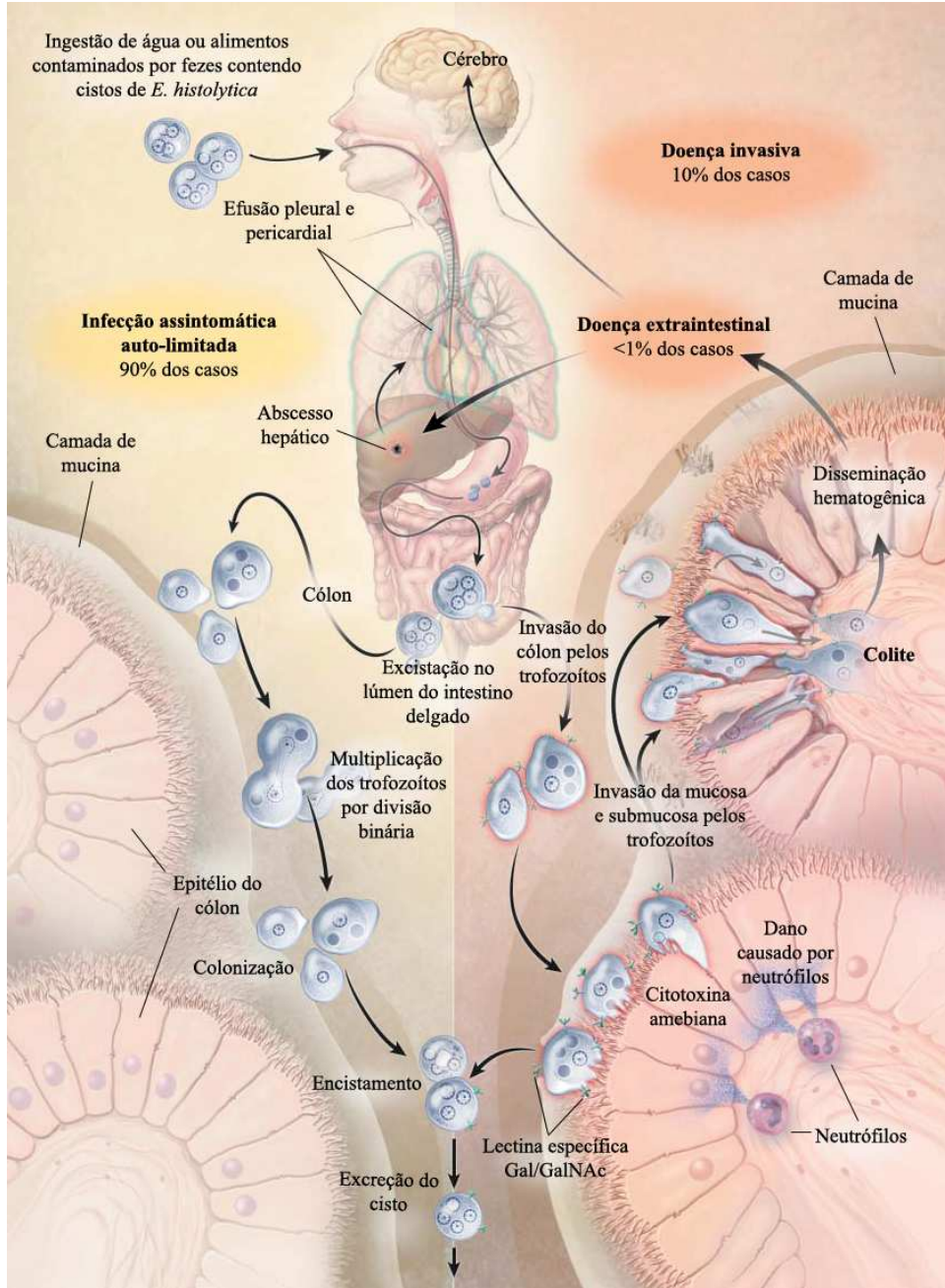


Figura 2 – Ciclo de vida do protozoário *Entamoeba histolytica* – A infecção é normalmente iniciada pela ingestão de água ou alimento contaminados por material fecal contendo cistos do parasito. A forma cística do parasito sobrevive à passagem através do estômago e intestino delgado. O desencistamento ocorre no intestino delgado onde são formados trofozoítos com capacidade invasiva. Nas infecções assintomáticas, os trofozoítos aderem à camada de mucina da mucosa intestinal e formam novos cistos que são eliminados junto com as fezes do hospedeiro. Nas infecções invasivas, esses trofozoítos aderem ao epitélio intestinal do hospedeiro através de uma lectina específica - galactose e N-acetil-D-galactosamina (Gal/GalNAc) - presente na superfície do trofozoíto. Após a aderência ocorre a lise das células do cólon e sua invasão. Há uma resposta dos neutrófilos a invasão, contribuindo ainda mais para a destruição celular do local da invasão. A doença intestinal pode, em alguns casos, evoluir e se espalhar para outros órgãos como é o caso do fígado, coração e cérebro. * Adaptado de Haque *et al.*, 2003

2.6 VIRULÊNCIA

A patogenicidade do protozoário *E. histolytica* é atribuída à sua capacidade fagocítica, citotóxica e expressão de adesinas, cisteína-proteases, ameboporos, colagenase e fosfolipase (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000; OLIVOS *et al.*, 2005). Estas características estão presentes tanto em cepas virulentas quanto em não virulentas. As cepas não virulentas são definidas como sendo as que não são capazes de produzir abscessos hepáticos em animais de laboratórios susceptíveis, como o hamster ou o gerbil. Algumas cepas virulentas podem perder sua virulência pelo fato de terem sido mantidas por um longo período em culturas axênicas (OLIVOS-GARCÍA *et al.*, 2004; OLIVOS *et al.*, 2005).

A virulência do protozoário *E. histolytica* é um evento multifatorial influenciado por fatores do hospedeiro, fatores intrínsecos do parasito e fatores do microambiente. Com relação ao microambiente, um dos aspectos de maior importância na virulência amebiana, talvez seja a interação das amebas com os diferentes tipos de bactérias que concomitantemente habitam o intestino do hospedeiro. O papel das bactérias intestinais no início e durante o curso da amebíase intestinal é pouco conhecido (SPICE & ACKERS, 1992; 1993; De MENEZES, 1997).

Os trofozoítos de *E. histolytica* crescidos em associação com bactérias, se alimentam ativamente delas, por fagocitose. Entretanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos de fagocitose e de digestão das bactérias, e quais os benefícios nutricionais que este tipo de alimentação traz para os trofozoítos. A natureza da relação trofozoíto-bactéria parece ser um fenômeno altamente específico, no qual

intervêm componentes da superfície amebiana com atividade de lectina e resíduos de Gal/GalNAc, presentes na superfície bacteriana (BRACHA *et al.*, 1982; MANN & LOCKHART, 1998).

Existem evidências de que trofozoítos deste protozoário são altamente seletivos em relação a sua interação com as diferentes espécies de bactérias. Assim sendo, somente aquelas espécies que possuem um dos mecanismos de reconhecimento mencionados anteriormente, seriam as que teriam a capacidade de unir-se aos trofozoítos, sendo posteriormente fagocitadas por estes (BRACHA & MIRELMAN, 1983). Nos casos em que ocorre um reconhecimento específico entre trofozoítos e bactérias, tem sido observado um aumento na expressão da virulência amebiana desde que as bactérias estejam intactas, pois lisados bacterianos e bactérias atenuadas pelo calor ou por irradiação não sofrem nenhum efeito dos trofozoítos (WITTNER & ROSENBAUM, 1970; MIRELMAN, 1987). Entretanto, o reconhecimento específico não deve ser a única condição para o aumento da virulência amebiana, já que também existem relatos de que a associação bacteriana pode ou não determinar uma diminuição na expressão da virulência dos trofozoítos (SPICE & ACKERS, 1993; De MENEZES *et al.*, 1997).

Experimentos *in vitro* demonstraram que quando os trofozoítos são associados com bactérias podem causar modificações na expressão fenotípica da virulência amebiana, e estas modificações dependem da cepa de *E. histolytica* e da espécie e cepa de bactérias utilizadas nesta associação (ANAYA-VELÁZQUEZ & PADILLA-VACA, 1992; SPICE & ACKERS, 1992; de MENEZES *et al.*, 1997). Padilla-Vaca *et al.* (1999) demonstraram que a associações parasito-bactérias curtas

(30 minutos – 2 horas) são capazes de modular significativamente a expressão fenotípica amebiana.

Enzimas, como as cisteína-proteases e as metalo-proteases são reconhecidamente capazes de destruir as células intestinais causando a invasão da mucosa intestinal (SINGH *et al.*, 2004; BRUCHHAUS *et al.*, 2003). As proteases são consideradas um importante fator de virulência na patogenicidade de *E. histolytica* (PADILLA-VACA *et al.*, 2000).

Até o momento, foram identificados 8 genes que codificam as cisteína-proteases, mas, intrigantemente, apenas um pequeno grupo desses genes é expresso em condições artificiais de cultivo, dificultando o estudo da ação dessas enzimas no tecido intestinal (BRUCHHAUS *et al.*, 2003).

2.7 ASPECTOS CLÍNICOS

Em relação aos aspectos clínicos da doença, observamos de um lado do espectro as formas assintomáticas e do outro, as que caracterizam a amebíase invasiva intestinal, com disenteria, colite, apendicite, megacólon, peritonite, abscesso hepático, abscesso pleuropulmonar, lesões oculares e genitais. A amebíase hepática é a forma invasiva que causa o maior número de mortes, cujo percentual varia nos diferentes estudos (SHAMSUZZAMAN *et al.*, 2000 b).

O início da doença ocorre quando trofozoítos de *E. histolytica* aderem às células epiteliais do cólon através de uma lectina Gal/GalNAc específica expressa na superfície do parasito. Esta lectina (molécula glicoprotéica) reconhece resíduos da molécula de açúcar presente na membrana de células epiteliais e adere fortemente à sua superfície (YAU *et al.*, 2001). Células de mamíferos sem esses açúcares são resistentes à aderência pelo trofozoíto da ameba, mostrando o seu papel na adesão e a conhecida necessidade do contato parasito-célula, para o processo de morte celular. As células epiteliais, após adesão dos trofozoítos de *E. histolytica*, perdem suas funções em minutos. Perdem, também, seus grânulos citoplasmáticos e eventualmente seus núcleos (RAVDIN *et al.*, 2003, OKADA & NOZAKI, 2006).

O parasito invade e danifica o tecido através de uma seqüência de eventos com a participação de múltiplos fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro. Pelo menos três etapas já foram descritas na interação *in vitro* da ameba com diferentes alvos: aderência, citólise e fagocitose (PACHECO *et al.*, 2004).

Estudos *in vivo* permitiram a observação das alterações causadas pela invasão da mucosa do intestino, assim como no abscesso hepático amebiano (PACHECO *et al.*, 2004). A citólise é causada por uma família de no mínimo 3 pequenos peptídeos capazes de formarem poros na bicamada lipídica da célula do hospedeiro (STANLEY, 2003). Trofozoítos de *E. histolytica* podem, também, matar células do hospedeiro por apoptose. Esse processo foi detectado no abscesso amebiano do fígado e na doença intestinal em camundongos, sugerindo que células do epitélio intestinal ou células do fígado devam sofrer o mesmo processo. O sinal para a invasão da mucosa intestinal deve ser o contato entre trofozoítos e a proteína

de matriz extracelular, ou seja, é a fibronectina que dispara a cascata de sinais dentro do parasito e causa rearranjo na actina que altera a aderência e a motilidade do parasito. Proteinases são secretadas pelos trofozoítos de *E. histolytica* e grandes quantidades de cisteína-protease são observadas extracelularmente no abscesso induzido em animais. Trofozoítos de *E. histolytica* podem secretar de 10 a 1000 vezes mais cisteína-protease que os de *E. dispar*. As cisteína-proteases de *E. histolytica* digerem as proteínas da matriz extracelular, o que deve facilitar a invasão e progressão dos trofozoítos, na submucosa intestinal. Esta lesão pode apresentar uma extensão lateral na submucosa, dando lugar a ulcerações (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Trofozoítos de *E. histolytica* geneticamente construídos, deficientes em proteases, têm reduzida virulência e, em modelo de abscesso hepático de roedores, são menos invasivos e causam significativamente menos inflamação e dano aos tecidos. O próximo estágio depende da resposta do hospedeiro à infecção por *E. histolytica*. As células epiteliais começam a produzir mediadores que atraem neutrófilos, contribuindo para a **liberaração** de outros mediadores (causando diarreia e dano ao tecido). Embora a inflamação contribua claramente para o dano ao tecido, a imunidade inata tem um papel importante para conter e resolver o processo da colite amebiana. Indivíduos com colite amebiana, em uso de corticóides, apresentam agravamento da doença, com grande incidência de perfuração intestinal e abscesso amebiano do fígado (STANLEY, 2003).

Haque et al. (2001) utilizando exame microscópico e cultura, observaram nos pacientes diagnosticados com amebíase por *E. histolytica*, um maior número de indivíduos com sangue visível nas fezes, do que com diarreia de outra origem.

Posteriormente, mostraram que estes pacientes adquiriram imunidade contra a colonização de *E. histolytica*, através da proteção da mucosa intestinal por anticorpos IgA anti-lectina (HAQUE *et al.*, 2003).

As formas clínicas frequentemente observadas na amebíase, variam de colite não disentérica, disenteria amebiana a amebíase extra-intestinal.

A colite não disentérica apresenta sintomas que na maioria dos casos passam despercebidos. Traduz-se por evacuações, que podem ser diarréicas ou não e podem conter sangue e/ou muco. Pode ocorrer febre e desconforto abdominal. Há uma alternância entre períodos silenciosos e a manifestação clínica. A colite não disentérica deve ser tratada, pois ela pode evoluir para a forma invasiva da doença (HAQUE *et al.*, 2003; TANYUKSEL & PETRI, 2003).

