



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e
Aplicadas

KELEN MONIK GOMES DA SILVA

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE IFN- γ E IL-17 SOBRE A
FUNÇÃO ERITROFAGOCÍTICA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Barra do Garças-MT

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e
Aplicadas

KELEN MONIK GOMES DA SILVA

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE IFN- γ E IL-17 SOBRE A
FUNÇÃO ERITROFAGOCÍTICA DE ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luzía França

Barra do Garças-MT

2016

G633a Gomes da Silva, Kelen Monik.
ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE IFN- E IL-17
SOBRE A FUNÇÃO ERITROFAGOCÍTICA DE
ENTAMOEBA HISTOLYTICA / Kelen Monik Gomes da Silva.
-- 2016
57 f. ; 30 cm.

Orientador: Eduardo Luzia França.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato
Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Básicas e Aplicadas, Barra do Garças, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Amebíase. 2. Entamoeba histolytica. 3.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

KELEN MONIK GOMES DA SILVA

**TÍTULO: Atividade imunomoduladora de IFN- γ e IL-17 sobre a
função eritrofagocítica de *Entamoeba histolytica***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Imunologia e
Parasitologia Básicas e Aplicadas do Instituto de
Ciências Biológicas e da Saúde - Universidade
Federal de Mato Grosso Campus Universitário do
Araguaia, como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Imunologia e Parasitologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDUARDO LUZÍA FRANÇA

Aprovada em 20 de MAIO de 2016.

Comissão Examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Luzía França

Orientador



Prof. Dr. Edson Fredulin Scherer

Examinador externo



Prof. Dr.ª Lucélia Campelo de Albuquerque Moraes

Examinador interno

BARRA DO GARÇAS - MT

Agradecimentos

A Deus.

A minha Família.

Ao meu orientador prof. Dr. Eduardo Luzía França pelas sugestões valiosas, por compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento e sabedoria. Agradeço pela paciência, compreensão e dedicação dada a mim e ao projeto de pesquisa.

A colaboradora do projeto profa. Dr^a Lucélia Campelo de Albuquerque Moraes por ter me ensinado e acompanhado durante os ensaios experimentais e pelas sugestões que foram de muito valor. Obrigada pela amizade e atenção.

A profa. Dr^a Adenilda Cristina Honório-França pela colaboração, pelas dicas, ensinamentos, carinho e pelo apoio dado durante todo o período da pós-graduação.

A Profa. Dr^a Danny Laura que me auxilio desde o início do mestrado. Agradeço a sua dedicação, amizade e simplicidade, com você aprendi muito.

A mestranda Claudia Cristina S. Pereira pela parceria, pelo auxilio nos experimentos e por ter cedido sua casa sempre que precisei.

A aluna do curso de biomedicina kellen Menezes por ajudar nos experimentos, mostrando sempre disposição.

A equipe do Laboratório de imunomodulação, ICBS/CUA/UFMT, Barra do Garças – MT, pela amizade, auxilio e dedicação dada no decorrer deste trabalho.

A toda a equipe do Laboratório de Imunologia da Relação Materno-Infantil, ICBS/CUA/UFMT. Jamais me esquecerei de vocês.

A todos os colegas e professores do curso de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Básicas e Aplicadas, pela amizade e ensinamentos. Fico grata a Deus por ter me proporcionado conhecê-los.

A toda equipe do laboratório de Amebíase da UFMG, Belo Horizonte - MG, pela colaboração dada durante toda a realização deste trabalho.

Ao João Viana, técnico do laboratório de Amebíase da UFMG por ter colaborado com nosso projeto, disponibilizando a cepa do parasito.

A todos os doadores que participaram desta pesquisa, sem a colaboração de vocês sem dúvida este projeto não seria realizado.

A CAPES/FAPEMAT pelo apoio financeiro durante o mestrado.

Epígrafe

E como meu amado irmão Edilsom Flávio costumava dizer:

***“Vivem me chamando de louco, mas Deus escolheu as coisas loucas
desse mundo para confundir as sábias”.***

Baseado em Trecho Bíblico

Sumário

	Lista de Figuras	8
	Lista de Abreviaturas e Siglas	9
	Resumo	10
	Abstract	11
1	Introdução	12
2	Revisão de literatura	14
2.1	Amebíase	14
2.2	Complexo <i>E. histolytica</i>/<i>E. dispar</i>	16
2.3	Morfologia	17
2.4	Ciclo biológico	18
2.5	Patogenicidade	19
2.6	Diagnóstico e Tratamento	20
2.7	Resposta imunológica para <i>E. histolytica</i>	21
2.7.1	Imunidade inata	21
2.7.2	Imunidade Adaptativa	23
2.8	Citocinas (IFN-γ e IL-17)	25
2.9	Eritrofagocitose	27
3	Justificativa	29
4	Objetivos	30
4.1	Objetivo geral	30
4.2	Objetivos específicos	30
5	Materiais e Métodos	31
5.1	Obtenção de amostras de sangue periférico humano	31
5.2	Parasitos	31
5.3	Modulação das amebas e eritrócitos pelas citocinas	31
5.4	Ensaio de viabilidade	32
5.5	Ensaio de eritrofagocitose	32
5.6	Grupo controle	32
5.7	Aspectos éticos	33
5.8	Análise estatística	33
6	Resultados	34

7	Discussão	38
8	Considerações finais	41
9	Referências Bibliográficas	42
	ANEXOS	57
	Anexo 1 – Parecer do comitê de ética	57
	Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	58

Lista de Figuras

- Figura 1** Trofozoítos de *E. histolytica* com eritrócitos ingeridos.
- Figura 2** Viabilidade de eritrócitos tratados por citocinas (IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ).
- Figura 3** Índice de amebas fagocíticas tratadas com citocinas (IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ) na presença de *E. histolytica*.
- Figura 4** Eritrócitos fagocitados pelas amebas tratadas por IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ .

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANOVA	Análise de variância
OMS	Organização mundial da saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>E. dispar</i>	<i>Entamoeba dispar</i>
RNA	Ácido ribonucleico
GAL/GALNac	lectina ligante de galactose/NAcetilgalactosamina
LPG	lipofosfoglicanos
LPPG	lipofosfopeptideoglicanos
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
CPs	Cisteina proteinases
NF- κ B	<i>Factor nuclear kappa B</i>
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
Th17	Célula T helper 17
T CD4	Célula T CD4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina12
IL-17	Interleucina 17
IFN- γ	Interferon gama
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PBS	Solução salina tamponada
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
CONEP	Conselho Nacional de ética em Pesquisa
MN	Mononuclear
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FAPEMAT	Fundação de amparo a pesquisa do estado de mato grosso

Resumo

Entamoeba histolytica é o protozoário causador da amebíase. Essa parasitose é a segunda maior causadora de morte no mundo dentre as doenças parasitárias e se apresenta nas formas intestinais e extra-intestinais. Os trofozoítos, forma invasora da ameba possuem capacidade eritrofagocítica, ou seja, capacidade de fagocitar eritrócitos. A atividade funcional das citocinas na fagocitose foi relatada em células sanguíneas e colostro, porém no processo de fagocitose desse parasita não foi elucidada. Portanto, identificar citocinas que possam modular a ação fagocítica de trofozoítos na eritrofagocitose, é necessário para um melhor entendimento das respostas imunológicas durante a amebíase. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos imunomoduladores de IFN- γ e/ou IL-17 sobre a eritrofagocitose da *E. histolytica*. Os métodos utilizados foram: Ensaio de viabilidade de eritrócitos e ensaio de eritrofagocitose e em um total de 18 amostras de sangue periférico humano de doadores voluntários. A análise estatística foi realizada por análise de Variância (ANOVA), seguido pelo método de Tukey. Observou-se aumento de eritrofagocitose e variação do número de amebas fagocíticas e eritrócitos fagocitados de acordo com a citocina. O índice de amebas fagocíticas foi maior quando as células foram tratadas com citocinas. O maior valor foi observado no ensaio contendo IFN- γ , seguido por IFN- γ + IL-17 e IL-17. O IFN- γ e a combinação de IFN- γ + IL-17 aumentaram o número de eritrócitos fagocitados. Os resultados sugerem que as citocinas desempenham um papel na patogênese da amebíase, por interferir na interação ameba e eritrócitos aumentando a eritrofagocitose, processo considerado fator de virulência de cepas patogênicas de amebas.

Palavras-chave: Amebíase, *Entamoeba histolytica*, Imunomodulação, Citocinas, Fagocitose e Eritrócitos.

Abstract

Entamoeba histolytica is the causative protozoan of amebiasis. This disease is the second leading cause of death worldwide among the parasitic diseases and presents the intestinal forms and extra-intestinal. Trophozoites, invasive form of amoeba have erythrophagocytic capacity, the capacity to phagocytose erythrocytes. The functional activity of cytokines in phagocytosis has been reported in blood cells and colostrum, but in the process of phagocytosis of this parasite has not been elucidated. Therefore, to identify cytokines which may modulate the action of phagocytic trophozoites in erythrophagocytosis, it is necessary for a better understanding of immune responses during amebiasis. The objective of this work was to evaluate the immunomodulatory effects of IFN- γ and / or IL-17 on erythrophagocytosis of *E. histolytica*. The methods used were red cell viability assay and erythrophagocytosis assay and a total of 18 samples of human peripheral blood from volunteer donors. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey method. There was an increase of erythrophagocytosis and variation in the number of phagocytic amoeba and phagocytosed erythrocytes in accordance with the cytokine. The amoebae phagocytic index was higher when cells were treated with cytokines. The highest value was observed in the assay containing IFN- γ followed by IFN- γ + IL-17 and IL-17. IFN- γ and the combination of IFN- γ + IL-17 increased the number of phagocytosed erythrocytes. The results suggest that cytokines play a role in the pathogenesis of amebiasis, amoeba by interfering with the interaction with erythrocytes increase the erythrophagocytosis, the procedure as virulence factor of pathogenic amoebae strains.

Keywords: Amebiasis, *Entamoeba histolytica*, Immunomodulation, Cytokines, Phagocytosis and Erythrocytes.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS), Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) em 1997 denominaram a infecção parasitária causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, como amebíase (WHO, 1997b; FONSECA, 2013).

Essa infecção é considerada importante causa de morbidade e mortalidade humana, com distribuição mundial e alta prevalência em regiões tropicais, principalmente em locais com baixas condições socioeconômicas e deficiência nas condições de higiene e na educação sanitária, pois essas condições contribuem para sua proliferação e transmissão. Com exceção da América Central e Oceania estima-se que, o maior número de casos de amebíase está situado na Ásia, Antártica, África e Europa (WHO, 1997a; SILVA et al., 2005; XIMENES et al., 2009). No Brasil sua prevalência, patogenicidade e virulência apresenta variação de 5,6% a 40%, dependendo da região (CUNHA et al., 1991; SILVA, et al., 2005).

A forma mais comum da doença é a infecção assintomática que abrange 90% dos casos, os 10% restantes são casos sintomáticos caracterizados fundamentalmente por diarreia e disenteria amebiana (DIAMOND & CLARK, 1993). Indivíduos com baixo poder aquisitivo, desnutridos e imunossuprimidos são normalmente mais infectados (WALSH, 1986).

Há no entanto, pequeno percentual de doentes que desenvolvem colite amebiana crônica, que se caracteriza pela presença de lesões múltiplas discretas, que variam entre erosões superficiais no epitélio do cólon e úlceras profundas (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000; GARCIA-ZEPEDA et al., 2007; MORTIMER & CHADEE, 2010).

A *Entamoeba histolytica* é uma espécie de ameba que pode ser encontrada no organismo humano e é a única patogênica dentre todas as diferentes espécies de amebas, por isso é a mais importante (SILVA & GOMES, 2005). Este protozoário pertence ao filo *Sarcomastigophora*, classe *Lobosea*, gênero *Entamoeba*, ordem *Amoebida* e família *Entamoebidae* (WALSH, 1988; CHAVES, 2010). Esta espécie possui uma particularidade, se diferencia pela locomoção e incorporação de alimentos através da emissão de pseudópodes (CHAVES, 2010; FONSECA, 2013).

O protozoário apresenta quatro formas diferentes durante o seu ciclo biológico, dentre elas a forma de trofozoíto também conhecida como forma invasora do parasito. Os trofozoítos desempenham todas as atividades necessárias a sua sobrevivência e na sua forma patogênica, pode conter hemácias nos vacúolos digestivos(LOHIA, 2003;STANLEY, 2003).

O processo que os trofozoítos fagocitam eritrócitos é conhecido como eritrofagocitose (GOMES et al., 1997). Na forma invasiva da amebíase a eritrofagocitose é frequente. A fagocitose inicia-se com a ligação da lectina galactose/N-acetilgalctosamina (OKADA et al., 2005), em seguida para que ocorra a degradação, os ameboporos e as cisteína proteinases são recrutadas para os fagossomas (QUE & REED, 2000; ANDRA et al., 2003).

De acordo com Rey (2010), a ameba patogência utiliza Ferro nos seus mecanismos respiratórios, isso sugere que, a procura avida de hemácias pelo trofozoíto possa ser decorrente da sua necessidade de Ferro acima da média normal.

Diversas células produzem peptideos denominados citocinas que podem ser efetoras e reguladoras de resposta imuno-inflamatórias, agindo sobre vários tipos celulares (SANTOS et al., 2005)

Determinadas citocinas possuem função pró-inflamatória, enquanto, outras apresentam ação anti-inflamatória. A IL-17 e a IFN- γ são exemplos de citocinas pró-inflamatórias (O'GARRA, 1998; NETEA et al., 2003; OLIVEIRA, et al., 2011).No entanto, o efeito modulador dessas citocinas ainda não foi mostrado na eritrofagocitose dos trofozoítos de *E. histolytica*. Assim, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o processo de fagocitose de eritrócitos exercido pela *E. histolytica* após o estímulo de IL-17 e/ou IFN- γ , buscando verificar se tais citocinas podem inteferir na fagocitose dos trofozoítos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Amebíase

A amebíase possui distribuição geográfica de ocorrência mundial e sua maior prevalência ocorre na África, Ásia, Europa e Américas do Norte e do Sul. Estima-se que a doença ocorra em uma frequência variável (0,2 a 50%) dependendo do local (Rodriguez 1985; WHOa, 1997). Ximénez et al., (2009), ressalva que os valores de prevalência da amebíase poderiam estar errados, visto que suas estimativas foram feitas antes da caracterização molecular de *E. histolytica*/*E. dispar* e também por não mencionar ou considerar a *E. moshkovskii*, que é morfologicamente idêntica as espécies citadas como contribuinte para os números de prevalência nas áreas endêmicas. Contudo, de acordo com dados obtidos através de técnicas moleculares as regiões endêmicas da amebíase estão no subcontinente asiático (Índia, Bangladesh), África, países do Pacífico Asiático (Tailândia, Japão), América do Sul e Central (México, Colômbia).

E. histolytica infecta cerca de 500 milhões de pessoas, onde 50 milhões desenvolve a amebíase invasiva. Anualmente, é responsável por 40 a 110.000 mortes humanas no mundo e é a segunda maior causadora de morte dentre as doenças parasitárias (WALSH, 1988; WHO, 1997b; HUSTON, 2004; CIMERMAN & CIMERMAN, 2008; WHO, 2010; TENGKU e NORHAYATI, 2011).

Mesmo comprometendo a saúde de indivíduos de todas as idades e classes sociais, esse parasita atinge 4 vezes mais grupos socioeconômicos inferiores. Essa parasitose é mais frequente nos primeiros anos de vida (GARCIA-MANZO, 1997), havendo maior frequência de amebíase hepática na faixa etária de 30-50 anos e em homens do que mulheres (4:1) (GAYTAN, 1987). A incidência da doença é duas vezes maior no verão do que no inverno (GARCIA-MANZO, 1997).

No Brasil a prevalência da amebíase apresenta uma variação de 5,6% a 40,0% nas suas diferentes regiões, além da variação de patogenicidade e virulência (CUNHA et al., 1991; SILVA, et al., 2005). Rey (1991) verificou que a amebíase invasiva mostrou maior frequência na cidade de Manaus/AM, Belém/PA, João Pessoa/PB e Porto Alegre/RS.

As características clínicas da amebíase variam de colonização assintomática (90%), à amebíase intestinal que pode ocasionar úlceras e colite amebiana com quadros não disentéricos (90%) ou disentéricos podendo evoluir para um quadro mais severo de disenteria amebiana aguda. Pode ocorrer o desenvolvimento de amebíase extra intestinal invasiva, acometendo vários órgãos, no entanto, se manifesta mais comumente na forma de abscessos no fígado e pulmões (WALSH, 1988; PETRI, 2000; LUCAS & UPCROFT, 2001; TENGKU & NORHAYATI, 2011; HAQUE et al., 2003; GARCIA-ZEPEDA et al., 2007).

Após a colonização de trofozoítos na mucosa intestinal, os sintomas apresentados podem ser dor abdominal, diarreia sanguinolenta ou não, com presença de muco abundante, tenesmo frequente e em alguns casos, febre. Casos mais graves apresentam perfuração do cólon, colite fulminante, megacólon tóxico ou ameboma, com apresentação de sintomas que envolvem dores abdominais intensas, vinte ou mais episódios por dia de diarreia com sangue, febre, taquicardia, hipotensão e obstrução intestinal (XIMÉNEZ et al., 2009).

A amebíase extra intestinal ocorre em 10% dos indivíduos infectados, onde os trofozoítos migram até o fígado pelo sistema porta desencadeando a formação de abscessos hepáticos amebianos. Os abscessos hepáticos são as formas mais frequentes da amebíase extra intestinal e a maior causa de morte por este protozoário (ESPINOSA-CANTELLANO e MARTINEZ-PALOMO, 2000). Estudo mostra que, os abscessos são observados em adultos com idade entre 20 e 50 anos principalmente e que os homens são mais propensos a desenvolver a doença, até 15 vezes mais do que as mulheres (XIMÉNEZ et al., 2009).

O lóbulo hepático direito é o mais frequentemente afetado, devido à circulação do sistema porta. O lóbulo esquerdo também pode ser infectado e grandes abscessos podem levar ao comprometimento das cavidades peritoneal, pleural ou pericárdica (HUGHES & PETRI, 2000).

2.2 Complexo *E. histolytica*/*E. dispar*

O microrganismo intestinal causador de amebíase invasiva foi reconhecido em 1975. No entanto, esse organismo foi nomeado pela primeira vez em 1903 como *Entamoeba histolytica* (DIAMOND & GRAHAM, 1993; JACKSON, 1998).

Para explicar os casos assintomáticos de amebíase, em 1925 BRUMPT sugeriu a existência de uma espécie morfológicamente idêntica a espécie de *E. histolytica*, denominada *Entamoeba dispar*. A princípio não havia como diferenciá-las, por isso muitos pesquisadores rejeitaram essa ideia. Tempos depois a classificação das formas patogênicas e não patogênicas de *E. histolytica* foi possível, através de pesquisa de perfil isoenzimático (zymodemes) de vários isolados (SARGEANT, 1982). A partir disso, pesquisadores reconsideraram a teoria de Brumpt ao correlacionar os zymodemes com outros dados biológicos e moleculares. Assim, em 1993 os dois organismos foram nomeados como *E. histolytica* e *E. dispar* (DIAMOND & GRAHAM, 1993).

A *E. histolytica* é o agente patogênico responsável pela amebíase invasiva, causador da colite amebiana e da amebíase extra intestinal. Esta espécie acomete 10% da população mundial (BRAGA, 1998; CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Com aproximadamente nove vezes mais prevalência a *E. dispar* é a forma não patogênica, um parasito não invasivo do intestino humano, ou seja, é um comensal intestinal estável e avirulento que gera um estado assintomático no indivíduo portador (WHO, 1997b; JACKSON, 1998). De acordo com Moran (2005), este protozoário não é capaz de causar nenhum sinal da doença ou invadir mucosa mesmo em pacientes com AIDS. Mundialmente acometem 90% dos casos assintomáticos (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

A confirmação e a aceitação dessas duas espécies diferentes de amebas provocaram um grande impacto na compreensão da amebíase e no seu manejo clínico (JACKSON, 1998).

Apesar da *E. dispar* não ser relacionada à doença invasiva no homem, foi observado que os trofozoítos dessa espécie apresentaram potencial patogênico na presença de bactérias intestinais em hamsters (COSTA, et al., 2006; COSTA et al., 2007).

No entanto, existem outras espécies de amebas que não são patogênicas, além da *E. dispar*, tais como a *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba moshkovskii* (NEVES SANTOS, 2014). A *Entamoeba moshkovskii* também é morfológicamente idêntica a *E. histolytica* e *E. dispar*, e é altamente prevalente em alguns países endêmicos. Contudo, essa espécie não foi mencionada ou considerada como contribuinte para os números de prevalência em áreas endêmicas (TENGGU e NORHAYATI, 2011).

2.3 Morfologia

A *E. histolytica* é um parasita extracelular que vive normalmente no lúmen do intestino grosso na maior parte dos casos como comensal, não desencadeando sintomas. Mas pode habitar outros tecidos na forma invasora da doença (STANLEY, 2003; CHAVES, 2010).

Durante o ciclo biológico o parasito apresenta quatro fases: a forma trofozoíto, pré-cisto, cisto e metacisto (SILVA E GOMES, 2005; CHAVES, 2010).

O trofozoíto (forma vegetativa) é a forma invasora do parasito. Mede cerca de 10 a 60µm, apresenta forma amebóide e é pleomórfica. Possui uma parede externa denominada ectoplasma com capacidade de se projetar formando os pseudópodes, que são responsáveis pela sua movimentação e alimentação (CORDEIRO & MACEDO, 2007). O trofozoíto se alimenta de restos celulares, partículas líquidas por pinocitose e fagocita pequenas bactérias (PESSOA & MARTINS, 1978; SILVA & GOMES, 2005). Já na endossoma é encontrado um pequeno núcleo que possui cariossoma central e cromatina periférica uniformemente distribuída e ligada à membrana nuclear. A cromatina foi avaliada como responsável pela maioria da síntese e acúmulo de RNAr, equivalendo-se ao nucléolo (ALBACH, 1989). O citoplasma possui grande quantidade de vesículas e vacúolos de diversos tamanhos, capazes de produzir e armazenar enzimas aptas a fagocitar e a destruir tecidos. Essas vesículas e vacúolos também podem conter restos celulares, hemácias intactas ou em processo de degradação (CHÁVEZ-MUNGUÍA, 2004; De SOUZA, 2006; CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Os pré-cistos são a fase intermediária entre o trofozoíto e o cisto. São ovais e menores que os trofozoítos (RAVDIN, 1995; NEVES et al., 2011).

Os cistos (forma de resistência) é a forma infectante do protozoário, o seu tamanho varia de 10 a 20µm de diâmetro, possuem formato oval ou esférico e apresentam de 1 a 4 núcleos de acordo com a fase de maturação. Apresenta parede rígida e resistente devido à quitina e glicoproteínas presentes, permitindo ao parasito resistir ao suco gástrico, fatores ambientais externos e a níveis usuais de cloro na água. O citoplasma apresenta vacúolos de glicogênio e corpos cromatóides em formato de bastonete e ponta arredondada (CORDEIRO & MACEDO, 2007). Os corpos cromatóides estão envolvidos na síntese de proteínas (RAVDIN, 1995). Conforme os cistos amadurecem, tanto os corpos cromatóides como os vacúolos desaparecem. Os cistos maduros possuem 4 núcleos e somente eles são infecciosos (CORDEIRO & MACEDO, 2007; STANLEY, 2003).