Pacientes com disenteria amebiana apresentam diarréia muco sanguinolenta e dor abdominal. O início é gradual, com pacientes relatando várias semanas de sintomas. São comuns pequenos e múltiplos volumes de fezes mucóides, porém, pode ocorrer diarréia aquosa profusa. Como *E. histolytica* invade a mucosa do intestino, mesmo que o sangue não seja visível nas fezes, o exame de sangue oculto é positivo. Leucócitos podem estar presentes nas fezes, mas em quantidades inferiores à infecção bacteriana e em vários casos pode ser visualizado pus. Febre é observada em cerca de 40% dos pacientes, que podem apresentar anorexia e perda de peso (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Ocasionalmente os indivíduos desenvolvem colite amebiana com diarréia sanguinolenta profusa, febre, leucocitose, dor abdominal freqüente com peritonite e

extensa implicação do cólon. Pode ocorrer abscesso amebiano, mas a perfuração intestinal, em mais de 75% dos casos com colite amebiana fulminante, é a clínica dominante. Mulheres grávidas, indivíduos imunocomprometidos e pacientes recebendo corticóides, são de alto risco para a doença fulminante, assim como associação com diabetes e álcool (HAQUE *et al.*, 2003; STANLEY, 2003; STAUFFER & RAVDIN, 2003).

Alguns indivíduos podem manifestar as formas mais raras da colite amebiana que incluem o megacólon tóxico, o ameboma e as ulcerações perianais, com possíveis formações de fístulas. O megacólon tóxico é raro, aparecendo em 0,5% dos casos e é tipicamente associado com o uso de corticosteróides. A intervenção cirúrgica é necessária quando o paciente não responde ao tratamento com antiamebianos. O ameboma é o resultado da formação de tecido granulomatoso, que pode estar presente em um único sítio ou em sítios múltiplos no ceco ou cólon ascendente e pode ser confundido com uma neoplasia (HAQUE *et al.*, 2003; STANLEY, 2003).

A amebíase hepática é a forma extraintestinal mais comum que causa o maior número de mortes, cujo percentual varia nos diferentes estudos (SHAMSUZZAMAN *et al.*, 2000a, b). É dez vezes mais comum em homens e é rara em crianças (HAQUE *et al.*, 2003). O exame parasitológico de fezes é geralmente negativo para cistos e/ou trofozoítos.

A manifestação clínica mais comumente encontrada é a necrose liquefativa do fígado (abscesso hepático). Na maioria dos casos o abscesso é único, acometendo mais o lobo esquerdo (HUGHES & PETRI, 2000). O parasito provoca

um processo inflamatório difuso, degeneração celular e necrose liquefativa do parênquima, em consequência da ação enzimática dos trofozoítos. Se houver inflamação bacteriana concomitante, ocorre o agravamento do quadro clínico. O indivíduo apresenta dor no hipocôndrio direito, febre intermitente e irregular, hepatomegalia e fraqueza (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

A invasão do trato respiratório costuma ser secundária ao abscesso hepático após sua ruptura através do diafragma, o que ocorre em 7 a 20% dos pacientes com abscesso hepático. Esses pacientes desenvolvem tosse constante e dor no tórax. Este quadro leva a diagnósticos errôneos, uma vez que pode ser facilmente confundido com pneumonia bacteriana. Casos mais graves levam a formação de fístulas hepatobranquiais, com manifestações como a formação de catarro marrom contendo material necrótico e trofozoítos. Mais grave, porém menos comum, é a ruptura do abscesso para o pericárdio com mortalidade superior a 30%. Os sintomas são dor no peito, irritação no pericárdio, dispnéia e taquicardia (STANLEY, 2003).

Já a invasão do encéfalo formando abscesso encefálico é rara, e ocorre também após ruptura do abscesso hepático. Os sintomas são repentinos e são caracterizados por dor de cabeça, vômito, convulsão e mudanças de comportamento. Há relatos de que mais da metade dos pacientes com amebíase cerebral tiveram uma rápida progressão da doença e morreram (STANLEY, 2003).

Outros órgãos acometidos pela amebíase são os do sistema urinário, genital (podendo apresentar fístulas retovaginais), região perianal, pele e até osso, porém, são muito raros de serem observados (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

2.8 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da amebíase pode ser confirmado pela detecção de parasitos ou de seus antígenos nas fezes, pela detecção da resposta de anticorpos ao parasito no soro do paciente e por métodos moleculares.

Existem algumas técnicas capazes de detectar o parasito nas fezes do indivíduo infectado. Dentre elas têm-se a microscopia, que consiste em identificar trofozoítos e cistos utilizando amostras fecais fixadas e coradas. Infecções por *E. histolytica* não podem ser diagnosticadas utilizando apenas o critério morfológico. Esse tipo de método diagnóstico tem sido feito há muitos anos. Porém, os resultados dependem da habilidade dos técnicos que fazem a análise, pois a diferenciação de trofozoítos com leucócitos e outros protozoários intestinais pode ser difícil para um especialista não treinado. Com a descoberta do complexo *E. histolytica/E. dispar*, esse tipo de análise se tornou inapropriado e ineficiente, uma vez que estas espécies não podem ser distinguidas através de sua morfologia. Alguns pesquisadores, depois de várias discussões, relataram que dependendo da situação clínica do paciente (diarréia sanguinolenta) e das características morfológicas do parasito encontrado nas fezes (presença de eritrócitos fagocitados por *E. histolytica*), o diagnóstico através da microscopia é aceitável. Entretanto, este diagnóstico pode estar errado quando se tem um paciente com *E. dispar* associada com outro tipo de parasito, podendo levar a um falso diagnóstico de colite amebiana (AQUINO *et al.*, 1998; STANLEY, 2003; van HAL *et al.*, 2007).

Outra técnica empregada é a colonoscopia e a sigmoidoscopia flexível que são usadas em pacientes com colite aguda quando há suspeita de infecção por *E. histolytica*, quando esta não é detectada em amostras fecais.

Técnicas de cultura têm sido empregadas há mais de 100 anos para detectar o parasito. Porém, estes métodos consomem muito tempo e são extremamente trabalhosos, além de apresentarem uma sensibilidade muito baixa (em torno de 50%). Há a necessidade de mais testes para confirmar o diagnóstico. Este método é restrito a laboratórios especializados em pesquisas parasitológicas (van HAL *et al.*, 2007).

O método da detecção de antígeno utiliza anticorpos monoclonais específicos contra várias proteínas da *E. histolytica* (HAQUE *et al.*, 2000; SOLAYMANI-MOHAMMADI *et al.*, 2006). Alguns kits comerciais são capazes de detectar a presença do grupo *E. histolytica/dispar/moshkovskii*, enquanto outros são específicos para a *E. histolytica*. A sensibilidade deste método varia de 80% a 99% e a especificidade de 86% a 98%. As principais vantagens destes testes são a rapidez (resultado no mesmo dia) e a menor subjetividade na interpretação dos resultados que a microscopia (van HAL *et al.*, 2007). Porém, não são usados com muita frequência em áreas endêmicas, devido ao seu alto custo (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Os métodos moleculares utilizando a PCR amplificam os genes da *E. histolytica* extraídos do DNA fecal. A sensibilidade e a especificidade deste método é alta, 80% a 100% e 100%, respectivamente. As vantagens deste método são sua extrema sensibilidade, capaz de detectar <1 parasito, e a capacidade de diferenciar

as cepas não patogênicas da *E. histolytica*. A desvantagem é o elevado custo (GONIN & TRUDEL, 2003; SOLAYMANI-MOHAMMADI *et al.*, 2006, van HAL *et al.*, 2007).

A sorologia é uma metodologia específica, mas apresenta variações na sensibilidade dependendo da presença ou ausência da doença invasiva e do tipo da doença invasiva. A sensibilidade é cerca de 95% para casos de abscesso hepático amebiano e 84% para a doença intestinal invasiva (van HAL *et al.*, 2007). Resultados falso-negativos podem ser obtidos quando se utiliza o teste sorológico em fases iniciais da infecção, até os primeiros 10 dias. Testes posteriores a esse período relataram o resultado correto do exame (STANLEY, 2003), já que o paciente passa a apresentar altos títulos de anticorpos.

2.9 ESTUDOS *IN VIVO*

O uso de modelos *in vivo* na amebíase têm contribuído significativamente para o melhor conhecimento desta doença parasitária. Todavia, não existe um único modelo animal capaz de reproduzir todo o ciclo que este parasito realiza em seu hospedeiro, o homem. O uso de diferentes animais de laboratório, susceptíveis e resistentes, assim como vários anos de avaliação de distintas técnicas, permitiram uma melhor compreensão do parasito e da relação parasito-hospedeiro (TSUTSUMI & SHIBAYAMA, 2006).

Estudos da interação de *E. histolytica* com diferentes substratos, demonstraram os mecanismos patogênicos que participam da produção de lesões amebianas. A utilização de modelos animais para reproduzir as lesões intestinais e extra-intestinais, similares às observadas em seres humanos, teve grande contribuição no conhecimento para o tratamento e prevenção da amebíase (TSUTSUMI & SHIBAYAMA, 2006).

Embora o termo *histolytica* possa ser facilmente justificado pela capacidade lítica que este parasito apresenta em destruir tecidos, a interação parasito-hospedeiro é um mecanismo intrínseco e multifatorial, que constitui um fenômeno muito mais complexo que uma simples interação parasito-hospedeiro *in vitro*.

O desenvolvimento de uma cultura mantida sob condições axênicas para a pesquisa da amebíase, foi evidentemente importante para o acúmulo de informações obtidas através de seu agente etiológico (DIAMOND, 1961). Muitas informações da fisiopatologia, ultra-estrutura, biologia celular, bioquímica, imunologia, genética e biologia molecular de *E. histolytica*, foram obtidas nos últimos 35 anos e só foram possíveis através da utilização de culturas axenizadas (TSUTSUMI, 2006). A grande maioria dos trabalhos publicados utiliza a mesma cepa HM1-IMSS, cujos trofozoítos foram isolados há mais de 40 anos. Porém, a virulência desta cepa que era, a princípio, extremamente alta, declinou com os anos, sendo necessária a passagem dos trofozoítos em fígado de hamster, para restaurar esta virulência (TSUTSUMI, 2006).

A amebíase experimental usando modelos *in vivo* começou quando Lösch, produziu lesões intestinais em um dos cachorros inoculados com fezes de um paciente que apresentava disenteria (LESH, 1975). A partir disso, vários estudos utilizando cachorros, gatos, coelhos e macacos foram feitos, porém, atualmente, o uso destes animais é limitado devido a vários fatores como falta de uniformidade entre os indivíduos, dificuldade de manutenção e número insuficiente de animais. Até metade do século passado, a facilidade de acesso a algumas espécies de roedores para uso em pesquisas, ajudou a aumentar o conhecimento sobre a patogenicidade da amebíase, já que estes animais eram de fácil manuseio e rápida reprodução. Estes modelos de roedores foram usados em muitas aplicações práticas, incluindo estudos terapêuticos e imunoproliféricos. Todavia, um modelo animal que fosse capaz de reproduzir totalmente o ciclo do protozoário *E. histolytica* como o observado em humanos, ainda não foi possível. Além disso, não é possível a produção de lesões intestinais e extra-intestinais em animais alimentados com cistos de *E. histolytica*. Assim, parte dos estudos experimentais *in vivo* da amebíase foi realizada em modelos hepáticos e intestinais separados, injetando os trofozoítos diretamente no órgão alvo (TSUTSUMI & SHIBAYAMA, 2006).

2.10 AMEBÍASE HEPÁTICA EXPERIMENTAL EM HAMSTER

O hamster é, sem dúvida, o animal mais utilizado na amebíase hepática experimental, tanto pela inoculação direta no parênquima, quanto através do sistema porta. Os primeiros pesquisadores a utilizarem o hamster como modelo na amebíase

hepática foram Reinertson e Thompson ao inocularem a *E. histolytica* em cultivo misto (três espécies de bactérias), por via portal ou intra-hepática (REINERTSON & THOMPSON, 1951 *apud* TSUTSUMI, 2006; REINERTSON & THOMPSON, 1951 *apud* SILVA, 1997). Outros estudos usando o mesmo roedor, mas com cultivos axênicos, confirmaram a alta susceptibilidade e uniformidade das lesões causadas nestes animais (TANIMOTO *et al.*, 1971).

Este modelo tem sido empregado para estudo de quimioterapia experimental (BURCHARD & MIRELMAN, 1988; CARRERO *et al.*, 2006; ORDAZ-PICHARDO *et al.*, 2005), parâmetro para a caracterização de cepas isoladas de diferentes formas clínicas (TANIMOTO-WEKI, 1989), na comparação da virulência entre cepas (COSTA *et al.*, 2000; FURST *et al.*, 2002; COSTA *et al.*, 2006) e para detectar mudanças na virulência de cepas (OLIVOS *et al.*, 2005, COSTA *et al.*, 2006), entre outros.

Tsutsumi *et al.* (1984) foram uns dos precursores no estudo morfológico da inoculação hepática em períodos curtos. Ele sugeriu que os trofozoítos de *E. histolytica* não produziam abscessos hepáticos através da lise direta de hepatócitos, mas que esta destruição estava relacionada com as enzimas lisossomais liberadas pela destruição de células inflamatórias que se acumulavam ao redor dos trofozoítos e que posteriormente eram mortas por eles. Este relato foi confirmado por vários autores como Stanley (2003), Sim *et al.* (2004), Sharma *et al.* (2005), Blazquez *et al.* (2006), Gutierrez-Alarcon *et al.* (2006) e Perez-Tamayo *et al.* (2005).

Além do hamster, um grande número de estudos têm sido feitos com outros roedores (camundongos, ratos, gerbilinos). Porém, uma ampla variação da

patogenicidade de uma mesma cepa de amebas tem sido constatada para as várias espécies de animais. Segundo Silva (1997), não há um modelo que possa ser usado como parâmetro fiel, através do qual a amebíase experimental pudesse ser comparada à humana, sem grandes variações.