Os metacistos são formas desenvolvidas a partir dos cistos. São multinucleados e dão origem aos trofozoítos quando se dividem no intestino delgado (NEVES et al., 2011; SILVA & GOMES, 2011).

2.4 Ciclo Biológico

O ciclo de vida da *E. histolytica* é simples, monoxênico e tem início quando o homem se infecta ingerindo a forma cística madura presente na água ou alimentos contaminados por fezes de indivíduos portadores da ameba, por contato fecal-oral ou por mãos contaminadas de pessoa a pessoa. Outras formas menos usuais de transmissão incluem o sexo anal e oral e o uso de equipamentos de lavagem intestinal contaminados. Os cistos maduros sofrem desencistamento no lúmen do intestino delgado dando origem aos metacistos. Os metacistos por sua vez sofrem divisão binária dando origem aos trofozoítos (STANLEY, 2003).

A forma trofozoítica (forma invasora) da ameba migra para o intestino grosso onde se aderem ao muco e as células epiteliais. Podem sofrer o processo de encistamento no lúmen do cólon gerando inicialmente as formas pré-cistos e depois novos cistos que serão eliminados junto às fezes humanas (HUSTON, 2004).

Os cistos eliminados podem sobreviver por semanas no meio ambiente, resistindo às condições desfavoráveis devido à proteção que a sua parede cística confere, prosseguindo com o seu ciclo de vida, podendo assim, infectar outro

indivíduo tornando-o um novo hospedeiro (TANYUSKEL&PETRI 2003; SAMIE et al.,2012).

No meio externo, a capacidade de sobrevivência de trofozoítos que são eliminados em fezes diarreicas é menor, pois são destruídos rapidamente depois de eliminados e quando ingeridos, não resistem às enzimas digestivas (CORDEIRO & MACEDO, 2007).

Na forma não invasiva os trofozoítos continuam no lúmen intestinal dos portadores assintomáticos e são eliminados nas fezes. Na forma invasiva os trofozoítos penetram na mucosa intestinal invadindo-a, chega a corrente sanguínea alcançando assim, outros órgãos como fígado, pulmão e encéfalo, provocando a amebíase extra intestinal (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-PALOMO, 2000).

2.5 Patogenicidade

A *E. histolytica* é capaz de sintetizar produtos amebianos que estão envolvidos no seu potencial virulento. São eles: os amebaporos, a lectina ligante de galactose/NAcetilgalactosamina (GAL/GALNAc), cisteína proteinases, fosfatases, lipofosfoglicanos (LPG) e lipofosfopeptideoglicanos (LPPG). Esses produtos induzem a destruição celular.

Quando ocorre interação deste protozoário com as células do hospedeiro, um processo de invasão epitelial no intestino grosso é desencadeado. Devido a esse mecanismo de invasão, uma resposta inflamatória é ativada, garantindo ao parasito capacidade patogênica (MORTIMER & CHADEE, 2010).

In vivo foi verificado que a colite amebiana desenvolve-se após os trofozoítos de *E. histolytica* destruírem a barreira de muco invadindo o epitélio intestinal. Assim, as células epiteliais podem secretar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que agem induzindo a migração de neutrófilos e células mononucleares para o local (SEYDEL & STANLEY, 1998; GARCIA-ZEPEDA et al., 2007; MORTIMER & CHADEE, 2010).

A invasão dos tecidos pelos trofozoítos é responsável pela evolução da patogênica. Inicialmente ocorre adesão entre a ameba e a célula que será lesada com objetivo de ultrapassar a barreira epitelial. Após a passagem pela barreira

epitelial, a invasão tecidual ocorre através de movimentos ameboides e a liberação de enzimas proteolíticas. A forma infectante do parasito (trofozoíto) libera grandes quantidades de proteínas no local, que causam maior dano a célula-alvo, resultando em uma resposta inflamatória aguda. Ela pode ser intensificada por ação de fagócitos. A medida que a lesão progride, a superfície mucosa é privada de fluxo sanguíneo, necrosando, com perfuração da parede intestinal e infecção sistêmica (LEROY et al., 2000; MIRELMAN et al., 2008; LEJEUNE et al., 2009; NEVES et al., 2011).

Pesquisadores buscam desvendar novos fatores que determinam a virulência da *E. histolytica* (SANTI-ROCCA et al., 2009). Considera-se como principais fatores de virulência as proteínas amebianas denominadas lectina galactose/N-acetilgalactosamina, os ameboporos que lisam células favorecendo a resposta inflamatória e as cisteína proteases, secretadas pelos trofozoítos que são capazes de degradar imunoglobulinas (IgA e IgG) de mucosa intestinal (BRITO et al., 2007; MIRELMAN et al., 2008).

Esse parasita também pode apresentar mecanismos de evasão da resposta imune. Durante a infecção, os trofozoítos fagocitam e induzem apoptose de células do hospedeiro. Esses mecanismos parecem permitir a evasão do parasito da resposta imune, limitando a inflamação (HUSTON et al., 2003). Outro fato que parece permitir sua evasão é a capacidade que o protozoário tem de inibir a produção de metabólitos ativos de oxigênio em monócitos na leucofagocitose (FRANÇA-BOTELHO et al., 2010).

2.6 Diagnóstico e Tratamento

Os sinais e sintomas da amebíase são inespecíficos e podem ser confundidos com os de outras infecções intestinais. A ferramenta mais utilizada em laboratórios para o diagnóstico de amebíase é a análise microscópica de cistos e/ou trofozoítos presentes no sedimento fecal. Esta avaliação não permite a diferenciação entre *E. histolytica* (patogênica) e espécies não patogênicas como *E. dispar* e *E. moshkovskii* (HAQUE & PETRI, 2006). Existem métodos imunológicos capazes de diferenciar as espécies, por meio da pesquisa de anticorpos e antígenos específicos. No entanto, o

método de escolha para o diagnóstico específico da amebíase é a reação em cadeia da polimerase (PCR)(NEVES SANTOS, 2014).

Alguns testes são realizados com fins diagnósticos para amebíase extra intestinal, como por exemplo, a presença de leucocitose, o aumento no número de neutrófilos, velocidade da sedimentação globular e altos níveis de fosfatase alcalina, aliados à presença de altos níveis de anticorpos circulantes antiamebianos (XIMÉNEZ et al., 2009).

Portadores de espécies de amebas não patogênicas não necessitam de tratamento (HARI et al., 2013; SETO et al., 2012). No entanto, o diagnóstico específico de *E. histolytica* é fundamental, mas para isso necessita-se do desenvolvimento de um diagnóstico laboratorial barato e específico (NEVES SANTOS, 2014). O amebicida utilizado mundialmente é o metronidazol, medicamento de escolha na amebíase intestinal e hepática. Quando os resultados do tratamento não são satisfatórios recomenda-se a associação do amebicida com antibiótico.

Além do tratamento é necessário impedir a contaminação de alimentos e da água, através de medidas profiláticas, tais como; saneamento básico, educação sanitária e controle das pessoas que manipulam alimentos que podem conter amebíase assintomática (SILVA & GOMES, 2005).

2.7 Resposta Imunológica para *E. histolytica*

Durante a infecção amebiana a imunidade inata e a imunidade adaptativa colaboram para defesa do hospedeiro, apesar de seus mecanismos não estarem totalmente esclarecidos (SHIBAYAMA et al., 2008).

2.7.1 Imunidade Inata

Existem evidências que os mecanismos da imunidade inata são fundamentais na eliminação do parasito. Respostas celulares da imunidade inata parecem ser suficientes para eliminar o protozário na maioria dos infectados, através do estímulo de resposta inflamatória(ESPINOSA-CANTELLANO & MARTINEZ-

PALOMO, 2000; GARCIA-ZEPEDA et al., 2007; MORTIMER & CHADEE, 2010). Ao induzir resposta inflamatória em animais, os mesmos ficaram protegidos de desenvolver amebíase invasora (SHIBAYAMA et al., 2008).

A mucosa intestinal funciona como uma barreira imunológica que impede a invasão de microrganismo. Promove proteção pela ação conjunta do epitélio prismático, células produtoras de muco, células apresentadoras de antígenos, linfócitos e polimorfonucleares, da IgA e de citocinas (CARRERO et al., 2007). O muco produzido no intestino, constituído por mucinas altamente glicosiladas é a primeira barreira contra a adesão e invasão de parasitos. Age impedindo o acesso de microrganismos ao epitélio e facilitando sua eliminação pelo fluxo intestinal. As mucinas são alvos da clivagem glicosídica desencadeada pelos trofozoítos na adesão e invasão do parasita (TSE & CHADEE, 1992; VARIYAM, 2007).

Logo nos primeiros dias de infecção, a imunidade inata medeia os principais mecanismos de resistência contra infecção amebiana intestinal, independente de ativação de linfócitos (BURCHARD et al., 1993; SALATA & RAVDIN, 1986; SEYDEL et al., 1998).

O Sistema complemento é um importante componente do sistema imunológico inato, os seus fragmentos são responsáveis pelo desencadeamento de uma resposta inflamatória local o que facilita a destruição e remoção de parasitas (OYEYINKA et al., 1983; BOHSON et al., 2007). Em hospedeiros não imunizados as vias alternativa e clássica do sistema complemento podem desempenhar funções no controle e desenvolvimento da amebíase (CALDERON & SCHREIBER, 1985; REED et al., 1986). Pesquisas mostraram que trofozoítos são constantemente expostos ao complemento, levando a sua ativação pela via alternativa através das CPs (REED & GIGLI, 1990; CAPIN et al., 1978). A ativação da via clássica pode ocorrer pela superfície da ameba sem participação de anticorpos específicos (CALDERON & SCHREIBER, 1985).

Em resposta a infecção amebiana aguda as primeiras células recrutadas são os neutrófilos. As lesões são caracterizadas pela presença de células inflamatórias (BRACHA et al., 1999). Pesquisas realizadas em camundongos verificaram que os neutrófilos apresentam importância na amebíase intestinal, agindo na proteção contra o parasita e controlando a expansão das lesões intestinais (ASGHARPOUR et al., 2005) e na amebíase hepática, pois agem nos mecanismos de resistência a

infecção e na sua ausência a ameba é capaz de produzir danos no fígado desses animais (VELAZQUEZ et al., 1998; PÉREZ-TAMAYO et al., 2006).

Apesar de estudos *in vitro* e *in vivo* já terem demonstrado que essas células tem importância no controle da infecção amebiana, os neutrófilos também estão associados com a destruição tecidual contribuindo para o avanço da doença (SEYDEL, et al., 1997; STENSON, et al., 2001; ZHANG, et al., 2003). A inflamação é a causa principal de dano tecidual (PÉREZ-TAMAYO et al., 2006).

Além dos neutrófilos, os sinais de citocinas pró-inflamatórias também promovem a migração de macrófagos que apresentam funções na amebíase intestinal e hepática. Os macrófagos promovem uma linha de defesa depois da infiltração maciça de neutrófilos na amebíase hepática aguda, ativam trofozoítos da ameba patogênica e quando estimulados adequadamente podem apresentar atividade amebicida que parece ser mediada por óxido nítrico (NO) (GUERRANT et al., 1981; SEYDEL et al., 2000).

In vivo já foi demonstrado aumento sobretudo de eosinófilos na amebíase intestinal (GHOSH et al., 2000). Contudo, a função específica desse tipo celular na regulação da infecção por *E. histolytica* ainda esta em discussão (LOPEZ-OSUNA et al., 1997; VENTURA-JUÁREZ et al., 2007).

Estudo realizado em pacientes com colite amebiana, evidenciou que a imunidade inata tem importância fundamental na resolução da doença. Essa avaliação foi feita após a administração de altas doses de corticosteróides, potentes inibidores de NF- κ B, onde os pacientes que receberam essas doses apresentaram doença mais grave (STANLEY-Jr, 2003).