2.11 HIPÓTESE

Entamoeba histolytica e *Entamoeba díspar* apresentam diferente grau de patogenicidade, que pode ser demonstrado em modelo de formação de abscesso hepático em hamster, através de inoculação direta no parênquima hepático.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o grau de patogenicidade de cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* através da formação de abscesso hepático amebiano em hamster.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Acompanhar através de modelo experimental em hamster a formação do abscesso hepático por cepa de *E. histolytica*;
- Verificar através de modelo experimental em hamster as lesões hepáticas induzidas por cepa de *E. dispar*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPA DE *E. DISPAR*

Para caracterização e análise da *E. dispar*, utilizamos uma cepa isolada e gentilmente cedida pelo Prof. José Mauro Peralta, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Esta cepa foi isolada de paciente do sexo feminino, 38 anos, alfabetizada e que trabalha na lavoura. Ela morava em uma casa de 5 cômodos, com iluminação e esgoto encanado que desembocava em um rio. O lixo produzido na residência era lançado a céu aberto na região peri-domiciliar e queimado periodicamente. Criava cachorro, gato e porco próximo à residência. Fazia uso de água de nascente. Relatou nunca ter apresentado verminoses nem outra doença. Não fazia uso de bebidas alcoólicas, fumo ou medicamentos e não se alimentava de alimentos crus. A paciente não apresentava diarreia e nunca fora hemo-transfundida. Residia na zona

rural do município de Sumidouro, localizado na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro a 109km da capital Rio de Janeiro (Figura 3). De acordo com dados do IBGE (2000), a população local foi estimada em 14.176 habitantes, dos quais 83,5% viviam na zona rural e 16,3% na zona urbana. A maioria dos domicílios - 95,24% - **apresentava** esgotamento sanitário através de rio, 72,86% dos domicílios eram abastecidos por poços ou nascentes e 3,06% domicílios não tinham banheiros.



Figura 3 - Mapa do Estado do Rio de Janeiro com a localização do Município de Sumidouro (em vermelho). * Adaptado de http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2c/RiodeJaneiro_Municip_Sumidouro.svg/800pxRiodeJaneiro_Municip_Sumidouro.svg.png (em 23/11/2007).

4.2 MANUTENÇÃO DAS CULTURAS

4.2.1 *E. HISTOLYTICA*

As culturas de *E. histolytica* (HM1-IMSS e EGG) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Edward Félix Silva, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Elas foram mantidas em tubos de vidro 150mm x 10mm com tampa rosqueável contendo 15mL de meio TYI-S-33 (DIAMOND *et al.*, 1978) cuja formulação encontra-se no anexo 2. Os tubos foram mantidos em posição inclinada, para aderência dos trofozoítos à parede do tubo, em estufa a 37°C. Foram feitos repiques a cada 72h.

4.2.2 *E. DISPAR*

A cultura de *E. dispar* (03C) também foi mantida em tubos de vidro 150mm x 10mm com tampa rosqueável contendo 10mL de meio Pavlova modificado por Silva (1972) cuja formulação encontra-se no anexo 1. Os tubos foram mantidos em posição vertical, em estufa a 37°C. Foram realizados repiques a cada 72h.

4.3 CRIOPRESERVAÇÃO DAS CEPAS

4.3.1 CONGELAMENTO

Tanto as cepas de *E. histolytica*, quanto a de *E. dispar* foram criopreservadas em nitrogênio líquido para que possíveis contaminações fossem evitadas, além de se preservar as características biológicas das cepas.

Foram utilizadas culturas em crescimento exponencial através da soma de vários tubos. Os tubos foram resfriados em banho de gelo por 10 minutos e centrifugados a 1500rpm. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos lavados em PBS pH 7,2. Em seguida, os trofozoítos foram ressuspensos em solução crioprotetora (Anexo 3) e deixados em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente. Após este período, os trofozoítos foram levemente homogeneizados à solução e distribuídos em tubos criogênicos de 1,8mL.

Os tubos foram, então, colocados no “freezing tray” MVE nº 97 1966-9 com um termômetro acoplado e congelados segundo a técnica de abaixamento gradual de temperatura. Na fase inicial (temperatura ambiente a 0°C), o abaixamento foi feito a cada 5°C por minuto. Na segunda fase (0°C a -45°C), o abaixamento foi feito a cada 2°C por minuto. Na terceira fase, os tubos eram mergulhados no nitrogênio líquido onde permaneciam por 30 minutos. Em seguida foram transferidos para suportes acondicionados em botijões de nitrogênio líquido.

4.3.2 DESCONGELAMENTO

Para verificar o resultado do congelamento, após uma semana, 1 tubo de cada cepa foi descongelado em banho-maria a 37°C, s em agitação, e seu conteúdo passado gota a gota para tubos com meio de cultura (TYI-S-33 ou Pavlova, de acordo com cada cepa) e incubados a 37°C. Parte do material descongelado foi colocado entre lâmina e lamínula e corado com eosina 0,125% para teste de viabilidade. Após 4h, os tubos foram centrifugados a 1000rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionou-se novo meio de cultura aos tubos, que foram incubados por mais 24h a 37°C. O procedimento foi repetido ob servando-se o desenvolvimento das culturas até repique.

4.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

4.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de DNA genômico extraído de culturas em fase exponencial de crescimento. A extração foi realizada com o QIAamp DNA Mini Kit® System (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas por espectrofotometria a 260nm.

4.4.2 REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO (MULTIPLEX-PCR)

A reação de amplificação foi realizada seguindo os procedimentos descritos por NUÑEZ et al. (2001), com algumas modificações. Segundo os autores, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados a partir de seqüências polimórficas altamente repetitivas, localizadas na subunidade menor do rRNA. As seqüências alvo foram amplificadas utilizando um par de oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada espécie. Para *E. dispar* foi utilizado o EdP1 (5' 'ATGGTGAGGTTGTAGCAGAGA 3') e EdP2 (5' CGATATTGACCTAGTACT 3'), sendo gerado um produto de 96 pares de bases (pb). Para *E. histolytica* foi utilizado EhP1 (5' CGATTTTCCCAGTAGAAATTA 3') e EhP2 (5'CAAATGGTCGTCTAGGC 3'), sendo gerado um produto de 132pb. O volume final da mistura da reação foi de 50µl, contendo: tampão 20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 40pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador específico ("primer"); 250µM de cada nucleotídeo (dNTPs) e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, USA), 0,1% de albumina de soro bovino (BSA – Sigma Chem. Co., USA) e 2µl de DNA extraído.

A etapa de amplificação foi realizada em 30 ciclos, onde cada ciclo apresentou uma fase de desnaturação a 94°C por 30 segundos, uma fase de anelamento a 55°C por 30 segundos e uma fase de extensão a 72°C por 30 segundos. Antes do primeiro ciclo, ocorreu uma fase de pré-desnaturação a 94°C por três minutos, e após o último ciclo ocorreu a fase de extensão final a 72°C por sete minutos. Foi utilizado o termociclador geneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, USA).

Foram utilizados os seguintes controles na reação de amplificação: controle positivo (DNA extraído das cepas HM1-IMSS e EGG de *E. histolytica*, DNA extraído das cepas 03C e P2 de *E. dispar*), controle branco (todos os reagentes da mistura de reação, exceto o DNA que foi substituído por água ultra pura) e controle negativo (DNA humano, DNA da flora, DNA extraído da cepa de *E. moshkoviskii*).

4.4.3 DETECÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Foram utilizados 10µl dos produtos de amplificação obtidos na Multiplex-PCR para a análise por eletroforese (cuba de eletroforese, modelo HE33 - Hoefer Scientific Instruments, USA) em gel de agarose a 2% (Invitrogen Life Technologies, USA). Como marcador de peso molecular foram utilizados 5µl do “100 pb ladder” (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, SE) para estimar os tamanhos dos produtos amplificados. O gel a 2% foi preparado em tampão TBE (1M Tris-borato, 0,01M EDTA, pH 8,4). O gel foi submetido à tensão de 100V por aproximadamente 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio numa concentração de 0,5µg/ml (SAMBROOK et al., 1998) por 10 minutos e lavado em água destilada por 30 minutos. A inspeção visual do gel foi feita no transiluminador (Sigma Chem. Co., USA, modelo T1201) de luz ultravioleta, seguida da análise automatizada realizada com o auxílio do sistema de análise de imagens, empregando o programa Molecular Analyst, versão 1.12 (Bio-Rad).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA FLORA BACTERIANA

Foram utilizados 100µL da flora de cultivo de *E. dispar*, sendo transferidos para um tubo contendo 10mL de meio Pavlova e mantidos por 24 horas a 37°C. Após este período, as células eram diluídas em PBS na proporção de 1:10⁶ (meio com a flora : PBS), plaqueadas em agar sangue e mantidas por 24 horas a 37°C. A quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC)/mL foi determinada, assim como algumas das espécies de bactérias que estavam presentes no cultivo. O experimento foi feito em triplicata.

4.6 ESTUDO IN VIVO

4.6.1 PREPARAÇÃO DAS CULTURAS PARA A INOCULAÇÃO

4.6.1.1 Crescimento das bactérias

Foram utilizados 100µL da flora do cultivo de *E. dispar*, sendo transferidos para um tubo contendo 10mL de meio Pavlova e mantidos por 24 horas a 37°C.

4.6.1.2 Interação ameba-bactéria

Para que houvesse uma padronização entre as culturas, as cepas de *E. histolytica* foram polixenizadas com a flora do cultivo de *E. dispar*.

Amebas e bactérias eram colocadas em um mesmo tubo, com um volume determinado de meio Pavlova, de modo a se obter uma relação ameba/bactéria na ordem de uma ameba para 1.000 bactérias (1/1.000) (SILVA, 1997). As amebas e bactérias associadas eram mantidas a 37°C, pelo período de 2 horas.

4.6.1.3 Preparação das células para as inoculações

4.6.1.3.1 *E. dispar*

Foram utilizadas culturas em garrafas de cultivo com trofozoítos em fase de crescimento exponencial (48/72h de cultivo). A cepa de *E. dispar* foi crescida em cultivo até o esgotamento dos grãos de amido no meio e no interior dos trofozoítos. O meio sobrenadante foi retirado e substituído por PBS pH 7,2 a 37°C, agitando-se levemente a garrafa para lavar os trofozoítos aderidos. Este procedimento foi repetido mais uma vez e as garrafas foram transferidas para banho de gelo por 10 minutos. Após este período, o conteúdo das garrafas foi transferido para um tubo e centrifugado a 200 x g por 10 minutos. Os trofozoítos foram contados em câmara de Neubauer, observando-se a respectiva viabilidade através da eosina 0,125%. As

amebas sedimentadas foram diluídas em meio Pavlova de modo a ajustar a concentração de 5×10^5 trofozoítos por 100 μ L de meio.

4.6.1.3.2 *E. histolytica*

Os trofozoítos das cepas de *E. histolytica*, após o período de interação com as bactérias, foram lavados duas vezes com PBS pH 7,2 a 37°C e os tubos transferidos para banho de gelo por 10 minutos. Após este período, repetiu-se o mesmo procedimento descrito anteriormente.

4.6.1.3.3 Bactérias

As bactérias oriundas do cultivo anteriormente descrito foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em PBS pH 7,2 a 37°C e novamente centrifugadas. Em seguida, as bactérias sedimentadas foram diluídas em meio Pavlova de modo a ajustar a concentração de 5×10^8 bactérias por 100 μ L de meio.

4.6.2 INOCULAÇÃO EM FÍGADO DE HAMSTER

4.6.2.1 Animais

Foram utilizados 60 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) de ambos os sexos, com idade em torno de 3 a 4 semanas, peso médio entre 75 e 85g, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais.

Os animais foram divididos em grupos e alojados em gaiolas de polipropileno, de forma coletiva, da seguinte forma:

- grupo controle sham teve a cavidade abdominal aberta e fechada (n=6);
- grupo controle meio foi inoculado apenas com o meio de cultura estéril (Pavlova) (n=6);
- grupo controle flora foi inoculado com a flora bacteriana (n=12);
- grupo tratado *E. dispar* cepa 03C (n=12);
- grupo tratado *E. histolytica* cepa HM1-IMSS (n=12);
- grupo tratado *E. histolytica* cepa EGG (n=12).

4.6.2.2 Inoculação

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital Sódico 30mg (Hypnol 3% - Fontoveter®) na concentração de 79mg/kg via intraperitoneal (SILVA, 1997). Em seguida, sob condições estéreis, foi feita uma incisão longitudinal, de cerca de 1cm de extensão, na linha média do corpo. Com o lobo esquerdo exposto, as inoculações foram feitas diretamente no lobo, num volume de 100µL. A sutura foi realizada em um plano com fio absorvível.

Os animais foram sacrificados mediante deslocamento cervical 1, 3 e 6 dias pós-inoculação.

O procedimento cirúrgico e todo o protocolo experimental foram feitos seguindo as normas de vivisseção de animais descritas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) previsto na Lei nº 6. 638, de 08 de maio de 1979.

4.6.3 ESTUDO MACROSCÓPICO

Após o sacrifício, os animais foram pesados e necropsiados, o fígado foi totalmente removido e pesado em balança eletrônica de alta precisão (Marte – ALS). A macroscopia da lesão hepática foi descrita de acordo com os seguintes critérios:

- 1) cor;
- 2) tamanho;
- 3) aspecto da superfície;
- 4) formato;
- 5) consistência.

Além disso, foi determinada a incidência (número de animais com lesão hepática contendo amebas pelo número de animais inoculados) e a gravidade das lesões, avaliada por critério baseado na classificação de Diamond (1974), conforme descrito a seguir:

- Grau 0 – fígado normal, fibrose no ponto de inoculação ou lesão bacteriana menor que 4mm (ausência de amebas);
- Grau I – lesão no ponto de inoculação menor que 15mm de diâmetro;
- Grau II – lesão maior que 15mm, sem disseminação;
- Grau III – lesão no lobo primário, algumas disseminações para outras áreas;
- Grau IV – lesão extensa, com disseminações, mínimo de 50% do fígado comprometido.

Um fragmento de cada lesão foi macerado em PBS pH 7,2 entre lâmina e lamínula para verificação microscópica da presença de trofozoítos.

4.6.4 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Após o estudo macroscópico, o órgão foi fixado em formol 10% tamponado, clivado, processado e incluído em parafina. Os cortes histológicos de 4 micra foram corados pela hematoxilina e eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS), Tricrômico de Gomori e von Kossa. Além disso, do material formolizado foram feitos cortes de 10µm por congelação em criostato que foram corados com Sudan III.

Através de exame microscópico avaliamos o parênquima hepático e o abscesso formado pelas inoculações. Utilizamos como critérios de análise:

- presença ou ausência de hemorragia;
- presença ou ausência de esteatose e degeneração hidrópica;
- tipo de infiltrado inflamatório, sua localização e células envolvidas;
- abscesso único ou múltiplo;
- presença ou ausência de amebas no abscesso;
- presença ou ausência de calcificação no abscesso;
- presença ou ausência de tecido de granulação;
- presença ou ausência de fibrose.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS

A amplificação foi específica para cada par de primers. As bandas de 132pb correspondem ao produto amplificado pelos oligonucleotídeos EhP1/EhP2 e as bandas de 96pb correspondem ao produto amplificado pelos oligonucleotídeos EdP1/EdP2.

Os primers de *E. histolytica* amplificaram apenas o DNA das cepas EGG e HM1-IMSS e não amplificaram o DNA das cepas de *E. dispar* (03C) e *E. moshkoviskii*. Já os primers de *E. dispar* amplificaram apenas o DNA das cepas 03C e P2 e não amplificaram o DNA das cepas de *E. histolytica* (EGG e HM1-IMSS) e *E. moshkoviskii*. Não houve amplificação do DNA da flora e nem da *E. moshkoviskii* (Figura 4). Sendo assim, foi possível afirmar que a cepa 03C pertence à espécie *E. dispar*.

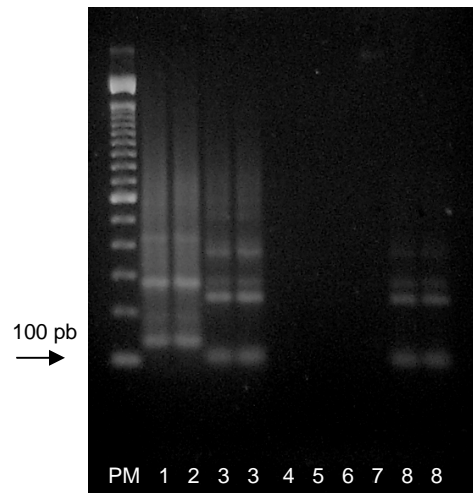


Figura 4 – Produtos amplificados através de Multiplex-PCR com primer EdP1/P2 e EhP1/P2. **PM** – padrão de peso molecular. **1** – *E. histolytica* (HM1). **2** – *E. histolytica* (EGG). **3** – *E. dispar* (03C). **4** – Flora (bactérias). **5** – Negativo. **6** – Branco. **7** - *E. moshkoviskii*. **8** – *E. dispar* (P2).

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA FLORA BACTERIANA

Através do plaqueamento em agar sangue da flora bacteriana de cultivo da cepa 03C verificou-se que havia aproximadamente $2,5 \times 10^9$ UFC/mL de meio. Além disso, o exame qualitativo das colônias determinou a presença predominante de *Escherichia coli*.

5.3 MACROSCOPIA

Nos animais sacrificados 1 dia pós-inoculação, não houve diferença numérica do peso corporal entre os grupos EGG, 03C, controle flora e controle meio, cujos valores variaram entre 79,6g e 81,5g. O maior peso corporal foi registrado no grupo sham (86,9g). Os grupos tratados (HM1, EGG e 03C) apresentaram peso do

fígado semelhante, variando entre 4,3g e 4,4g, assim como os grupos controle (flora, meio e sham) com 4,6g. A relação % peso do fígado/peso corporal mostrou que os grupos EGG, 03C e sham apresentaram valores numéricos semelhantes entre si, variando entre 5,3% e 5,4%, assim como os grupos HM1, controle flora e controle meio, que variaram entre 5,7% e 5,9% (tabela 1).

Tabela 1 – Média e desvio padrão do peso corporal, peso do fígado e relação % peso do fígado/peso corporal 1 dia pós-inoculação

Grupo	Peso corporal (g)	Peso do fígado (g)	Relação % peso do fígado/peso corporal
HM1	74,3 (± 6,2)	4,4 (± 0,1)	5,9 (± 0,6)
EGG	79,6 (± 0,8)	4,3 (± 0,1)	5,4 (± 0,1)
03C	81,2 (± 2,2)	4,3 (± 0,2)	5,3 (± 0,1)
Flora	81,5 (± 5,8)	4,6 (± 0,3)	5,7 (± 0,1)
Meio	81,1 (± 1,5)	4,6 (± 0,1)	5,7 (± 0,1)
Sham	86,9 (± 0,4)	4,6 (± 0,1)	5,3 (± 0,1)

A figura 5 mostra o aspecto macroscópico do fígado de hamster após 1 dia de inoculação. Todos apresentaram cor vermelho escura e superfície lisa e brilhante. Todos os grupos tratados e o controle flora apresentaram lesões compatíveis com abscesso de cor acastanhada, superfície plana e consistência pastosa. Foi observada aderência do fígado com a parede abdominal, do fígado com as alças intestinais e das alças intestinais com a parede abdominal nos grupos HM1, EGG, 03C e controle flora.

Figura

Figura 5 – Aspecto macroscópico do fígado de hamster 1 dia pós-inoculação – órgão de cor vermelho escura, superfície lisa e brilhante. **A** - grupo controle flora – lesão de cor acastanhada, fusiforme e superfície plana (seta). **B** - grupo HM1-IMSS (*E. histolytica*) – lesão de cor acastanhada, fusiforme e superfície plana (seta). **C** - grupo EGG (*E. histolytica*) – lesão de cor acastanhada, irregular e superfície plana (seta). **D** - grupo 03C (*E. dispar*) – lesão de cor acastanhada, irregular e superfície plana (seta). Barra = 1cm.

O tamanho e o formato da lesão variaram de acordo com o grupo (tabela 4). Os grupos HM1, 03C e controle flora apresentaram lesões com tamanhos semelhantes, de 2 a 4mm. Apenas o grupo EGG apresentou lesão com tamanho bem maior (10 x 5mm). Em relação ao formato, os grupos controle flora e HM1 apresentaram lesões fusiformes. Já os grupos 03C e EGG apresentaram lesões irregulares. Não foram observadas lesões nos grupos controle meio e controle sham.

Tabela 2 – Características macroscópicas da lesão intra-hepática em hamster 1 dia pós-inoculação

Grupo	Cor	Tamanho (mm)	Superfície	Formato	Consistência
HM1	acastanhada	2 x 2	plana	fusiforme	pastosa
EKG	acastanhada	10 x 5	plana	irregular	pastosa
03C	acastanhada	2 x 2	plana	irregular	pastosa
Flora	acastanhada	4 x 2	plana	fusiforme	pastosa
Meio	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l
Sham	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l

s/l – sem lesão

Segundo a classificação de acordo com o critério estabelecido por Diamond (1974), o grupo HM1 apresentou três animais com lesão grau I e um animal com lesão grau 0. Já o grupo EKG apresentou três animais com lesão grau I. O grupo 03C apresentou um animal com lesão grau I e dois animais com lesão grau 0. O grupo controle flora apresentou os quatro animais com lesão grau 0. Os demais grupos controle (meio e sham) não apresentaram qualquer tipo de lesão (tabela 3).

Tabela 3 – Lesão amebiana intra-hepática em hamster 1 dia pós-inoculação

Grupo	Nº de animais com lesão/nº inoculados	Grau de lesão ^b				
		0	I	II	III	IV
HM1	3/4	1	3	0	0	0
EKG	3/3 ^a	0	3	0	0	0
03C	1/3 ^a	2	1	0	0	0
Flora	0/4	4	0	0	0	0
Meio	0/2	0	0	0	0	0
Sham	0/2	0	0	0	0	0

a – morte de 1 animal durante o experimento (desprezado).

b – grau de lesão avaliado como a seguir:

0 – fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana < 4mm (ausência de amebas);

I – lesão no ponto de inoculação menor que 15mm de diâmetro;

II – lesão maior que 15mm, sem disseminação;

III – lesão no lobo primário, algumas disseminações para outras áreas;

IV – lesão extensa, com disseminação, mínimo de 50% do fígado comprometido.

No período 3 dias pós inoculação, todos os grupos, com exceção do grupo controle sham e do grupo HM1, apresentaram peso corporal semelhante, cujos valores variaram entre 78,3g e 82,9g. O menor peso corporal foi registrado no grupo HM1 (75,0g) e o maior no grupo sham (91,8g). Em relação ao peso do fígado, todos os grupos apresentaram valores numéricos semelhantes, variando entre 4,0g e 4,3g. O valor numérico da relação % peso do fígado/peso corporal dos grupos HM1, EGG, 03C e controle flora foi semelhante, variando entre 5,1% e 5,4%, assim como o valor numérico dos grupos controle meio e controle sham, 4,8% e 4,4, respectivamente (tabela 4).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do peso corporal, peso do fígado e relação % peso do fígado/peso corporal 3 dias pós-inoculação

Grupo	Peso corporal (g)	Peso do fígado (g)	Relação % peso do fígado/peso corporal
HM1	75,0 (± 1,3)	4,1 (± 0,6)	5,4 (± 0,8)
EGG	78,7 (± 2,3)	4,3 (± 0,1)	5,5 (± 0,1)
03C	82,0 (± 5,8)	4,2 (± 0,3)	5,1 (± 0,04)
Flora	78,3 (± 6,0)	4,2 (± 0,4)	5,4 (± 0,3)
Meio	82,9 (± 12,4)	4,0 (± 1,0)	4,8 (± 0,5)
Sham	91,8 (± 1,5)	4,1 (± 0,1)	4,4 (± 0,01)

Estes animais apresentaram fígado de cor vermelho escura e superfície lisa e brilhante. As lesões foram bem distintas das do período anterior (figura 6). A consistência da lesão compatível com abscesso era pastosa nos grupos tratados e controle flora. Os grupos HM1 e controle flora apresentaram lesões de cor acastanhada. Já o grupo EGG apresentou lesões de cor brancacenta, bem diferente da apresentada pelo grupo 03C (amarelada). O aspecto da superfície, o formato e o

tamanho também se mostraram diferentes entre os grupos. Observou-se aderência do fígado com a parede abdominal, do fígado com as alças intestinais e das alças intestinais com a parede abdominal no grupo 03C e controle flora.

Figura

Figura 6 – Aspecto macroscópico do fígado de hamster 3 dias pós-inoculação – órgão de cor vermelho escura, superfície lisa e brilhante. **A** - grupo controle meio – sem lesão. **B** - grupo controle sham – sem lesão. **C** - grupo controle flora – lesão de cor acastanhada, irregular e superfície plana (seta). **D** - grupo HM1-IMSS (*E. histolytica*) – lesão de cor acastanhada, irregular e superfície plana (seta). **E** - grupo EGG (*E. histolytica*) – lesão de cor brancacenta, arredondada e superfície elevada (seta). **F** - grupo 03C (*E. dispar*) – lesão de cor amarelada, irregular e superfície elevada (seta). Barra = 1cm.

O grupo HM1 apresentou lesões com tamanho entre 4 x 4mm, superfície plana e formato irregular. O grupo EGG apresentou lesões com tamanho médio de 4 x 5mm, superfície elevada e formato arredondado. Já no grupo 03C, as lesões foram de tamanho bem maior que as encontradas nos outros grupos (7 x 8mm), superfície elevada e formato muito irregular, sem delimitação das bordas. O grupo controle flora apresentou lesão bem semelhante à encontrada nos animais sacrificados 1 dia pós-inoculação, ou seja, tamanho 2 x 2mm, superfície plana e formato fusiforme (tabela 9). Os grupos controle meio e controle sham não apresentaram lesão.

Tabela 5 – Características macroscópicas da lesão intra-hepática em hamster 3 dias pós-inoculação

Grupo	Cor	Tamanho (mm)	Superfície	Formato	Consistência
HM1	acastanhada	4 x 4	plana	irregular	pastosa
EGG	brancacenta	4 x 5*	elevada	arredondada	pastosa
03C	amarelada	7 x 8	elevada	irregular	pastosa
Flora	acastanhada	2 x 2	plana	irregular	pastosa
Meio	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l
Sham	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l

s/l – sem lesão

*dois dos animais apresentaram lesão no interior do órgão, dificultando a medição externa.

Segundo a classificação de Diamond (1974), o grupo HM1 apresentou um animal com lesão grau I e três animais com lesão grau 0. O grupo EGG apresentou quatro animais com lesão grau III, já que havia lesão amebiana no lobo primário e algumas disseminações para outras áreas. Já o grupo 03C apresentou dois animais com lesão grau II e um animal com lesão grau 0. O grupo controle flora apresentou lesão com grau 0, pois, assim como no dia 1, não foram encontrados trofozoítos nas

lesões, em todos os animais (tabela 6). Os demais grupos controle (meio e sham) não apresentaram qualquer tipo de lesão.

Tabela 6 – Lesão amebiana intra-hepática em hamster 3 dias pós-inoculação

Grupo	Nº de animais com lesão/nº inoculados	Grau de lesão ^b				
		0	I	II	III	IV
HM1	1/4	3	1	0	0	0
EGG	4/4	0	0	0	4	0
03C	2/3 ^a	1	0	2	0	0
Flora	0/4	4	0	0	0	0
Meio	0/2	0	0	0	0	0
Sham	0/2	0	0	0	0	0

a – morte de 1 animal durante o experimento (desprezado).

b – grau de lesão avaliado como a seguir:

0 – fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana < 4mm (ausência de amebas);

I – lesão no ponto de inoculação menor que 15mm de diâmetro;

II – lesão maior que 15mm, sem disseminação;

III – lesão no lobo primário, algumas disseminações para outras áreas;

IV – lesão extensa, com disseminações, mínimo de 50% do fígado comprometido.