2.7.2 Imunidade Adaptativa

Na imunidade adaptativa tanto a imunidade humoral (mediada por anticorpos) quanto à imunidade celular (mediada por linfócitos T) estão envolvidas na patogênese da amebíase (BANSAL et al., 2005).

Imunidade Humoral

A resposta imune adaptativa ocorre principalmente com a síntese de imunoglobulinas da classe IgA com ação neutralizante (HAQUE, 2001; ABD ALLA, 2012). Infecções nas superfícies mucosas têm como primeira linha de defesa específica a Imunoglobulina A (IgA) secretada. Na amebíase, esse anticorpo é produzido por uma resposta imune local desencadeada pela infecção intestinal por *E. histolyticae* são detectáveis na mucosa. Na amebíase sintomática e invasiva há uma produção regular de anticorpos anti-ameba, já na amebíase assintomática os mesmos são sintetizados com frequência variável (CARRERO et al., 2007).

Apesar da IgA aparentemente não conferir proteção na amebíase intestinal recentemente adquirida, esse anticorpo tem sido demonstrado na proteção de reinfecções ocorridas em áreas endêmicas (HAQUE et al., 2002). Estudo *in vivo* indica que a imunidade humoral parece não ser muito eficaz na eliminação de amebas (CAMPOS-RODRIGUES et al., 2000).

De acordo com estudos, quando os trofozoítos invadem os tecidos, uma resposta humoral é ativada (PÉREZ & KRETSCHMER, 1994; MANRIQUE, et al., 2002). No entanto, pesquisas mostram que essa ativação não possui relação com o estado clínico ou com a intensidade da infecção (CARRERO et al., 2007), pois ocorre produção de anticorpos, mesmo após a cura da doença e esses anticorpos persistem por anos a títulos baixos (VINAYAK et al., 1986; PÉREZ; KRETSCHMER, 1994; MANRIQUE, et al., 2002).

Imunidade Celular

Existem evidências que a imunidade celular é fundamental para o controle da infecção. *In vivo* após supressão da imunidade celular, os animais apresentaram quadro clínico grave, com invasão tecidual (WANG et al., 1992; PÉREZ & KRETSCHMER, 1994). Os linfócitos T possuem um subtipo denominado Linfócito T helper 1 ou Th 1, suas respostas foram avaliadas como responsáveis pelo controle da evolução amebiana invasiva (KRETSCHMER & LOPES-OSUNA, 1990). Os linfócitos T produzem citocinas que podem ser importantes mediadores durante a infecção amebiana (LOCKSLEY, 2001).

In vitro linfócitos T CD8⁺ de pacientes curados de abscessos hepáticos amebianos foram capazes de lisar amebas e para exercerem essa ação amebicida, esses linfócitos necessitaram de contato célula a célula e da ação de certas citocinas como IFN- γ (SCHAIN et al., 1992).

Em estudo feito em gerbils, Campbell & Chadee (1997) relacionam o aumento de citocinas de linfócitos Th1, a mecanismos eficazes na cura dos abscessos hepáticos. As células Th 1 são secretoras de citocinas dentre elas a IFN- γ (FRUCHT et al., 2001). Macrófagos ativados *in vitro* com a estimulação de IFN- γ , produziram óxido nítrico (NO) e destruíram trofozoítos mais eficazmente, sugerindo a necessidade de resposta de Th 1 para ativação de macrófagos (LIN & CHADEE, 1992; SALATA et al., 1985).

Respostas imunes Th2 tem sido relacionada a progressão da colite amebiana, enquanto que, respostas Th1 parecem mediar a resolução da infecção nessa fase da doença. (ESPINOSA-CANTELLANO E MARTINEZ-PALOMO, 2000; GARCIA-ZEPEDA et al., 2007; MORTIMER & CHADEE, 2010).

2.8 Citocinas (IFN- γ e IL-17)

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, que varia entre 8 e 30 kDa (Quilodalton). Essas substâncias são produzidas por diversos tipos de células presentes no local da lesão e por células do sistema imunológico. Liga-se a receptores específicos, ativando assim mensageiros intracelulares que regulam a transcrição gênica. Esses mecanismos influenciam na atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência da célula imune. Regulam a síntese e atividade de outras citocinas, como as pró-inflamatórias que aumentam a resposta inflamatória e as anti-inflamatórias que atenuam essa resposta (LIN, et al., 2000; SOMMER & WHITE, 2010; CURFS et al., 1997). De acordo com o microambiente, algumas citocinas agem como pró ou anti-inflamatórias.

Células da imunidade inata e adaptativa sintetizam IL-17, como a T CD4 (Th 17) (PECKHAM et al., 2014). Essa citocina é considerada pró-inflamatória e desencadeia a formação de outras citocinas, IL-6 e IL-8 (quimiocina) e da molécula de adesão presente em fibroblastos humanos e atua em linfócitos T (LIN, et al., 2000; SOMMER & WHITE, 2010; OLIVEIRA, et al., 2011).

As células T e NK sintetizam a citocina IFN- γ respondendo a estímulos inflamatórios e imunes variados (BILLIAU & MATTHYS, 2001). Essa é a principal citocina produzida por células Th1, estimuladas por IL-12. Sua produção é fundamental para que a resposta imune contra patógenos seja eficiente (FRUCHT et al., 2001). Praticamente todas as células expressam receptores para IFN- γ , desse modo, agem em muitos órgãos e tecidos do corpo.

Infecções intracelulares dependem de resposta imune mediada por células, onde o IFN- γ é um dos principais moduladores (DORMAN & HOLLAND, 2000). A ação dessa citocina é fundamental na modulação da resposta inflamatória, pois defeitos associados aos mecanismos de atuação do IFN- γ causam grandes danos na resistência contra infecções virais e bacterianas (BILLIAU, 2006). É ativando macrófagos e células endoteliais, estimulando secreção de quimioquinas, citocinas quimiotáticas e outros mediadores inflamatórios que o IFN- γ interfere na modulação da resposta inflamatória. Aumentam ainda, a atividade de células apresentadoras de antígenos e o reconhecimento destes por linfócitos T. Aciona também a transcrição de genes participantes da atividade antiviral, apoptose, processamento de antígeno, expressão de MHC e o desenvolvimento de células Th1. Agem em macrófagos induzindo-os a destruir e/ou limitar o crescimento bacteriano (DORMAN & HOLLAND, 2000).

Em testes *in vivo* e *in vitro* esta citocina demonstrou participar ativamente na migração de leucócitos dentre eles, os neutrófilos principalmente. *In vivo*, mostrou ser capaz de recrutar neutrófilos para o local da inflamação, após ativação do endotélio (ROUSSEL et al., 2010).

Assim como o papel dos leucócitos e dos anticorpos, o papel desempenhado pelas citocinas também não está completamente esclarecido, na proteção contra a amebíase e no desenvolvimento das lesões amebianas (JARILLO-LUNA et al., 2002). A função das citocinas no processo de fagocitose dos trofozoítos da *E. histolytica* não foi elucidado, portanto, identificar citocinas que possam modular a eritrofagocitose, pode ser necessário para melhor entendermos as respostas imunes ocorridas durante a amebíase.

2.9 Eritrofagocitose

Eritrofagocitose é o termo dado a capacidade de fagocitose de eritrócitos desempenhada pelos trofozoítos de *E. histolytica* (Figura 1).

A capacidade de fagocitose dos trofozoítos desempenha papel importante na patogenicidade e na virulência da *E. histolytica*. A eritrofagocitose *in vivo* é característica da amebíase invasiva, já a deficiência deste mecanismo é considerada fator de avirulência (BOETTNER et al., 2005).

Em estudo comparativo de eritrofagocitose entre um isolado patogênico e outro não patogênico de *E. histolytica*, observaram que o isolado patogênico fagocitou maior número de eritrócitos do que o não patogênico, sugerindo que o processo de fagocitose pode ser usado como marcador de linhagens invasivas da espécie causadora de amebíase (TRISSEL, 1978a; TRISSEL, 1978b).

A fagocitose esta envolvida nos mecanismos de agressão da *E. histolytica*, pois foi verificado que clones de trofozoítos com baixa taxa de eritrofagocitose foram incapazes de formar abscessos hepático em hamster. Contudo, ao reativar a virulência através de sucessivas passagens pelo fígado de hamster jovens, os trofozoítos readquiriram simultaneamente a capacidade de causar abscessos hepáticos e taxa elevada de eritrofagocitose (Orozco et al., 1983).

Ao verificar a existência de ligantes presentes nos eritrócitos que eram reconhecidos pelos trofozoítos necessários para a realização da fagocitose, pesquisadores observaram que a *E. histolytica* antes da ingestão provocava mudanças nos eritrócitos, como a exposição da fosfatidilserina (BOETTNER et al., 2005).

A eritrofagocitose é um parâmetro que avalia a capacidade de fagocitose dos trofozoítos a partir do número de amebas fagocíticas e número médio de eritrócitos fagocitados pelo parasito (TRISSEL, 1978a; TRISSEL, 1978b). Assim, essa técnica é uma das principais formas para se realizar a caracterização de cepas de *E. histolytica* e *E. dispar* quanto à sua virulência e patogenicidade (GOMES et al., 1997).

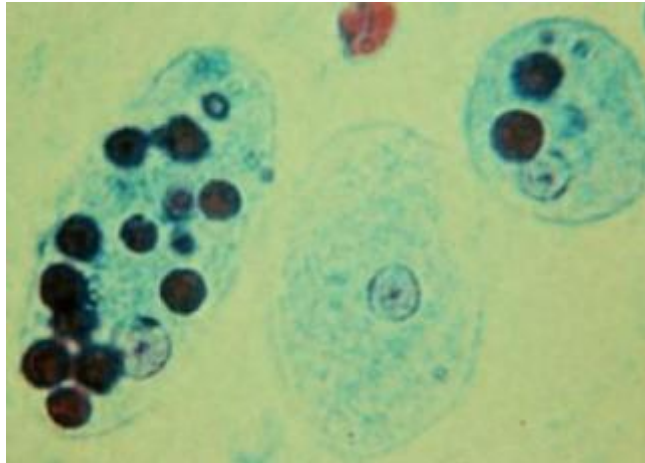


Figura 1. Trofozoítos de *E. histolytica* com eritrócitos ingeridos. Fonte: <http://emedicine.medscape.com/article/212029-overview>.

Imunomodulador como o hormônio melatonina ao ser avaliada a interação de amebas com eritrócitos não interfere de maneira significativa na eritrofagocitose (FRANÇA-BOTELHO, 2009).

3 JUSTIFICATIVA

A amebíase, infecção desencadeada pela *Entamoeba histolytica* é a protozoonose mais grave que atinge o intestino humano. Possui distribuição mundial é a segunda causa parasitária líder de morte no mundo (RAVDIN, 1995; HUGHES & PETRI, 2000; STANLEY, 2003; PINILLA et al., 2008).

Estima-se quemundialmente,50 milhões de pessoas estejam infectadas pela ameba patogênica, onde 40 a 110.000indivíduos morrem anualmente devido à amebíase invasora(WHOb, 1997; TENGKU & NORHAYATI, 2011; NEVES SANTOS, 2014).

Os trofozoítos de *E. histolytica*possuem capacidade de fagocitar eritrócitos,fato importante,para sua patogenicidade e virulência (BOETTNER et al., 2005).Mesmo assim, não está totalmente explicado, o papel e as consequências deste processo durante a infecção (OROZCO et al., 1983; BOETTNER et al., 2008).

Emboraessa parasitose seja tema de discussão a anos, a maioria dos estudos desenvolvidos busca esclareceros mecanismos de lesão tecidual observados em pacientes infectados. Sendo pouco conhecido na amebíase, as interações das amebas patogênicas com mediadores imunológicos, como citocinas e a viabilidade dos eritrócitos frente a essas proteínas imunomoduladoras.