No período 6 dias pós-inoculação, o peso do fígado dos grupos 03C e HM1 foi numericamente menor (4,1g e 4,0g, respectivamente) quando comparado aos demais grupos, que variaram entre 4,5g e 4,8g. Os grupos controle meio e controle sham apresentaram peso corporal semelhante, respectivamente 88,8g e 93,2g, e maior quando comparado aos demais grupos que variaram entre 79,7g e 82,8g. Em contrapartida, a relação % peso do fígado/peso corporal entre os grupos EGG e controle flora foi numericamente semelhante (5,6g e 5,5g, respectivamente) e maior em relação aos demais grupos que apresentaram média variando de 4,9% e 5,1% (tabela 7).

Tabela 7 – Média e desvio padrão do peso corporal, peso do fígado e relação % peso do fígado/peso corporal 6 dias pós-inoculação

Grupo	Peso corporal (g)	Peso do fígado (g)	Relação % peso do fígado/peso corporal
HM1	79,7 (± 0,5)	4,0 (± 0,1)	5,1 (± 0,1)
EKG	80,5 (± 0,9)	4,5 (± 0,3)	5,6 (± 0,3)
03C	82,8 (± 2,5)	4,1 (± 0,1)	4,9 (± 0,1)
Flora	81,0 (± 1,2)	4,5 (± 0,2)	5,5 (± 0,2)
Meio	88,8 (± 0,1)	4,6 (± 0,1)	5,1 (± 0,1)
Sham	93,2 (± 1,6)	4,8 (± 0,2)	5,1 (± 0,1)

Os animais sacrificados 6 dias pós-inoculação apresentaram lesões hepáticas bem distintas dos outros dois períodos, ou porque evoluíram para reparo da lesão ou por estas persistirem e evoluírem com aumento do tamanho do abscesso (grupo EKG). O grupo HM1 apresentou fígado de cor vermelho escura com superfície lisa e brilhante e lesão de cor acastanhada. Já o grupo 03C apresentou fígado pálido de superfície lisa e brilhante com lesão de cor brancacenta. O grupo EKG apresentou fígado muito pálido de superfície lisa e brilhante e lesão de cor brancacenta e áreas avermelhadas (figura 7). Houve aderência do fígado com a parede abdominal, do fígado com as alças intestinais e das alças intestinais com a parede abdominal no grupo EKG.

Figura

Figura 7 – Aspecto macroscópico do fígado de hamster 6 dias pós-inoculação. **A** - grupo controle flora – fígado de aspecto normal. **B** - grupo HM1-IMSS (*E. histolytica*) – lesão de cor acastanhada, puntiforme e superfície plana (seta) em fígado de cor vermelho escura e superfície lisa e brilhante. **C** - grupo EGG (*E. histolytica*) – lesão de cor brancacenta com áreas avermelhadas, ovalada e superfície elevada (seta) em fígado muito pálido de superfície lisa e brilhante. **D** - grupo 03C (*E. dispar*) – lesão de cor brancacenta, arredondada e superfície elevada (seta) em fígado pálido de superfície lisa e brilhante. Barra = 1cm.

O grupo HM1 apresentou lesão muito pequena (1 x 1mm), com superfície plana e formato puntiforme. O grupo 03C apresentou lesão de tamanho reduzido quando comparada com os outros períodos (3 x 3mm), superfície elevada e formato arredondado. Já o grupo EGG apresentou lesão extensa que acometia mais de 50% do órgão (30 x 20mm), superfície elevada e formato ovalado. Todos os grupos

apresentaram lesão de consistência pastosa. Não foram observadas lesões nos grupos controle flora, controle meio e controle sham (tabela 14).

Tabela 8 – Características macroscópicas da lesão intra-hepática em hamster 6 dias pós-inoculação

Grupo	Cor	Tamanho (mm)	Superfície	Formato	Consistência
HM1	acastanhada	1 x 1	plana	puntiforme	pastosa
EKG	brancacenta c/ áreas avermelhadas	30 x 20	elevada	ovalada	pastosa
03C	brancacenta	3 x 3	elevada	arredondada	pastosa
Flora	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l
Meio	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l
Sham	s/l	s/l	s/l	s/l	s/l

s/l – sem lesão

De acordo com o critério de classificação da lesão estabelecido por Diamond (1974), o grupo 03C apresentou um animal com lesão grau I e três animais com lesão grau 0. O grupo EKG apresentou lesão amebiana com grau IV, pois houve lesão extensa, com disseminação e mais de 50% do fígado ficou comprometido, em todos os animais. Neste período, assim como nos outros, foi possível observar vários trofozoítos quando o material do abscesso era observado ao microscópio de luz. O grupo HM1 não apresentou abscesso amebiano, tendo suas lesões classificadas como grau 0 em todos os animais. Os grupos controle flora, meio e sham não apresentaram qualquer tipo de lesão hepática neste período (tabela 9).

Tabela 9 – Lesão amebiana intra-hepática em hamster 6 dias pós-inoculação

Grupo	Nº de animais com lesão/nº inoculados	Grau de lesão ^a				
		0	I	II	III	IV
HM1	0/4	4	0	0	0	0
EKG	4/4	0	0	0	0	4
03C	1/4	3	1	0	0	0
Flora	0/4	0	0	0	0	0
Meio	0/2	0	0	0	0	0
Sham	0/2	0	0	0	0	0

a – grau de lesão avaliado como a seguir:

0 – fígado normal, fibrose no local ou lesão bacteriana < 4mm (ausência de amebas);

I – lesão no ponto de inoculação menor que 15mm de diâmetro;

II – lesão maior que 15mm, sem disseminação;

III – lesão no lobo primário, algumas disseminações para outras áreas;

IV – lesão extensa, com disseminações, mínimo de 50% do fígado comprometido.

Todos os animais experimentaram ganho de peso corporal ao longo do período de 6 dias, exceto os grupos EKG e flora que tiveram perda de peso no dia 3 e ganho no dia 6.

A figura 8 mostra a evolução do peso do fígado no período até 6 dias pós-inoculação. Os grupos HM1 e 03C apresentaram queda progressiva do peso ao longo dos 3 períodos. Diferentemente, o grupo EKG apresentou aumento progressivo de peso ao longo do período. Os demais grupos apresentaram queda no peso do órgão no período 3 dias pós-inoculação e recuperação no período seguinte.

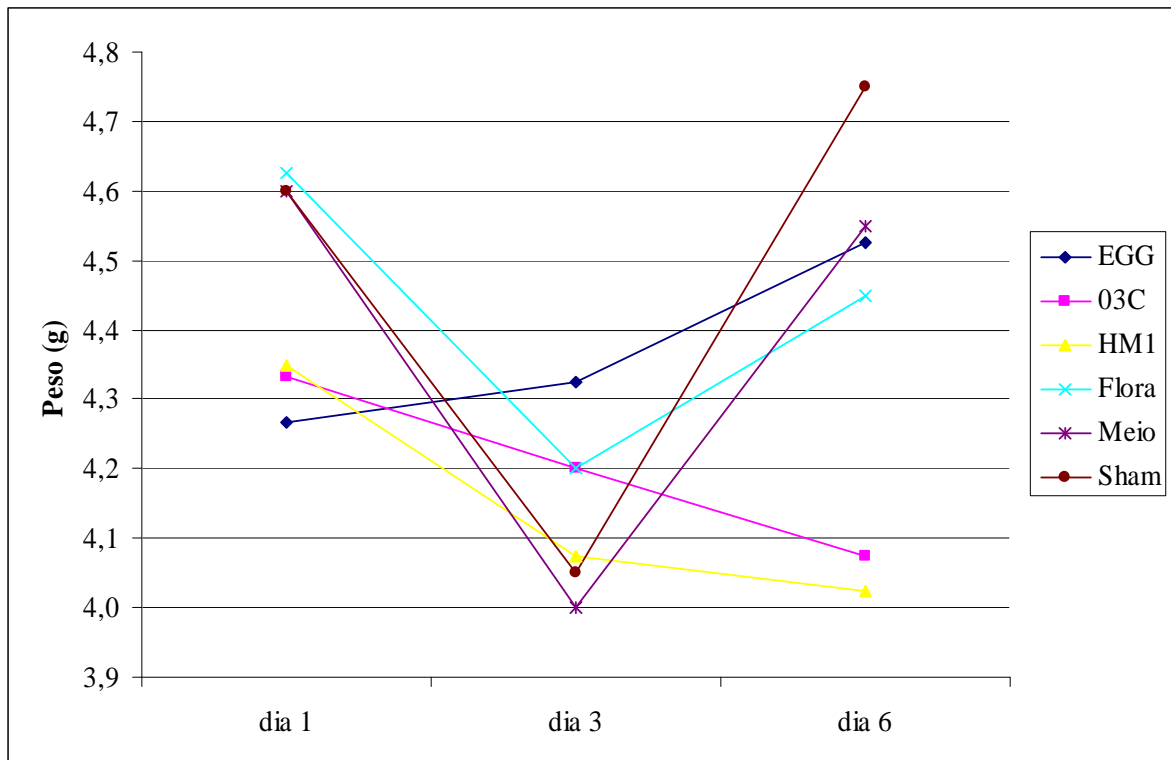


Figura 8 – Evolução do peso do fígado dos animais sacrificados nos períodos 1, 3 e 6 dias pós-inoculação.

A figura 9 representa a evolução da relação % peso do fígado/peso corporal dos animais sacrificados no período até 6 dias pós-inoculação. O grupo EGG apresentou aumento progressivo da relação. Os grupos 03C e HM1 apresentaram diminuição progressiva. Os demais grupos apresentaram perda no período 3 dias pós-inoculação e recuperação no período seguinte.

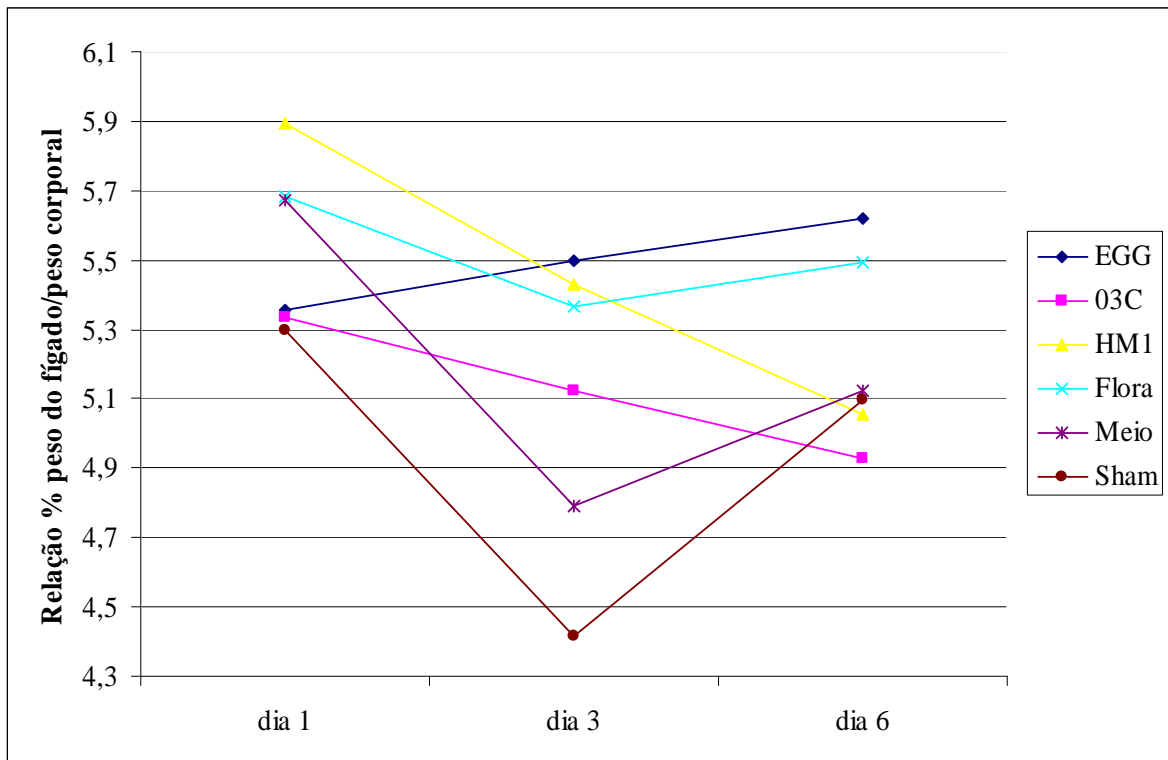


Figura 9 – Evolução da relação % peso do fígado/peso corporal dos animais sacrificados nos períodos 1, 3 e 6 dias pós-inoculação.

5.4 HISTOPATOLOGIA

No período 1 dia pós-inoculação, pôde-se observar que cada grupo apresentou um padrão distinto.

O parênquima hepático do grupo HM1 (Figura x) apresentou áreas de congestão, assim como presença de vacuolização citoplasmática dos hepatócitos centrolobulares. A coloração específica Sudan III revelou esteatose em hepatócitos isolados. Múltiplos microabscessos e alguns focos de infiltrado com predomínio de

células mistas foram observados próximos ao abscesso, em regiões periportais e centrolobulares. O abscesso era único, circundado por área de hemorragia e formado por grande área de necrose de liquefação central e necrose de coagulação na periferia, com predomínio de infiltrado misto (neutrófilos e macrófagos), incluindo piócitos e ausência de células multinucleadas. Neste período, não houve calcificação, tecido de granulação ou fibrose. Alguns trofozoítos foram observados na área central do abscesso.

O grupo EGG (Figura x) apresentou microabscessos e alguns focos de infiltrado misto foram observados nas regiões periportais e meiozonais, principalmente próximo ao abscesso que era único e maior que o do grupo HM1, circundado por área de hemorragia e por necrose de coagulação, que também se apresentava com infiltrado inflamatório misto. Estas áreas eram circundadas por hepatócitos com vacuolização citoplasmática; a coloração específica Sudan III revelou esteatose em hepatócitos isolados. Não foram observadas áreas de calcificação, tecido de granulação ou fibrose. Foram observados poucos trofozoítos na periferia do abscesso.

No grupo 03C (Figura X) observou-se o parênquima hepático mais preservado, sem áreas de congestão, nem degeneração dos hepatócitos. Presença de vários microabscessos exibindo infiltrado misto, com predominância de neutrófilos. O abscesso formado era de tamanho intermediário aos outros dois grupos. Não havia áreas de hemorragia circundando a região necrótica.

O grupo controle flora (Figura x) apresentou esteatose nas regiões centrolobulares do parênquima. Um animal apresentou congestão intensa. Muitos

focos de infiltrado inflamatório misto foram observados no parênquima. Alguns microabscessos ocorriam próximos ao abscesso. Houve presença de área hemorrágica circundando o abscesso. Este era único, formado por necrose de liquefação central com piócitos, e necrose de coagulação periférica, com presença de macrófagos. Não foram observadas áreas de calcificação, tecido de granulação ou fibrose.

No grupo controle meio (Figura x) foram observados pequenos focos de infiltrado mononuclear ou misto, inclusive com eosinófilos, e área hemorrágica no suposto local da inoculação, circundada por necrose de coagulação e algum infiltrado misto. O grupo controle sham não apresentou qualquer tipo de alteração.

No período 3 dias pós-inoculação as diferenças entre os grupos eram mais marcantes.

O grupo HM1 (Figura x) apresentou vários focos de infiltrado de células mononucleares espalhados pelo parênquima, principalmente nas regiões periportais e centrolobulares. Apenas um animal apresentou esteatose sendo que em hepatócitos isolados. Alguns microabscessos, incluindo macrófagos foram observados próximo ao abscesso. O abscesso era único e se espalhava pelo parênquima. Em alguns animais pode-se verificar que o abscesso era circundado por área hemorrágica, com restos celulares no centro e áreas de necrose de coagulação na periferia, a qual apresentava pequenos focos de infiltrado predominantemente mononuclear. Em outros a necrose de coagulação era menos predominante e células epiteliodes ocorriam na área mais periférica do abscesso, sem chegar a formar paliçada organizada e também foram observadas várias células

multinucleadas com material fagocitado. Um animal apresentou restos celulares calcificados no interior do abscesso detectados mediante a coloração de von Kossa. O tricrômico de Gomori revelou áreas com tecido de granulação e fibrose inicial envolvendo o abscesso, inclusive com regeneração de ductos biliares. Vários trofozoítos (quantidade superior ao dia 1) foram observados no interior do abscesso.

O grupo EGG (Figura x) apresentou vários focos de infiltrado inflamatório misto espalhados pelo parênquima (regiões periportais e meiozonais) e alguns microabscessos próximos ao abscesso. Um animal apresentou esteatose em hepatócitos isolados. O abscesso era único, havendo hepatócitos em apoptose no parênquima adjacente. Foi possível observar que o abscesso se espalhava no parênquima adjacente pelo tecido perivascular. Restos celulares calcificados foram observadas no interior do abscesso. Células epiteliodes ocorriam na área mais periférica do abscesso, com aspecto mais organizado do que em HM1, sem chegar a formar paliçada característica de granuloma. Também foram observadas várias células multinucleadas com material fagocitado. Tecido de granulação e áreas de fibrose foram vistas ao redor e dentro do abscesso (mais freqüente na periferia) com ductos biliares regenerados. Grande quantidade de trofozoítos foi observada na periferia do abscesso, nas áreas onde eram vistas as células epiteliodes.

No grupo 03C (Figura x), foram observados alguns microabscessos próximos ao abscesso principal e alguns focos de infiltrado inflamatório misto com predomínio de macrófagos espalhados pelo parênquima. Havia hepatócitos em apoptose no parênquima adjacente a alguns microabscessos, bem como, em áreas ao redor do abscesso principal. O abscesso era único, às vezes circundado por área hemorrágica, com áreas de necrose de coagulação na periferia, assim como células

epiteliodes formando paliçada, células gigantes de corpo estranho e de Langhans, grande quantidade de restos celulares no centro, ainda com infiltrado inflamatório misto. Houve presença de alguns focos de calcificação no interior do abscesso, assim como de tecido de granulação contendo ductos biliares regenerados e início de fibrose (área periférica). Havia grande quantidade de trofozoítos íntegros espalhados pelo abscesso, e também formas degeneradas e calcificadas.

No grupo controle flora (Figura x) foram observados alguns pequenos focos de infiltrado inflamatório misto com predomínio de macrófagos espalhados pelo parênquima. Apenas dois animais apresentaram uma pequena área de necrose de coagulação na periferia do abscesso, assim como, apoptose em hepatócitos isolados. Foram vistas áreas de reparo contendo tecido de granulação com ductos biliares e hepatócitos neoformados, além de início de fibrose. Em meio ao tecido de granulação pode-se notar a presença de células epiteliodes espalhadas. Os grupos controle meio e controle sham não apresentaram alteração no parênquima.

No período 6 dias pós inoculação, pode-se observar início de regressão em alguns grupos, sendo mais evidente no grupo HM1 e controle flora.

O grupo HM1 (Figura x) apresentou alguns focos de infiltrado inflamatório misto com predomínio de macrófagos nas regiões periportais e meiozonais, e múltiplos pequenos abscessos próximos ao abscesso principal. Presença de abscesso único, com pouca hemorragia na periferia, restos celulares na área central, com alguns focos de calcificação ao interior do abscesso. Células epiteliodes foram vistas nas áreas próximas à periferia, sem apresentar arranjo em paliçada, em meio às quais havia alguns trofozoítos calcificados. Células gigantes multinucleadas de

corpo estranho com material fagocitado e grande quantidade de macrófagos com pigmento marrom PAS positivo (lipofuscina) estavam presentes nas áreas de início de reparo da lesão, onde havia tecido de granulação, regeneração de ductos biliares e fibrose. Não foram encontrados trofozoítos íntegros.

No grupo EGG (Figura x), a lesão teve grande desenvolvimento tomando quase todo o órgão. Houve grande número de pequenos abscessos com infiltrado misto espalhados pelo parênquima, assim como esteatose intensa e difusa. O abscesso era único e bastante extenso, com disseminações pelo restante do parênquima e pelo tecido perivascular, com poucas áreas de hemorragia na periferia. Nas áreas de disseminação via-se hepatócitos isolados em apoptose. Presença de grande quantidade de restos celulares e áreas de calcificação ao interior do abscesso, e tecido de granulação com início de fibrose em áreas da periferia, bem como ao interior do abscesso. Na interface entre os restos celulares e o tecido de granulação foram visualizadas células epiteliodes, sem organização em paliçada, em meio às quais havia grande quantidade de trofozoítos formando o chamado anel amebiano. Ocasionalmente havia trofozoítos em meio ao tecido de granulação. Não foram observadas células gigantes multinucleadas.

No grupo 03C (Figura x) houve presença de focos de infiltrado misto com predomínio de macrófagos tanto no parênquima, quanto no abscesso. Foram observadas áreas de disseminação do abscesso pelo tecido perivascular e microabscessos com infiltrado misto, na proximidade do abscesso principal. O abscesso era único com restos celulares espalhados, assim como focos de calcificação na área central. Havia áreas de início de reparo com tecido de granulação, regeneração ductal e fibrose na periferia. Presença de células gigantes

multinucleadas com material fagocitado, às vezes em meio ao tecido de granulação ou em meio às células epiteliodes, que não apresentavam arranjo em paliçada. Foram vistos trofozoítos calcificados livres no tecido ou fagocitados por células gigantes.

O grupo controle flora (Figura x) apresentou poucos focos de infiltrado inflamatório misto, com predomínio de macrófagos e presença de eosinófilos nas regiões periportais do parênquima. Em dois animais, as lesões eram constituídas por tecido de granulação com fibrose isolando-as do parênquima hepático; ductos biliares regenerados, grande quantidade de células multinucleadas com material fagocitado, macrófagos com lipofuscina e algumas células epiteliodes espalhadas estavam presentes. Algumas áreas do parênquima adjacente apresentavam hepatócitos em apoptose. Nos grupos controle meio e controle sham não foram observadas alterações no parênquima.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, usamos um isolado identificado como *E. dispar*. Desde a **descrição** do complexo *E. histolytica/E. dispar*, esta espécie de parasito é considerada como **a forma (RETIRAR)** não patogênica e incapaz de causar a forma invasiva da doença e, conseqüentemente, incapaz de causar o abscesso hepático amebiano.

Através da técnica de Multiplex-PCR, verificamos que a cepa utilizada neste trabalho pertence à espécie *E. dispar* já que os “primers” utilizados são específicos para as espécies *E. histolytica* e *E. dispar* sem amplificar o DNA humano nem o DNA de *E. moshkoviskii*. Além disso, não houve amplificação do DNA da flora bacteriana. Nossos resultados foram condizentes com os encontrados por Nuñez *et al.* (2001) e Santos *et al.* (2007), uma vez que a reação Multiplex-PCR da cepa 03C

apresentou uma banda de 96pb e as cepas EGG e HM1 apresentaram uma banda de 132pb.

Mediante plaqueamento da flora de cultivo da cepa 03C verificou-se a presença de várias cepas de *E. coli* e outras duas espécies não identificadas. Como esta cepa foi isolada de fezes humanas, não é de se surpreender a presença destas espécies de microorganismos no meio de cultivo, uma vez que esta espécie de bactéria vive comensalmente com os trofozoítos no intestino do homem (RANI, 2006).

Para que os resultados obtidos com a cepa polixênica 03C não fossem creditados apenas as bactérias da flora, incubamos por 2 horas os parasitos das cepas axênicas EGG e HM1 com a flora de cultivo da cepa 03C. Segundo Padilla-Vaca (1999), a incubação de trofozoítos oriundos de cultivo axênico com bactérias, dentre elas a *E. coli*, por períodos curtos (30 a 60 minutos) é capaz de aumentar significativamente a capacidade citopática dos parasitos, fator este relacionado com aumento da virulência. Este aumento se deve ao fato de as bactérias fagocitadas desencadearem mecanismos bactericidas que estimulam uma série de reações nos trofozoítos, aumentando assim sua virulência (PADILLA-VACA *et al.*, 1999).

Vários autores (TSUTSUMI *et al.*, 1984, 2006; SILVA, 1997) consideram o hamster como sendo o modelo animal mais adequado para o estudo da amebíase hepática. Silva (1997) diz que embora várias espécies de animais tenham sido utilizadas como modelos experimentais da amebíase em laboratório, até o momento, nenhuma delas foi capaz de reproduzir a amebíase como ela realmente ocorre no homem. Entretanto, o hamster é amplamente empregado como modelo animal para

avaliar a virulência de cepas de amebas. Atribuído a isso, o hamster foi escolhido como modelo para o estudo experimental da amebíase hepática, permitindo comparar a patogenicidade da cepa 03C (*E. dispar*) com as cepas EGG e HM1 (*E. histolytica*).

Foram utilizados animais jovens, pois estes ainda não possuem o sistema imunológico totalmente formado, facilitando assim o desenvolvimento da lesão amebiana. Outros autores como Costa (2001) e Rigother *et al.* (2002) também utilizaram animais na mesma faixa etária.

Todos os grupos apresentaram ganho de peso corporal ao longo dos três períodos em estudo. Pode-se relacionar isso ao fato de os animais serem muito jovens e estarem em fase de crescimento.

A cinética de evolução do peso do fígado e da relação % peso do fígado/peso corporal dos animais nos diferentes períodos de estudo mostrou que o órgão dos grupos controle e grupos HM1 e 03C apresentaram perda de peso até o período 3 dias pós-inoculação, sugerindo a interferência do estresse cirúrgico. Após este período, os grupos controle apresentaram recuperação do peso do órgão. Já os grupos 03C e HM1 apresentaram perda contínua do peso do fígado, talvez por estar em fase de regressão da lesão hepática. O grupo EGG apresentou aumento progressivo do peso do órgão, sugerindo que a grande lesão hepática inicial e seu aumento subsequente possa estar relacionado a este fato. Em nenhum animal foi observado hepatomegalia como descrito por Costa (2001).

O aspecto macroscópico das lesões foi distinto para cada grupo. Estas variaram consideravelmente conforme a cepa utilizada. Foram desde simples lesões no local da inoculação até grandes lesões que abrangeram todo o lobo ou expressiva parte do fígado. Na maioria dos casos, houve predomínio de lesões de coloração amarelada e formato irregular.

O grupo EGG apresentou evolução progressiva da lesão de acordo com os critérios estabelecidos por Diamond (1974). Embora Silva (1997) e Costa (2001) não tenham acompanhado a evolução da lesão ao longo de 6 dias, os resultados obtidos neste trabalho se assemelham aos observados por esses autores, neste período, ou seja, os animais apresentaram lesão grau IV.

O grupo HM1 apresentou apenas lesão grau I até o dia 3 pós-inoculação. Silva (1997), observou que determinadas cepas, mesmo que virulentas e invasivas como a HM1, quando mantidas em cultivo por períodos prolongados, têm sua virulência gradativamente diminuída, contudo, sem perdê-la totalmente. Isso também foi relatado por Matinez-Palomo (1982). Esse fato pode sugerir a baixa quantidade de animais com lesão e o baixo grau atribuído a elas, já que a cepa utilizada neste trabalho estava há quase um ano em cultura.

A cepa 03C apresentou progressão da lesão segundo os critérios estabelecidos por Diamond (1974) até o período 3 dias pós-inoculação. No período 6 dias pós-inoculação, apenas 1 animal apresentou lesão com grau I. Este resultado difere do encontrado por Costa (2001) que utilizou várias cepas de *E. dispar* e todas elas apresentaram lesões com grau diferente de zero no período 6 dias pós-inoculação; algumas cepas apresentaram animais com lesão superior a grau II.