O papel de citocinas na fagocitose já foi relatado em células sanguíneas e colostro, porém na eritrofagocitose dos trofozoítos não está claro(FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; FRANÇA et al., 2011; FRANÇA et al., 2012; MORAES et al., 2015).Neste contexto, não se conhece qualquer ação das citocinas IFN- γ e/ou IL-17.

Portanto, identificar a atividade funcional dessas citocinas na interação ameba-eritrócito é importante para melhor compreendermos as respostas imunológicas durante a amebíase.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar os efeitos imunomoduladores das citocinas IFN- γ /ou IL-17 sobre a eritrofagocitose da *Entamoeba histolytica*.

4.2 Objetivos específicos

- Verificar a viabilidade dos eritrócitos na presença das citocinas IFN- γ /ou IL-17;
- Avaliar a eritrofagocitose da *E. histolytica* na presença de IFN- γ /ou IL-17;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção de amostras de sangue periférico humano

Foram coletadas 18 amostras de aproximadamente 8 ml de sangue periférico em tubos contendo EDTA e processadas imediatamente. As amostras utilizadas neste estudo foram de doadores clinicamente saudáveis, do sexo masculino de idade entre 18 a 35 anos. Todos os doadores receberam orientações em relação aos fins de que a coleta destina-se para um trabalho científico e assinaram o termo de consentimento esclarecido (TCLE) (Anexo 2), segundo aprovação pelo Comitê de Ética do Campus Araguaia- UFMT(Anexo 1).

5.2 Parasitos

Foram realizadas subculturas de *E. histolytica* Cepa HM-1 assegurando sua viabilidade e crescimento. As culturas foram gentilmente cedidas pelo laboratório de Amebíase da UFMG/MG. Os parasitos foram mantidos no Laboratório de Imunomodulação da UFMT, garantindo a sua utilização em fase exponencial de crescimento.

5.3 Modulação das amebas e eritrócitos pelas citocinas

A modulação das amebas e das células por citocinas foram realizadas de acordo com protocolo específico, desenvolvido em estudos anteriores pelo nosso grupo, onde foram empregados diferentes agentes imunomoduladores, entre eles, hormônios, plantas com potencial terapêutico e anticorpos (HONORIO-FRANÇA et al., 1997; HONORIO-FRANÇA et al., 2001; FRANÇA-BOTELHO et al., 2006; FRANÇA et al., 2009; FRANÇA et al., 2010; FRANÇA et al., 2011; FRANÇA-BOTELHO et al., 2011; SCHERER et al., 2011). Assim, de acordo com este protocolo de modulação os trofozoítos (1×10^6 cels/ml) e eritrócitos (1×10^8 células/ml) foram pré-incubados com as citocinas (100 ng/ml) (FRANÇA, 2002; FAGUNDES et

al., 2013), por 120 minutos a 37 °C. Em seguida foram realizados os ensaios de viabilidade e eritrofagocitose.

5.4 Ensaio de Viabilidade de Eritrócitos

Foram misturadas as suspensões de eritrócitos (1×10^8 células/ml) com as citocinas (100 ng/ml), seguido de incubação em banho-maria a 37° C por 120 minutos. Após este processo as células foram coradas com 200µl de acridina orange por 2 minutos, em seguida foi ressuspendida com PBS, seguida de duas lavagens. Com o sedimento obtido foram confeccionadas lâminas e a contagem foi feita em microscópio de fluorescência. Foram contadas 100 células por lâmina, a coloração permite determinar a morte das hemácias após a exposição. Os resultados foram obtidos pela análise em microscópio de fluorescência.

5.5 Ensaio de Eritrofagocitose

Os trofozoítos foram ajustados para 1×10^6 ml em PBS, 0,4 ml. Esta suspensão interagiu com 1×10^8 ml de eritrócitos (relação de 1:100 ameba e eritrócito) e citocinas (100 ng/ml). O tempo desta interação foi 120 minutos. Os resultados foram demonstrados em porcentagem das amebas fagocíticas e do número de eritrócitos fagocitados pelas amebas, contando-se 100 amebas por lâmina (GOMES et al., 1997).

5.6 Grupo controle

As suspensões de trofozoítos e hemácias previamente ajustadas foram associadas e pré-incubadas a 37°C. Após 120 minutos desta interação foi estabelecida uma porcentagem de amebas fagocíticas e do número de eritrócitos fagocitados pelo protozoário, contando 100 amebas por lâmina.

5.7 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do Campus Araguaia da Universidade Federal de Mato Grosso. As considerações éticas foram baseadas no uso do material biológico para fins científicos, com sigilo da identidade do doador, livre de coação ou conflito de interesses da instituição ou de pessoas envolvidas no projeto. Os doadores foram previamente informados e o material foi coletado sob expresso consentimento em formulário específico (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme resolução 196/96 do Conselho Nacional de ética em Pesquisa (CONEP)).

5.8 Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo método de comparação de médias, Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo método de Tukey, sendo considerado significativo quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

A análise dos dados se dispõe sob forma de figuras, apresentadas na sequência abaixo:

- » Viabilidade de eritrócitos.
- » Eritrofagocitose
 - Índice de amebas fagocíticas.
 - Eritrócitos fagocitados.

A figura 2 mostra o percentual da viabilidade de eritrócitos tratados com três grupos diferentes de citocinas, IL-17 (90%), IFN- γ (88%) e IL-17 + IFN- γ (92%). O controle (90%) foi realizado apenas com células sem a presença de citocinas, ($p \geq 0,05$).

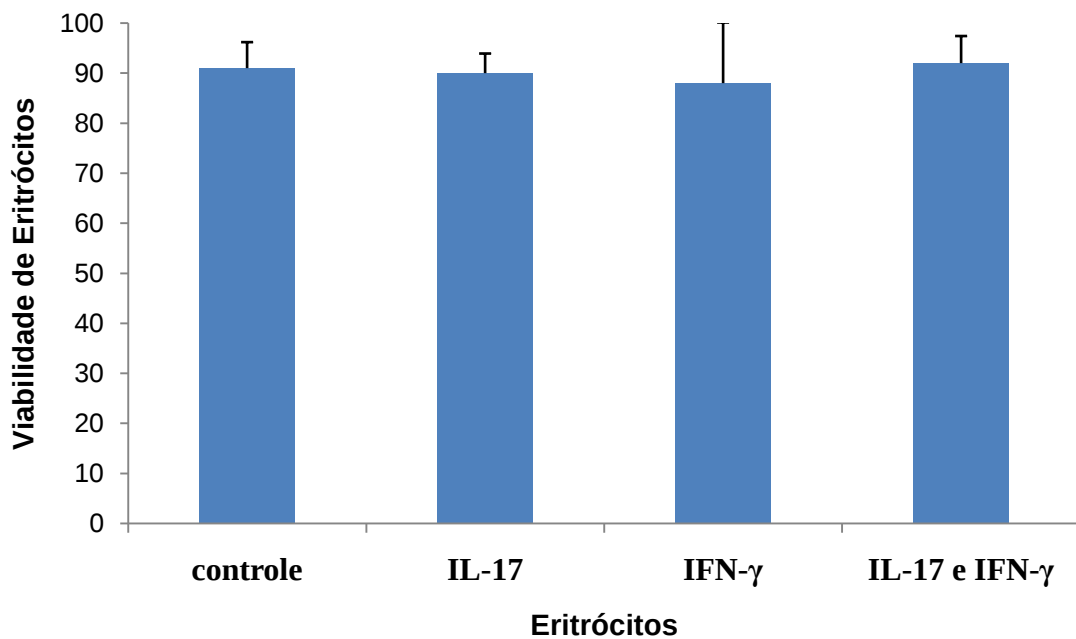


Figura 2. Viabilidade de eritrócitos tratados por citocinas (IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ).

Ao verificar a porcentagem de eritrócitos obtidos pela leitura da viabilidade celular, as hemácias apresentaram-se viáveis mesmo após exposição às citocinas, mostrando assim, que esses imunomoduladores não interferem de maneira significativa na sua viabilidade em relação ao controle do ensaio.

A eritrofagocitose foi averiguada, logo após análise de viabilidade das hemácias. Como mostra a figura 3, verificamos inicialmente a porcentagem de trofozoítos de *E. histolytica* que realizaram fagocitose de eritrócitos após exposição às citocinas. Observou-se que todas as citocinas foram capazes de elevar o número dessas amebas em relação ao grupo controle (13%). O índice mais elevado foi observado no IFN- γ (95%), seguido por IL-17 + IFN- γ (92%) e IL-17 (80%).

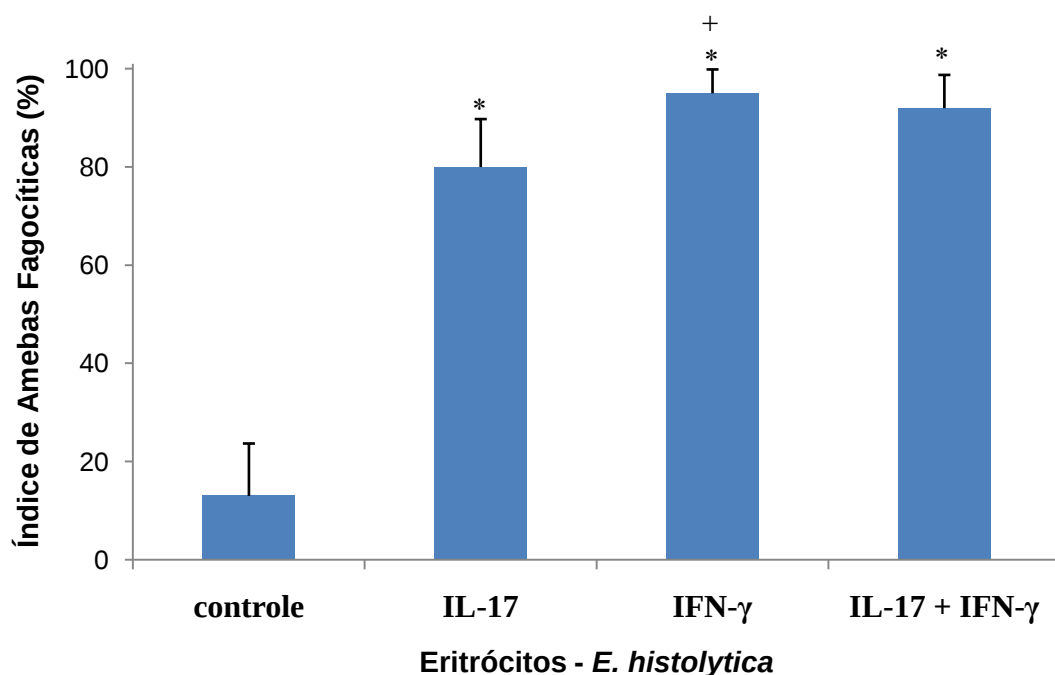


Figura 3. Índice de amebas fagocíticas tratadas com citocinas (IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ) na presença de *E. histolytica* $p < 0,05$.

* indica diferenças entre o grupo controle (sem citocinas) e os grupos estimulados com citocinas.

+ indica diferença estatística entre o grupo estimulado com IFN- γ , comparado com o grupo tratado com IL-17.

O número de eritrócitos fagocitados pelos trofozoítos foi o segundo parâmetro avaliado na eritrofagocitose, conforme mostra a figura 4. Observa-se o grupo controle (n=3) e os grupos contendo citocinas, onde houve aumento desse valor. Nos ensaios das citocinas, a IL-17 (n=8) e o IFN- γ (n=8) apresentaram valores iguais e maiores, seguidas pelo grupo IL-17 + IFN- γ (n=7). Foi utilizado eritrócitos e trofozoítos de *E. histolytica* para formar o grupo controle.