Sob o aspecto microscópico, as lesões mostraram ser distintas umas das outras, dependendo dos grupos, da mesma forma como ocorreu na macroscopia. Segundo Tsutsumi *et al.* (1984), o modelo de abscesso hepático amebiano em hamster após inoculação intraportal segue três fases consecutivas: inflamação aguda, formação de granuloma e avanço progressivo da necrose. As três fases descritas por ele foram identificadas, havendo variações na temporalidade nos diferentes grupos e as estruturas granulomatosas eram na sua maioria desorganizadas, talvez, devido a inoculação direta no parênquima hepático e a associação dos trofozoítos com a flora de cultivo.

No período inicial (1 dia pós-inoculação), os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por Tsutsumi *et al.* (1984) nos grupos EGG e HM1, abscesso com borda irregular formado por necrose de liquefação (centro), necrose de coagulação (periferia) e grande infiltrado inflamatório misto ao redor da área da lesão. No grupo 03C, a fase de inflamação aguda foi mais evidente, indicando possível retardo na instalação do abscesso característico. Em todos os grupos, áreas de hemorragia estavam associadas ao abscesso. Este fato não foi observado por Tsutsumi *et al.* (1984), pois, a inoculação feita por este autor foi via veia porta e neste trabalho foi direta no parênquima. Sendo assim, isto pode estar relacionado ao traumatismo da inoculação. Hemorragia discreta e necrose tecidual de fato ocorreram no grupo controle meio no local da inoculação. Entretanto, nos grupos tratados algumas áreas hemorrágicas persistiram nos outros períodos, fato este não observado no controle meio.

Alguns focos de infiltrado inflamatório foram observados espalhados pelo parênquima hepático, principalmente no grupo 03C. Tsutsumi *et al.* (1984) e Olivos-

García *et al.* (2004) relatam esse fato, porém, foram encontrados trofozoítos no centro desses focos de infiltrado. Rigother *et al.* (2002), embora tenham feito o mesmo tipo de inoculação que os outros autores, ou seja, via veia porta, encontrou vários focos de infiltrado espalhados pelo parênquima, porém sem parasitos. O mesmo fato, ausência de trofozoítos nos focos inflamatórios, foi observado no presente trabalho. Rigother *et al.* (2002) sugerem que esses focos de células inflamatórias sejam os responsáveis pela eliminação dos parasitos, e que os neutrófilos, assim como sugerido por Seydel *et al.* (1997) e Jarrillo-Luna *et al.* (2002) em modelo experimental em camundongo, têm papel fundamental nessa eliminação. No presente trabalho, encontramos muitos focos de infiltrado misto (neutrófilos e macrófagos) espalhados pelo parênquima hepático, principalmente no grupo 03C, sem a presença de parasitos. Porém, o grupo controle flora apresentou padrão semelhante, sugerindo que as bactérias também possam ter participação na formação desses focos inflamatórios.

Tsutsumi *et al.* (1984), Olivos-García *et al.* (2004) e Blazquez *et al.* (2007) sugerem que esse início de inflamação é necessário tanto para a destruição do tecido hepático quanto para a sobrevivência do parasito e que esses fatores são necessários para a progressão da lesão. Eles ainda alegam que a maior contribuição para a destruição das células e tecido hepático é dada pelas células inflamatórias, principalmente pelos polimorfonucleares neutrófilos. Pérez-Tamayo *et al.* (2006) sugerem que os potentes mecanismos de defesa das células inflamatórias são capazes de causar algum tipo de estímulo que permite que os trofozoítos sejam capazes de sobreviver no tecido hepático.

Apenas os grupos HM1 e controle flora apresentaram positividade para Sudan III no período 1 dia pós-inoculação, indicando a presença de esteatose no parênquima hepático. Não foram encontrados relatos desse tipo específico de degeneração associada ao abscesso amebiano hepático, porém Tsutsumi et al. (1984) menciona, nas primeiras horas, alterações degenerativas nos hepatócitos que culminam na necrose.

No período 3 dias pós-inoculação, os abscessos dos grupos EGG e 03C foram maiores. Houve grande substituição de polimorfonucleares neutrófilos por macrófagos, assim como relatado por Tsutsumi *et al.* (1984). Este autor também observou um aumento na quantidade do número de parasitos na lesão. Neste trabalho, verificou-se que os trofozoítos das cepas de *E. histolytica* estavam restritos a periferia do abscesso, já os trofozoítos da cepa de *E. dispar* estavam espalhados por todo o abscesso. Não foi encontrado relato na literatura sobre essa diferença. No grupo HM1 ainda havia áreas de necrose de coagulação na periferia do abscesso indicando uma evolução mais lenta.

Neste trabalho, foram observadas células epitelióides no período 3 dias pós-inoculação, na periferia do abscesso, nos grupos HM1, EGG, 03C e controle flora. Tsutsumi *et al.* (1984) relata o surgimento de células epitelióides na periferia do abscesso no período 2 dias pós-inoculação. Certa organização em paliçada das células epitelióides só foi registrada no grupo 03C. Nenhum dos autores pesquisados relata a presença de células gigantes multinucleadas no abscesso, presente neste trabalho a partir do período 3 dias apenas nos grupos HM1, 03C e controle flora.

No período 3 dias pós-inoculação, a coloração von Kossa apresentou positividade para a presença de cálcio nas áreas de abscesso. O grupo controle flora não apresentou áreas de calcificação, sugerindo que as amebas possam ter papel fundamental nesse processo, uma vez que a calcificação ocorria tanto em restos celulares amorfos quanto em trofozoítos mortos ou parcialmente destruídos. Além disso, a coloração tricrômico de Gomori confirmou a presença de tecido de granulação e fibrose inicial a partir do período 3 dias pós-inoculação. O grupo EGG apresentou poucas áreas de tecido de granulação.

No período 6 dias pós-inoculação as células epitelíoides foram observadas, porém, não havia organização granulomatosa característica, pois essas células apareciam em meio ao tecido de granulação, nos grupos HM1, 03C e controle flora. Segundo Tsutsumi *et al.* (1984), neste período essas células se arranjam de forma característica e é possível encontrar granulomas formados por células epitelíoides organizadas em paliçada.

Os grupos 03C, HM1 e controle flora apresentaram fibrose no período 6 dias pós-inoculação, sugerindo evolução para o reparo da lesão. Entretanto, no grupo 03C ainda foram observadas trofozoítos íntegros em pouca quantidade. Costa (2001) encontrou alguns focos de calcificação e várias áreas com tecido de granulação e fibrose nos abscessos, assim como os encontrados neste trabalho.

As lesões oriundas dos grupos 03C e HM1 foram menos invasivas que as oriundas do grupo EGG. Neste último grupo, pôde-se observar claramente a disseminação da infecção, principalmente nos períodos 3 e 6 dias pós-inoculação. As lesões causadas pelo grupo controle flora eram delimitadas e confinadas ao sítio

de inoculação, mais restritas e circundadas por uma cápsula de fibrose que separava o abscesso do parênquima íntegro. Isso sugere que as lesões observadas não podem ser atribuídas apenas às bactérias. Porém, as bactérias podem ter influência na indução de lesão amebiana nos animais, já que elas poderiam promover no parênquima hepático um ambiente propício para a multiplicação dos trofozoítos e progressão da lesão. Além disso, elas podem servir como fatores quimiotáticos de células inflamatórias que contribuem para o desenvolvimento do abscesso (TSUTSUMI *et al.*, 1984).

Os resultados das inoculações nos animais demonstraram que o número de animais infectados, o tipo e a severidade das lesões variaram com a cepa, sendo EGG a mais patogênica, HM1 a menos patogênica e 03C de patogenicidade intermediária.

A grande sensibilidade do hamster à infecção amebiana não invalidou a sua utilização como modelo adequado para a diferenciação das cepas em relação à virulência e patogenicidade. Embora ele tenha se infectado facilmente com as cepas, houve uma considerável diferença entre elas. Quando verificados o número de animais infectados e o tipo de severidade das lesões, a diferença entre as cepas se tornou ainda mais evidente, assim como observado por Silva (1997) e Costa (2001).

Contrariamente do que se podia esperar de uma espécie reconhecida como não invasiva, não virulenta e sempre assintomática (WHO, 1997), a cepa 03C de *E. dispar* isolada de paciente assintomático, foi capaz de causar lesões em fígado de hamster. Costa *et al. apud* Clark *et al.* (2001), alega que a denominação de “não

patogênica” atribuída a *E. dispar* estaria incorreta, uma vez que sua capacidade de causar lesões mesmo que focais a caracteriza como patogênica, porém não virulenta, uma vez que não causaria as formas invasivas da doença como feito pela *E. histolytica*. Sendo assim, os dados obtidos sugerem que a *E. dispar* possui um potencial patogênico capaz de determinar infecções em modelo animal.

Se bem se conhece que a *E. díspar* possui cisteino-proteases em quantidade muito inferior à *E. histolytica*, outros estudos são necessários para elucidar melhor a questão da ausência de capacidade invasiva, necessária na ocorrência natural da doença, já que neste modelo essa etapa é substituída pela inoculação direta no órgão.

7 CONCLUSÕES

- *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* possuem diferente grau de patogenicidade, sendo mais patogênica a cepa EGG, menos patogênica a HM1 e de patogenicidade intermediária a cepa 03C.
- A formação do abscesso hepático em hamster apresenta variações na temporalidade das características microscópicas, assim como na forma de evolução do abscesso hepático, de acordo com a cepa utilizada.

8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abd-Alla, M. D.; Ravdin, J. I. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. **Trop Med Int Health** 7: 365–370, 2002.
2. Alback, R. A. Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. **J Protozool** 36: 197-205, 1989.
3. Alves, J. R. et al. Intestinal parasite infections in a semiarid area of Northeast Brazil: preliminary findings differ from expected prevalence rates. **Cad Saúde Pública** 19(2): 667-670, 2003.
4. Anaya-Velázquez, F.; Padilla-Vaca, F. Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res** 23: 183-185, 1992.
5. Aquino, J. L. Estudo comparativo entre o método imunológico Prospect e métodos tradicionais para o diagnóstico laboratorial da *Entamoeba histolytica*. **Rev Bras Anal Clin** 30: 147-150, 1998.
6. Blazquez, S. et al. Initiation of inflammation and cell death during liver abscess formation by *Entamoeba histolytica* depends on activity of the galactose/N-acetyl-D-galactosamine lectin. **Int J Parasitol** 37(3-4): 425-433, 2007.
7. Blessmann, J. et al. Epidemiology of amebiasis in a region of high incidence of amoebic liver abscess in central Vietnam. **Am J Trop Med Hyg** 66(5): 578-583, 2002.

8. Bracha, R. et al. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun** 36: 396-406, 1982.
9. Bracha, R.; Mirelman, D. Adherence and ingestion of *Escherichia coli* serotype 055 by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. **Infect Immun** 40: 882-887, 1983.
10. Braga, L.L. et al. Seropositivity for/and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. **J Clin Microbiol** 36: 3044-3045, 1998.
11. Braga, L. L. et al. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in northeastern Brazil. **Am J Trop Med Hyg** 65(4): 268-271, 2001a.
12. Braga, L. L. et al. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 34(5): 467-471, 2001b.
13. Bruchhaus, I. et al. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. **Eukariot Cell** 2: 501-509, 2003.
14. Burchard, G.D.; Mirelman, D. *Entamoeba histolytica*: virulence potential and sensitivity to metronidazole and emetine of four isolates possessing nonpathogenic zymodemes. **Exp Parasitol** 66(2): 231-242, 1988.
15. Caballero-Salcedo, A. et al. Seroepidemiology of amebiasis in Mexico. **Am J Trop Med Hyg** 4: 412-419, 1994.
16. Carrero, J.C. et al. Dehydroepiandrosterone decreases while cortisol increases in vitro growth and viability of *Entamoeba histolytica*. **Microbes Infect** 8(2): 323-231, 2006.
17. Carvalho-Almeida, T. T. et al. Detection of *Cryptosporidium* sp. in non diarrheal faeces from children, in a day care center in the city of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop SP** 48(1): 27-32, 2006.
18. Chavez-Munguia, B. et al. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. **Exp Parasitol** 107: 39-46, 2004.
19. Cordeiro, T. G. P.; Macedo, H. W. Amebíase. **Rev Patol Trop** 36(2): 119-128, 2007.
20. Costa, A. O. et al. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. **Arch Med Res** 31: S247-S248, 2000.

21. COSTA, Adriana Oliveira. Aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares de *Entamoeba dispar* submetidas a diferentes condições de cultivo em comparação com a *E. histolytica*. 2001. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.
22. Costa, A. O. et al. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 48: 245-250, 2006.
23. Costa-Macedo, L. M. et al. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública** 14(4): 851-855, 1998.
24. De Menezes, L. F. et al. Effect of bacterial association on the phenotype and genotype of an *Entamoeba histolytica* clonal population. **Invasion metastasis** 17: 176-188, 1997.
25. De Souza, W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. **An Acad Bras Cienc** 78: 271-291, 2006.
26. Diamond, L. S. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Science** 134: 336–337, 1961.
27. Diamond, L. S. et al. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoebas*. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 72(4): 431-432, 1978.
28. Espinosa-Cantellano, M.; Martínez-Palomo, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clin Microbiol Rev** 13: 318-331, 2000.
29. Ferreira, C. S. et al. The prevalence of infection by intestinal parasites in an urban slum in Sao Paulo, Brazil. **J Trop Med Hyg** 97(2): 121-127, 1994.
30. Furst, C. et al. Biological aspects of a Brazilian strain of *Entamoeba dispar*. **Pathologica** 94(1): 22-27, 2002.
31. Gatti, L. L. et al. Relação entre enteroparasitoses, região ungueal e mãos contaminadas, em crianças e adolescentes da Instituição filantrópica de Marília. **Rev Bras An Clin** 31(4): 205-206, 1999.
32. Giatti, L. L. et al. Basic sanitary conditions in Iporanga, São Paulo State, Brazil. **Rev. Saúde Pública** 38(4): 571-577, 2004.
33. Gonçalves, J. F. et al. Parasitological and serological studies on amoebiasis and other intestinal parasitic infections in the rural sector around Recife, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop SP** 32(6): 428-435, 1990.