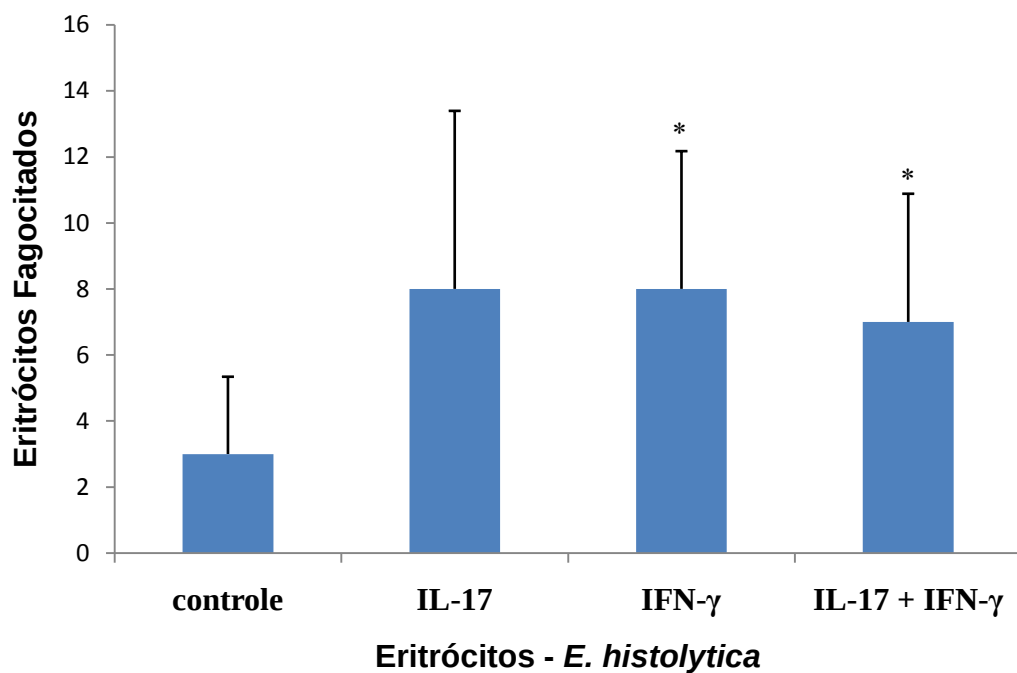


Figura 4. Eritrócitos fagocitados pelas amebas tratadas por IL-17, IFN- γ e IL-17 + IFN- γ . $p < 0,05$.

* indica diferença entre o grupo controle (sem citocinas) e os grupos tratados com IFN- γ e IL-17 + IFN- γ .

7 DISCUSSÃO

Mundialmente a amebíase representa um importante risco à saúde, depois da malária é a principal causa de morte por parasita. O quadro infeccioso é normalmente assintomático restrito ao trato gastrointestinal, mas alguns indivíduos podem apresentar doença invasiva intestinal ou extra-intestinal, com quadros comuns de abscesso hepático (HUGHES & PETRI, 2000; CORDEIRO & MACEDO, 2007; PINILLA et al., 2008).

O sistema imunológico é fundamental na mediação das interações entre o hospedeiro e os microrganismos presentes no ambiente intestinal (IZCUE et al., 2009). Os trofozoítos das amebas quando confrontados pelas defesas imunes se adaptam ao novo ambiente e modulam as respostas imunes, levando a sua sobrevivência e a formação de focos inflamatórios. Os efeitos citopatogênicos e a inflamação podem ser causados pelos produtos provenientes do parasita e/ou das células do sistema imune (SANTI-ROCCA et al., 2009).

A infecção começa com o desenvolvimento de processo inflamatório acarretando no recrutamento de células como eosinófilos, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (OLIVOS-GARCIA et al., 2004). A ameba patogênica provoca destruição do tecido infectado através da secreção de proteinases, morte por contato de células-alvo e fagocitose de eritrócitos (SANTOS & SOARES, 2008).

Na amebíase invasiva já foi demonstrado, que as amebas fagocitam tanto células saudáveis como células mortas por apoptose (HUSTON, 2003). A fagocitose de eritrócitos é uma característica frequente da doença e se correlaciona com a capacidade patogênica e virulenta do parasita (BOETTNER et al., 2005).

A eritrogagocitose é um método capaz de identificar a infecção invasiva de *E. histolytica* por microscopia (GONZÁLEZ-RUIZ et al., 1994). Contudo, mesmo sendo considerado um fator determinante de virulência, não é bem esclarecido o papel que esse processo tem na patologia (OROZCO et al., 1983) e ainda sabe-se pouco, do por que células são ingeridas por este parasita e qual a consequência disso no desenvolvimento da doença. No entanto, esse processo é tão importante que profissionais da saúde usam a presença de eritrócitos ingeridos pelos trofozoítos, para identificar e diferenciar as amebas patogênicas das amebas comensais do intestino (BOETTNER et al., 2008).

Ao avaliar a capacidade fagocitária de cepas de *Entamoeba* foi verificado que a virulência de *E. histolytica* está relacionada com sua atividade fagocítica, pois a cepa virulenta apresentou maior atividade fagocitária eritrofagocítica e leucofagocítica (FRANÇA-BOTELHO, 2010).

As citocinas parecem ter importância na amebiose, mas ainda é escasso o conhecimento sobre seus efeitos em infecções parasitárias. Ao avaliar o IFN- γ foi verificado que, na presença dessa citocina, as amebas fagocitaram um número menor de células MN e as células MN tratadas com tal citocina apresentou maior índice amebicida e de apoptose e aumentou a liberação de cálcio intracelular. Por apresentar aumento da morte de amebas durante a leucofagocitose e ativar células MN contra *E. histolytica*, sugere-se que, a IFN- γ possa modular a atividade funcional de células MN e exercer papel importante no controle de infecções amebianas (MORAES, 2015).

Foi verificado que o IFN- γ atua normalmente na migração de neutrófilos para o local inflamado, após ativação endotelial (ROUSSEL et al., 2010) e em monócitos e macrófagos que são fagócitos com atividade microbicida (PACHECO-YÉPEZ et al., 2010).

In vitro ou *in vivo*, a estimulação de citocinas pró-inflamatórias desempenha papel na regulação da inflamação após a infecção por *E. histolytica*. Respostas dependentes Th1-IFN- γ ou o aumento dessa citocina podem fornecer proteção (GUO et al., 2011), pois é capaz de ativar macrófagos para manter o parasita sob controle e evitar sua propagação. Já sua diminuição pode aumentar a suscetibilidade a infecção amebiana (BANSAL, 2005).

A IL-17, produzida principalmente por células Th17 induz a produção de outras citocinas, promove o início e/ou mantém respostas inflamatórias e exibe papel na proteção contra doenças infecciosas, permitindo que o organismo elimine agentes patogênicos (JOVANOVIĆ, 1998; BAI, 2009).

Estudos têm relatado a migração de células Th17 para a mucosa do cólon (WANG et al., 2009) e o aumento da expressão de IL-17A em modelos murinos de colite amebiana, correlacionando esses eventos com proteção contra a colite (GUO et al., 2008b; ROJAS-LÓPEZ et al., 2012).

Ao avaliarem a vacinação em camundongos para a espécie de ameba patogênica foi observado que, tanto o IFN- γ como a IL-17 foram essenciais para a

proteção e que a IL-17 desempenhou um papel de cooperação com o IFN- γ (GUO, 2011), sugerindo uma interação entre as células Th1 e Th17 (LIN, 2009;SHI, 2010). O aumento da expressão de IFN- γ e IL-17 foi associado ao desenvolvimento de resposta inflamatória crônica em camundongos (ROJAS-LÓPEZ, 2012). No entanto, estas citocinas possuem propriedades fisiológicas mal definidas e seu exato papel na amebíase não está elucidado.

Pesquisas mostraram que, portadores assintomáticos apresentaram níveis elevados de IFN- γ (Th1), já os portadores de amebíase aguda tinham níveis elevados de IL-4, citocina do perfil Th2 (SÁNCHEZ-GUILLÉN, et al., 2002). Assim, a resposta equilibrada de citocinas Th1 de proteção e Th2 considerada prejudicial, pode ser fundamental para a resolução da infecção, na colite amebiana crônica (HOUP et al., 2002;GUO et al., 2008a). Sugere-se que respostas desreguladas de Th1, Th2 e Th17 possam ser capazes de induzir colite em modelos murinos (IZCUE et al., 2009).

Diante disso, devemos considerar que, a evolução da amebíase depende também da resposta imune do hospedeiro, visto que, as células do sistema imunológico contribuem para o controle da infecção amebiana, mas também podem contribuir para o dano tecidual (STANLEY, 2003;SANTI-ROCCA et al., 2009).

O IFN- γ , a IL-17 e sua combinação possuem efeitos imunomoduladores, mas pouco se sabe sobre suas influências em infecções por protozoários, como a *Entamoeba histolytica*. Menos ainda se conhecem seus efeitos na fagocitose de eritrócitos que este parasita realiza durante a infecção. Considerando a importância que esse processo representa para *E. histolytica*, investigou-se o papel dessas citocinas.

Neste estudo, as citocinas IFN- γ , IL-17 e IFN- γ +IL-17 estimularam maior atividade fagocitária eritrofagocítica desta espécie *in vitro*, sugerindo um possível papel na patogênese da infecção amebiana, que pode levar a uma reação inflamatória e resultar em dano celular e tecidual, pois a fagocitose de eritrócitos é considerada fator de virulência de cepas patogênicas de amebas.

8 Considerações Finais

- ✓ A eritrofagocitose foi maior nos ensaios contendo citocinas.
- ✓ O percentual de amebas fagocíticas e o número de eritrócitos fagocitados, variam de acordo com o grupo de citocina.
- ✓ O índice de amebas fagocíticas foi maior quando as células foram tratadas com citocinas. O maior valor foi observado no ensaio contendo IFN- γ , seguido por IFN- γ + IL-17 e IL-17.
- ✓ Quanto ao número de eritrócitos fagocitados, o IFN- γ e a combinação de IFN- γ + IL-17 aumentaram essa taxa.
- ✓ Esses dados sugerem que as citocinas interferem nas interações entre amebas e eritrócitos *in vitro*.
- ✓ As citocinas IFN- γ , IL-17 e a combinação de IFN- γ + IL-17 aumentam a eritrofagocitose dos trofozoítos da cepa *in vitro* e parece ter um papel na patogênese da amebíase.

9 Referências Bibliográficas

ABD ALLA, M.D.; WOLF, R.; WHITE, G.L.; KOSANKE, S.D.; CARY, D.; VERWEIJ, J.J.; ZHANG, M.J.; RAVDIN, J.I. Efficacy of a Gal-lectin subunit vaccine against experimental *Entamoeba histolytica* infection and colitis in baboons (*Papio* sp.). **Vaccine**. v. 30, p. 3068-3075, 2012.

ALBACK, R.A. Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Protozoology**, v. 36, p. 197-205, 1989.

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

ANDRÄ, J.; HERBST, R.; LEIPPE, M. Amoebapores, archaic effector peptides of protozoan origin, are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 27, p. 291–304, 2003.

BAI, A.; LU, N.; GUO, Y.; LIU, Z.; CHEN, J.; PENG, Z. All-trans retinoic acid down-regulates inflammatory responses by shifting the Treg/Th17 profile in human ulcerative and murine colitis. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 86, p. 959-969, 2009.

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

BILLIAU, A. Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 17, p. 381-409, 2006.

BILLIAU, A.; MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **Journal Leukocyte Biology**, v. 70, p. 849-60, 2001.

BOETTNER, D.R.; HUSTON, C.D.; SULLIVAN, J.A.; PETRI, W.A. Jr. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* utilize externalized phosphatidylserine for recognition and phagocytosis of erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3422-3430, 2005.