34. Gonin, P.; Trudel, L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **J Clin Microbiol** 41: 237-241, 2003.
35. Guerrant, R. L. Amebiasis: introduction, current status, and research questions. **Rev Infect Dis** 8(2): 218-227, 1986.
36. Gutierrez-Alarcon, A. et al. *Entamoeba histolytica*: inflammatory process during amoebic liver abscess formation involves cyclooxygenase-2 expression in macrophages and trophozoites. **Exp Parasitol** 114(3):154-159, 2006.
37. Haque, R et al. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TecLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. **J Clin Microbiol** 38: 3235-3239, 2000.
38. Haque R, et al. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. **J Infect Dis** 183: 1787-1793, 2001.
39. Haque, R. et al. Amebiasis. **N Engl J Med** 348: 1565-1573, 2003.
40. Hughes, M. A.; Petri, W. A. Amebic liver abscess. **Infect Dis Clin North Am** 14(3):565-82, 2000.
41. Jarillo-Luna, R.A.; Campos-Rodríguez, R.; Tsutsumi, V. *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse. Neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. **Exp Parasitol** 101(1): 40-56, 2002.
42. Kraoul, L. et al. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. **J Clin Microbiol** 35: 1530-1532, 1997.
43. Lesh, F. A. Massive development of amebas in the large intestine. Fedor Aleksandrovich Lesh (Losch). **Am J Trop Med Hyg** 24(3): 383-392, 1975.
44. Ludwig, M. K. et al. Correlação entre as condições de saneamento básico e parasitoses na população de Assis, Estado de São Paulo. **Rev Soc Bras Med Trop** 32(5): 547-555, 1999.
45. Macedo, L. M. C. & Rey, L. Enteroparasitosis in pregnant and post-partem women in Rio de Janeiro. **Cad Saude Publ** 12(3): 383 – 388, 1996.
46. Mann, B. J.; Lockhart, L. A. Molecular analysis of the Gal/GalNac adhesin of *Entamoeba histolytica*. **J Euk Microbiol** 45: 13S-16S, 1998.

47. Martinez-Palomo, A. Biology of amoebiasis: progress and perspectives. **Biol Parasitism** 43: 61-73, 1988.
48. Miranda, R. A. et al. Intestinal parasitism in a Parakana indigenous community in southwestern Para State, Brazil. **Cad Saude Publica** 14(3): 507-511, 1998.
49. Mirelman, D. Amoeba-bacterium relationship in amoebiasis. **Microbiol Rev** 51: 272-284, 1987.
50. Moraes, L. R. S. et al. Impacto of drainage and sewerage on diarrhoea in poor urban areas in Salvador, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 97: 153-158, 2003.
51. Moran, P. et al. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*. infection frequency in HIV+/AIDS patients in Mexico city. **Exp Parasitol** 110: 331-334, 2005.
52. Nozaki, T. et al. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and north-east of Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 84: 387-388, 1990.
53. Nuñez, Y. O. et al. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. **Am J Trop Med Hyg** 64(5-6): 293-297, 2001.
54. Okada, M.; Nozaki, T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. **Arch Med Res** 37: 244-252, 2006.
55. Oliveira, M. F. et al. Incidência de enteroparasitos na zona rural do Município de Parnaíba, Piauí. **Rev Bras Anal Clin** 33(1): 45-48, 2001.
56. Olivos-García, A. et al. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. **Exp Mol Pathol** 77(1), 66–71, 2004.
57. Olivos, A. et al. *Entamoeba histolytica*: mechanism of decrease of virulence of axenic cultures maintained for prolonged periods. **Exp Parasitol** 110(3): 309-312, 2005.
58. Ordaz-Pichardo, C. et al. Antiamoebic and toxicity studies of a carbamic acid derivative and its therapeutic effect in a hamster model of hepatic amoebiasis. **Antimicrob Agents Chemother** 49(3): 1160-1168, 2005.
59. Orlandi, P. P. et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondonia: a preliminar study. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 96(5): 621-625, 2001.

60. Padilla-Vaca, F. et al. Down regulation of *Entamoeba histolytica* virulence by monoxenic cultivation with *Escherichia coli* O55 is related to a decrease in expression of the light (35-kilodalton) subunit of the Gal/GalNAc lectin. **Infect Immun** 67(5): 2096-2102, 1999.
61. Padilla-Vaca, F. et al. Novel thermo-stable serine-metallo proteinase of *Entamoeba histolytica*. **Arch Med Res** 31: S221-S223, 2000.
62. Pacheco, J. et al. *In vitro* and *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. **Parasitol Int** 53: 35-47, 2004.
63. Perez-Tamayo, R. et al. Pathogenesis of acute experimental liver amebiasis. **Arch Med Res** 37(2): 203-209, 2005.
64. Que, X. et al. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. **Mol Biochem Parasitol** 119: 23-32, 2002.
65. Rani, R. et al. Changes in bacterial profile during amebiasis: demonstration of anaerobic bacteria in ALA pus samples. **Am J Trop Med Hyg** 75(5): 880-885, 2006.
66. Ravdin, J. I. **Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica**. Ed. John Wiley & Sons, New York, Churchill Livingstone, 1988. p. 126-149.
67. Ravdin, J. I. et al. Intestinal antilectin immunoglobulin an antibody response and immunity to *Entamoeba dispar* infection following cure of amebic liver abscess. **Infect Immun** 71(12):6899-905, 2003.
68. Rezende, C. H. et al. Enteroparasitoses in food handlers of the public schools in Urbrlandia (Minas Gerais), Brazil. **Rev Panam Salud Publica** 2(6): 392-397, 1997.
69. Rocha, M. O. et al. Estudo comparativo da prevalência de parasitoses intestinais em escolares de Belo Horizonte, MG. **Rev Bras An Clin** 26(4): 127-129, 1994.
70. Rigother, M. C. et al. Fate of *Entamoeba histolytica* during establishment of amoebic liver abscess analyzed by quantitative radioimaging and histology. **Infect Immun** 70(6): 3208-3215, 2002.
71. Rocha, R. S. et al. Avaliação da esquistossomose e de outras parasitoses intestinais, em eslores do município de Bambuí, Minas Gerais, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 33 (5): 431-436, 2000.

72. SANTOS, Helena Lúcia Carneiro. **Diagnóstico laboratorial da amebíase: detecção e diferenciação simultânea da *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por ensaio imunoenzimático (ELISA) e Multiplex-PCR.** 2005. 87p. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal Fluminense.
73. Santos, H. L. *et al.* Comparison of multiplex-PCR and antigen detection for differential diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Braz J Infect Dis** 11(3): 365-370, 2007.
74. Sargeaunt, P. G. *et al.* The differentiation of invasive and non invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 72:519-521, 1978.
75. Seydel, K.B.; Zhang, T.; Stanley, S. L. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. **Infect Immun** 65(9): 3951-3953, 1997.
76. Sharma, M.; Vohra, H.; Bhasin, D. Enhanced pro-inflammatory chemokine/cytokine response triggered by pathogenic *Entamoeba histolytica*: basis of invasive disease. **Parasitology** 131(Pt 6):783-796, 2005.
77. SILVA, Edward Félix. ***Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade *in vivo* e *in vitro*.** 1997. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.
78. SILVA, Edward F. *Entamoeba histolytica* e amebíase. In: Neves DP. Parasitologia humana. 10^a ed. Rio de Janeiro. Atheneu, 2003. p 133-147.
79. Sim, S. *et al.* Ultrastructural observation of human neutrophils during apoptotic cell death triggered by *Entamoeba histolytica*. **Korean J Parasitol** 42(4): 205-208, 2004.
80. Singh, D.; Naik, S. R.; Naik, S. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. **Parasitol** 129: 1-9, 2004.
81. Solaymani-Mohammadi, S. *et al.* Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. **J Clin Microbiol** 44: 2258-2261, 2006.
82. Spice, W. M.; Ackers, J. P. The effect of axenic versus xenic culture conditions on the total and secreted proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* stains. **Arch Med Res** 23: 91-93, 1992.

83. Spice, W. M.; Ackers, J. P. Influence of bacteria on electrophoretic proteinase patterns of *Entamoeba histolytica* isolates. **Int J Parasitol** 23: 671-674, 1993.
84. Stanley, S. L. Amoebiasis. **Lancet** 361: 1025-1034, 2003.
85. Stauffer, W.; Ravdin, J. I. *Entamoeba histolytica*: an update. **Curr Opin Infect Dis** 16: 479-485, 2003.
86. Shamsuzzaman, S. M. et al. Socioeconomic status, clinical features, laboratory and parasitological findings of hepatic amebiasis patients – a hospital based prospective study in Bangladesh. Southeast Asian. **J Trop Med Public Health** 31: 399-404, 2000(a).
87. Shamsuzzaman, S. M. et al. Evaluation of indirect fluorescent antibody test as enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. **J Parasitol** 86: 611-615, 2000(b).
88. Solaymani-Mohammadi, S. et al. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. **J Clin Microbiol** 44(6):2258-2261, 2006.
89. Tanimoto, M. et al. Lesiones producidas en el hígado del hámster por inoculación de *Entamoeba histolytica* cultivada en medio axénico. **Arch Invest Med** 2: 275–284, 1971.
90. Tanimoto-Weki, M. Contributions to the knowledge of amebiasis through experimental studies in hamsters. **Gac Med Mex** 125(1-2): 27-29, 1989.
91. Tanyuksel, M.; Petri, W. A. Jr. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clin Microbiol Rev** 16(4): 713-729, 2003.
92. Tsutsumi, V. et al. Cellular bases of experimental amebic liver abscess formation. **Am J Pathol** 117: 181–91, 1984.
93. Tsutsumi, V.; Shibayama, M. Experimental amebiasis: a selected review of some in vivo models. **Arch Med Res** 37(2):210-220, 2006.
94. van Hal, S. J. et al. Amoebiasis: current status in Australia. **Med J Aust** 186(8):412-416, 2007.
95. Wittner, M.; Rosenbaum, R.M. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. Studies of amoeba from axenic cultures. **Am J Trop Med Hyg** 19: 755-761, 1970.

96. WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico 28-29 January, 1997. **Epidemiol Bull** 18(1): 13-14, 1997.
97. Yau, Y. C. W. et al. Development of monoclonal antibodies which specifically recognize *Entamoeba histolytica* in preserved stool samples. **J Clin Microbiol** 39(2): 716-719, 2001.

9 ANEXOS

Anexo 1

Meio Pavlova modificado por Silva (1972)

• Meio base

Na ₂ PO ₄	2,44g
K ₂ HPO ₄	0,42g
NaCl	7,3g
extrato de levedo	1,46g
H ₂ O qsp	1000mL

Ajustar pH para 7,2 a 7,4

• Complementos

- ✓ penicilina 1.000U/mL de meio;
- ✓ estreptomicina 500µg/mL;
- ✓ 100mL de soro bovino adulto inativado por 30 minutos a 56°C;
- ✓ após filtragem em membrana de 0,22µm, acrescentar amido de arroz estéril qsp 1mg/mL de meio.

Anexo 2**Meio TYI-S-33 (Diamond, 1978)**

• Meio base

K ₂ HPO ₄	1,0g
KH ₂ PO ₄	0,6g
NaCl	2,0g
Trypticase (BBL)	20g
extrato de levedura (Difco)	10g
glicose	10g
L-cisteína	1,0g
ácido ascórbico	0,2g
cittrato férrico amoniacal	0,0228g
H ₂ O qsp	870mL

Ajustar pH para 7,0 – 7,2

• Complementos

- ✓ 30mL de vitamina Tween 80;
- ✓ 100mL de soro bovino adulto inativado por 30 minutos a 56°C;
- ✓ Penicilina G Cristalina 1000U/mL de meio;
- ✓ estreptomicina 500µg/mL de meio;
- ✓ filtrar em membrana de 0,22µm.

Anexo 3Criopreservação de amostras de *E. histolytica* e *E. dispar*

- Solução crioprotetora
meio de cultivo (TYI-S-33 ou Pavlova) 6,3mL
sacarose 2M 0,5mL
DMSO (Sigma) 1,2mL

Filtrar em membrana 0,22 μ m e acrescentar 2mL de soro bovino adulto estéril inativado.

- Criopreservação
 - ✓ adicionar 5 a 10mL da solução crioprotetora ao sedimento de trofozoítos (mínimo de 2×10^5), homogenizar levemente e distribuir 1 a 1,5mL por criotubo;
 - ✓ transferir os tubos para o Freezing Tray 97 19609 (MVE) com termômetro e acopla-lo ao botijão de nitrogênio líquido;
 - ✓ proceder ao abaixamento gradual de temperatura (1 – 2 $^{\circ}$ C por minuto) até -50 $^{\circ}$ C, abaixar o Freezing Tray ao máximo e após 15 – 20 minutos, transferir os criotubos para o local definitivo nos botijões.

Anexo 4

Trabalhos completos publicados em periódicos

- Cordeiro, T. G. P. & Macedo, H. W. Amebíase. **Rev Patol Trop** 36(2): 119-128, 2007.

Trabalhos completos apresentados em congresso e publicados em periódicos

- Cordeiro, T. G. P.; Mello, M. D.; De Menezes, L. F.; Peralta, R. H. S.; Peralta, J. M.; Macedo, H. W. Caracterização da expressão fenotípica da virulência da *Entamoeba dispar*. **Rev Patol Trop** 36(Supl. 2): 7, 2007.
- Cordeiro, T. G. P.; Santos, H. L. C.; Peralta, J. M.; Silva, E. F.; Guzmán-Silva, M. A.; Macedo, H. W. Comparação da patogenicidade de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em modelo experimental de inoculação hepática em hamster. **Rev Patol Trop** 36(Supl. 2): 6, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)