BOETTNER, D.R.; HUSTON, C.D.; LINFORD, A.S.; BUSS, S.N.; HOUP, E.; SHERMAN, N.E.; PETRI, W.A. Jr. *Entamoeba histolytica* Phagocytosis of Human Erythrocytes Involves PATMK, a Member of the Transmembrane Kinase Family. **PLoS Pathogens**, v. 4, p. 112-133, 2008.

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

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

BRAGA, L.L.; MENDONÇA, Y.; PAIVA, C.A.; SALES, A.; CAVALCANTE, A.L.M.; MANN, B.J. Seropositivity for/and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3044-3045, 1998.

BRITO, K.N.O.; CALIARI, M.V.; GOMES, M.A. **Avaliação histopatológica e imuno histoquímica de cepas xênicas e axênica**. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

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

BURCHARD, G.D.; PRANGE, G.; MIERELMAN. Interaction between trophozoites of *Entamoeba histolytica* and a human intestinal cell line HT-29 in the presence or absence of leukocytes. **Parasitology Research**, 79, p. 140-145, 1993.

CALDERON, J. & SCHEREIBER, R.D. Activation of the Alternative and Classical Complement Pathways by *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, v. 50, p.560-565, 1985.

CAMPBELL, D., CHADEE K. Interleukin (IL)-2, IL4, and tumor necrosis factor-responses during *Entamoeba histolytica* liver abscess development in gerbils. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, 1176-1183, 1997.

CAMPOS-RODRIGUEZ, R.; JARILLO-LUNA, A.; VENTURA-JUÁREZ, J.; SHIBAYAMA, M.; PACHECO-YÉPEZ, J.; SERRANO-LUNA, J.; TSUTSUMI, V.; Interaction of antibodies with de *Entamoeba histolytica* trophozoites from experimental amebic liver abscess: na immunocytochemical study. **Parasitology research**, v. 86, p. 603-607, 2000.

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

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

CORDEIRO, T.G.P. & MACEDO, H.W. Amebíase. **Revista de Patologia Tropical**,v. 36, p.119-128, 2007.

COSTA, A.O.; GOMES, M.A; ROCHA, O.A.; SILVA, E.F. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. Histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, p. 245-250, 2006.

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

CHAVES, A.C.P.; SEIXAS FILHO, J.T.; DANTAS, M.M.L. Revisão do mecanismo fisiopatológico da amebíase. **Revista Augustus**, v. 14, n. 29, p. 74-87, 2010.

CHÁVEZ-MUNGUÍA, B.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, V.; ANGEL, A.; RÍOS, A.; TALAMÁS-ROHANA, P.; GONZÁLEZ-ROBLES, A.; GONZÁLEZ-LÁZARO, M.; MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. **Experimental Parasitology**,v. 107, p. 39-46, 2004.

CUNHA, A.S.; CASTRO, L.; ROCHA, P. Amebíase. In: **Tópicos em gastroenterologia tropical**.Rio de Janeiro: Editora Medsi; 1991. p. 287-316.

CURFS, J.H.; MEIS, J.F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 742-780, 1997.

DIAMOND, L.S. & CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 40, p. 340-344, 1993.

De SOUZA, W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, p. 271-291, 2006.

DORMAN, S.E.; HOLLAND, S.M. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 11, p. 321-333, 2000.

ESPINOSA-CANTELLANO, M. & MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 318-331, 2000.

FONSECA, K.G.S. dos A. **Avaliação enzimática e funcional de fosfatases associadas à virulência em trofozoítos de *Entamoeba histolytica***. Tese de Doutorado, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, 2013.

FRANÇA-BOTELHO, A.C. **Avaliação da interferência da melatonina nas interações entre trofozoítos de *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba díspar* com células sanguíneas**. 2009. 117 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FRANÇA-BOTELHO, A.C.; HONÓRIO-FRANÇA, A.C.; FRANÇA, E.L.; GOMES, M.A.; COSTA-CRUZ, J.M. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostral leukocytes. **Acta Paediatrica**, v. 95, n. 4, p. 438-443, 2006.

FRANÇA-BOTELHO, A.C. FRANÇA, E.L.; FRANÇA, A.C.; HONORIO-FRANCA, H.G.N.; BUSATTI, O.; GOMES, M.A. Relationship between oxidative stress production and virulence capacity of *Entamoeba* strains. **Research Journal of Parasitology**, v. 5, p. 139–147, 2010.

FRANÇA, E. L. HARA, C.C.P.; FAGUNDES, D.L.A.; LIMA, N.A.P.; RATTO, S.H.B.; HONORIO-FRANCA, A.C. Fluctuation in the functional activity of human colostrum phagocytes to *Streptococcus pneumoniae* and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 1, p. 1-6, 2012.

FRANÇA, E.L.; BITENCOURT, R.V.; FUJIMORI, M.; De MORAIS, T.C.; CALDERON IDE, M.; HONORIO-FRANÇA, A.C. Human colostral phagocytes eliminate enterotoxigenic *Escherichia coli* opsonized by colostrum supernatant. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 44, p. 1-7, 2011

FRUCHT, D.M.; FUKAO, T.; BOGDAN, C.; SCHINDLER, H.; O'SHEA, .JJ.; KOYASU, S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. **Trends in Immunology**, v. 22, p. 556-560, 2001.

GAYTÁN, S.; INGRID, E. Amebiasis. **Infectologia**, v. 7, p. 25-35, 1987.

GARCÍA-MANZO N. T.; ROMERO, C.E.; SOTO, J.C.; DE LA PEÑA, J.E.; ALVAREZ, J.O.; BATALLA, A.S. Patterns of the morbidity and mortality of amebiasis and amebic liver abscess in Mexico: an ecological analysis. **Archives of Medical Research**, v. 28, p. 290-292, 1997.

GARCIA-ZEPEDA, E.A., ROJAS-LOPEZ, A., ESQUIVEL-VELAZQUEZ, M., OSTOA-SALOMA, P. Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/chemokine network in amoebiasis. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 679-684, 2007.

GOMES, M.A.; MELO, M.N.; PENA, G.P.M.; SILVA, E.F. Virulence parameters in the characterization of strains of *Entamoeba histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 2, 1997.

GONZÁLEZ-RUIZ, A.; HAQUE, R.; AGUIRRE, A.; CASTAÑÓN, G.; HALL, A.; GUHL, F.; RUIZ-PALACIOS, G.; MILES, M.A.; WARHURST, D.C. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive *Entamoeba histolytica*. **Journal of clinical pathology**, v. 47, p. 236–239, 1994.

GHOSH, P.K.; VENTURA, G.J.; GUPTA, S.; SERRANO, J.; TSUTSUMI, V.; ORTIZ-ORTIZ, L. Experimental amebiasis: immunohistochemical study of immune cell populations. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 47, 395-399, 2000.

GUERRANT, R.L.; BRUSH, J.; RAVDIN, J.I.; SULLIVAN, J.A.; MANDELL, G.L. Interaction between *Entamoeba histolytica* and human polymorphonuclear neutrophils. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 143, p. 83-93, 1981.

GUO, X. STROUP, S.E.; HOUP, E.R. Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN- γ . **Mucosal Immunology**, v. 1, p. 139-146, 2008a.

GUO, Z.; JANG, M.; OTANI, K.; BAI, Z.; UMEMOTO, E.; MATSUMOTO, M.; NISHIYAMA, M.; YAMASAKI, M.; UEHA, S.; MATSUSHIMA, K.; HIRATA, T.; MIYASAKA, M. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the small intestinal lamina propria show an effector/memory phenotype. **Internacional Immunology**, v. 20, p. 307-315, 2008b.

GUO, X.; BARROSO, L.; LYERLY, D.M.; PETRI, W.A. Jr.; HOUP, E.R. CD4⁺ and CD8⁺ T cell- and IL-17-mediated protection against *Entamoeba histolytica* induced by a recombinant vaccine. **Vaccine**, v. 29, p. 772-777, 2011;

HARI, A.; SRIKANTH, B.A.; LAKSHMI, G.S. Metronidazole induced cerebellar ataxia. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 295-297, 2013.

HAQUE, R.; ALI, I.M.; SACK, R.B.; FARR, B.M.; RAMAKRISHNAN, G.; PETRI, W.A. Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi Children. **The Journal of Infect Diseases**, v. 183, p.1787-1793, 2001.

HAQUE, R.; DUGGAL, P.; ALI, I.M.; HOSSAIN, M.B.; MONDAL, D.; SACK, R.B.; FARR, B.M.; BEATY, T.H.; PETRI JR.; W.A. Innate and acquired resistance to amebiasis in bangladeshi children. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 547-552, 2002.

HAQUE, R.; Huston, C.D.; Hughes, M.; Houpt, E.; Petri, W.A. Jr. Amebiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1565–1573, 2003.

HAQUE, R.; PETRI, W.A. Jr. Diagnosis of amebiasis in Bangladesh. **Archives of Medical Research**, v. 37, p. 273-276, 2006.

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

HUGHES, M.A.; PETRI, W.A. Jr. Amebic liver abscess. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, p. 565-582, 2000.

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

HUSTON, C.D. Parasite and host contributions to the pathogenesis of amebic colitis. **Trends in Parasitology**, v. 20, p. 23-26, 2004.

IZCUE, A.; COOMBES, J.L.; POWRIE, F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 313-338, 2009.

JACKSON, T.F. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* are distinct species: Clinical, epidemiological and serological evidence. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 181–186, 1998.

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. **Experimental Parasitology**, v. 101, p. 40-56, 2002.

JOVANOVIC, D.V.; Di BATTISTA, J.A.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOLICOEUR, F.C.; HE, Y.; ZHANG, M.; MINEAU, F.; PELLETIER, J.P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of immunology**, v. 160, p. 3513-3521, 1998.

KRETSCHMER, R.R.& LÓPEZ-OSUNA, M. Effector mechanisms and immunity to amebas. In **Infection and Disease by *E. histolytica***, ed. Kretschmer RR. Boca Ratón: CRC Press; p. 105–122, 1990.

LEJEUNE, M.; RYBICKA, J.M.; CHADEE, K. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. **Future Microbiology**, v. 4, p. 105-118, 2009.

LEROY, A.; LAUWAET, T.; DE BRUYNE, G.; CORNELISSEN, M.; MAREEL, M. *Entamoeba histolytica* disturbs the tight junction complex in human enteric T84 cell layers. **FASEB Journal**, v. 14, n. 9, p. 1139-1146, 2000.

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

LIN, E.; CALVANO, S.E.; LOWRY, S.F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126, 2000.

LIN, Y.; RITCHEA, S.; LOGAR, A.; SLIGHT, S.; MESSMER, M.; RANGEL-MORENO, J.; GUGLANI, L.; ALCORN, J.F.; STRAWBRIDGE, H.; PARK, S.M.; ONISHI, R.; NYUGEN, N.; WALTER, M.J.; POCIASK, D.; RANDALL, T.D.; GAFFEN, S.L.; IWAKURA, Y.; KOLLS, J.K.; KHADER, S.A. Interleukin-17 is required for T helper 1 cell immunity and host resistance to the intracellular pathogen *Francisella tularensis*. **Immunity**, v. 31, p. 799–810, 2009.

LOCKSLEY, R.M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, p. 487–501, 2001.

LOHIA, A. The cell cycle of *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 253, p. 217–222, 2003.

LOPEZ-OSUNA, M., VELAZQUEZ, J.R., KRETSCHMER, R.R., 1997. Does the eosinophil have a protective role in amebiasis? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, p. 237-240, 1997.

LUCAS, R. & UPCROFT, J. A. Clinical significance of the redefinition of the agent of amoebiasis. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v. 43, p. 183-187, 2001.

MANRIQUE, O.R.; ROMERO, H.U.; BARRIOS, M.H.; MUÑOZ, J.F. Evaluación de la actividad de polimorfonucleares neutrófilos frente a antígenos de cepas patógenas de *Entamoeba histolytica*. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v. 54, p. 96-100, 2002.

MIRELMAN, D.; ANBAR, M.; BRACHA, R. Trophozoites of *Entamoeba histolytica* epigenetically silenced in several genes are virulence-attenuated. **Parasite**, v. 15, p. 266-274, 2008.

MORAES, L.C.A.; FRANCA, E.L.; PESSOA, R.S.; FAGUNDES, D.L.G.; HERNANDES, M.G.; RIBEIRO, V.P.; GOMES, M.A.; HONORIO-FRANCA, A.C. The effect of IFN- γ and TGF- β in the functional activity of mononuclear cells in the presence of *Entamoeba histolytica*. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 1-8, 2015.

MORAN, P.; RAMOS, F.; RAMIRO, M.; CURIEL, O.; GONZÁLEZ, E.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A.; GARCÍA, G.; MELENDRO, E.I.; XIMÉNEZ, C. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 331-334, 2015.

MORTIMER, L.; CHADEE, K. The immunopathogenesis of *Entamoeba histolytica*. **Experimental Parasitology**, v. 126, p. 366-380, 2010.

NETEA, M.G.; VAN DER MEER, J.W.; VAN DEUREN, M.; KULLBERG, B.J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunology**, v. 24, p. 254-258, 2003.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**. ed. 12. São Paulo: Editora Atheneu. 2011, p. 137-149.

NEVES SANTOS, F.L. A amebíase deveria detectar-se com metodologias diagnósticas mais económicas e específicas. **Salud i Ciencia**, v. 21, p. 65-71, 2014.

O'GARRA, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. **Immunity**, v. 8, p. 275-283, 1998.

OKADA, M.; HUSTON, C.D.; MANN, B.J.; PETRI-J. W.A.; KITA, K.; NOZAKI, T. Proteomic analysis of phagocytosis in the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p. 827–831, 2005.

OLIVEIRA, C.M.B.; SAKATA, R.K. TSA.; ISSY, A.M.; GEROLA, L.R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, p. 255-265, 2011.

OLIVOS-GARCIA, A.; NEQUIZ-AVENDAÑO, M.; TELLO, E.; MARTINEZ, R.D.; GONZALEZ-CANTO, A.; LÓPEZ-VANCELL, R.; GARCÍA de LEÓN, M.C.; MONTFORT, I.; PÉREZ-TAMAYO, R. Inflammation, complement, ischemia and amoebic survival in acute experimental amoebic liver abscesses in hamsters. **Experimental and Molecular Pathology**, v.77, p. 66-71, 2004.

OROZCO, E.; GUARNEROS, G.; MARTINEZ-PALOMO, A.; SANCHEZ, T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 158, p. 1511–1521, 1983.

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

PACHECO-YÉPEZ, J.; GALVÁN-MOROYOQUI, J.M.; MEZA, I.; TSUTSUMI, V.; SHIBAYAMA, M. Expression of cytokines and their regulation during amoebic liver abscess development. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 56-64, 2010.

PECKHAM, R.K.; BRILL, R.; FOSTER, D.S.; BOWEN, A.L.; LEIGH, J.A. COFFEY, T.J.; FLYNN, R.J. Two distinct populations of Bovine IL-17⁺T-cells can be induced and WC1⁺IL-17⁺γδ T-cells are effective killers of protozoan parasites. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1-5, 2014.

PÉREZ, M.R. & KRETSCHMER, R.R. Respuesta de inmunidad humoral. In: KRETSCHMER, R. R. ed. Amibiasis Infección y Enfermedad. México, DF. Editorial Trillas, p. 299, 1994.

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

PESSOA, S.B. & MARTIS, A.V. **Parasitologia Médica**. ed. 10. Rio de Janeiro: Guanabara koogan. 2010. p. 872, 1978.

PETRI, W.A. JR.; HAQUE, R.; LYERLY, D.; VINES, R.R. Estimating the impact of amebiasis on health. **Parasitology Today**, v. 16, p. 320-321, 2000.

PINILLA, A.E.; LÓPEZ, M.C.; VIASUS, D.F. Historia del protozoo *Entamoeba histolytica*. **Revista Médica de Chile**, v. 136, p. 118-124, 2008.

QUE, X. & REED, S. L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13 p. 196-206, 2000.

RAVDIN, J.I. Amebiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, p. 1453-1466, 1995.

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

REED, S.L., GIGLI, I. Lysis of complement-sensitive *Entamoeba histolytica* by

activated terminal complement components. Initiation of complement activation by an extracellular neutral cysteine proteinase. **The journal of clinical investigation**, v. 86, p. 1815-1822, 1990.

REY, L. Amebíase. In: **Parasitologia Medica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1991, p. 252-265.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. ed. 3. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 97-108.

RODRIGUEZ, C.F. Epidemiología de la amebiasis en Colombia. **Revista de La Universidad Industrial de Santander - Medicina**, v. 13, p. 81-101, 1985.

ROJAS-LÓPEZ, A.E.; SOLDEVILA, G.; MEZA-PÉREZ, S.; DUPONT, G.; OSTOASALOMA, P.; WURBEL, M.A.; VENTURA-JUÁREZ, J.; FLORES-ROMO, L.; GARCÍA-ZEPEDA, E.A. CCR9+ T cells contribute to the resolution of the inflammatory response in a mouse model of intestinal amoebiasis. **Immunobiology**, v. 217, p. 795-807, 2012.

ROUSSEL, L.; HOULE, F.; CHAN, C.; YAO, Y.; BÉRUBÉ, J.; OLIVENSTEIN, R.; MARTIN, J.G.; HUOT, J.; HAMID, Q.; FERRI, L.; ROUSSEAU, S. IL-17 Promotes p38 MAPK-Dependent Endothelial Activation Enhancing Neutrophil Recruitment to Sites of Inflammation. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 4531-4537, 2010.

SALATA, R.A.; PEARSON, R.A.; RAVDIN J.I. Interaction of human leukocytes with *Entamoeba histolytica*: killing of virulent amebae by the activated macrophage. **The American society for Clinical Investigation**, v. 76, p. 491-499, 1985.

SALATA, R.A & RAVDIN, J. I. The Interaction of human neutrophils and *Entamoeba histolytica* increases cytopathogenicity for liver cell monolayer. **The Journal Infections Diseases**, 154, p. 19-26, 1986.

SAMIE, A.; ELBAKRI, A.; ABUODEH, R. Amebiasis in the Tropics: Epidemiology and Pathogenesis. In: **Current Topics in Tropical Medicine**, 201-226, 2012.

SANTI-ROCCA, J.; RIGOTHIER, M.C.; GUILLEN, N. Host-microbe interactions and defense mechanisms in the development of amoebic liver abscesses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, p. 65-75, 2009.

SANTOS, K.F.; MAZZOLA, T.N.; CARVALHO, H.F. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, 1531-1541, 2005.

SANTOS, F.L.N. & SOARES, N. M. Physiopathogenic mechanisms and laboratorial diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 44, p. 249-261, 2008.

SÁNCHEZ-GUILLÉN Mdel.C.; PÉREZ-FUENTES, R.; SALGADO-ROSAS, H.; RUIZ-ARGÜELLES, A.; ACKERS, J.; SHIRE, A.; TALAMÁS-ROHANA, P. Differentiation of *entamoeba histolytica/entamoeba dispar* by PCR and their correlation with humoral and cellular immunity in individuals with clinical variants of amoebiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 731-737, 2002.

SARGEAUNT, P.G.; WILLIAMS, J.E.; BHOJNANI, R.; KUMATE, J.; JIMENEZ, E. A review of isoenzyme characterization of *Entamoeba histolytica* with particular reference to pathogenic and non-pathogenic stocks isolated in Mexico. **Archivos de Investigación Médica**, v. 13, p. 89-94, 1982.

SCHAIN, D.C.; SALATA, R.A.; RAVDIN, J.I. Human T-lymphocyte proliferation, lymphokine production, and amebicidal activity elicited by the galactose-inhibitable adherence protein of *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2143-2146, 1992.

SETO, K.; KNOWLES, S.R.; WEBER, E.A. Immediate hypersensitivity reaction induced by metronidazole. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, p. 763-764, 2012.

SEYDEL, K.B & STANLEY, Jr. S.L. 1998. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor alphadependent pathway of apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 2980-2983, 1998.

SEYDEL, K.B.; ZHANG, T.; STANLEY, Jr.S.L. Neutrophils play a critical role in early resistance to amebic liver abscesses in severe combined immunodeficient mice. **Infection and Immunity**, 65, 3951, 1997.

SEYDEL, K.B.; LI, E.; ZHANG, Z.; STANLEY JR, S.L.; Epithelial cell-initiated inflammation plays a crucial role in early tissue damage in amebic infection of human intestine. **Gastroenterology**, v. 115, p. 1446-1453, 1998.

SEYDEL, K.B.; SMITH, S.J.; STANLEY, S.L. Innate immunity to amebic liver abscess is dependent on gamma interferon and nitric oxide in a murine model of disease. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 400-402, 2000.

SHIBAYAMA, M.; RIVERA-AGUILAR, V.; BARBOSA-CABRERA, E.; ROJAS-HERNÁNDEZ, S.; JARILLO-LUNA, A.; TSUTSUMI, V.; PACHECO-YEPEZ J.; CAMPOS-RODRÍGUEZ, R. Innate immunity prevents tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 1032-1042, 2008.

SHI, Y.; LIU, X.F.; ZHUANG, Y.; ZHANG, J.Y.; LIU, T.; YIN, Z.; WU, C.; MAO, X.H.; JIA, K. R.; WANG, F.J.; GUO, H.; FLAVELL, R.A.; ZHAO, Z.; LIU, K.Y.; XIAO, B.; GUO, Y.; ZHANG, W.J.; ZHOU, W.Y.; GUO, G.; ZOU, Q.M. Helicobacter pylori-induced Th17 responses modulate Th1 cell responses, benefit bacterial growth, and contribute to pathology in mice. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 5121–5129, 2010.

SILVA, E.F & GOMES, M.A. **Parasitologia humana**. ed. 11. São Paulo: Atheneu Editora, 2005, p. 127- 138.

SILVA, M.C.M.; MONTEIRO, C.S.P.; ARAÚJO, B.A.V.; SILVA, J.V.; PÓVOA, M.M. Determinação da infecção por *Entamoeba histolytica* em residentes da área metropolitana de Belém, Pará, Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de antígenos. **Caderno de Saúde Pública**,v.21, p. 969-973, 2005.

STANLEY-Jr.S.L. Amoebiasis. **The Lancet**, v. 361, p. 1025-1032, 2003.

STENSON, W.F.; ZHANG, Z.; RIEHL, T.; STANLEY, Jr.S.L. Amebic infection in the human colon induces cyclooxygenase-2. **Infection and Immunity**,v. 69, p. 3382, 2001.

TANYUSKEL, M. & PETRI-J, W.A. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, P. 713-729, 2003.

TENGKU, S.A& NORHAYATI, M. Public health and clinical importance of amoebiasis in Malaysia: a review. **Tropical Biomedicine**, v. 28, p. 194-222, 2011.

TSE, S.K. & CHADEE, K.;Biochemical characterization of rat colonic mucins secreted in responseto *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 1603-1612, 1992.

TRISSEL, D.; MARTINEZ-PALOMO, A.; DE LA TORRE, M.; DE LA HOZ, R.; PEREZ DE SUÁREZ, E. Phagocytosis of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*. Quantitative study. **Archives of Investigation Medicine**, v. 9, p. 219-222, 1978a;

TRISSEL, D.; MARTINEZ-PALOMO, A.; DE LA TORRE, M.; DE LA HOZ, R.; PEREZ DE SUÁREZ, E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 148, n. 5, p. 1135-1143, 1978b.

VARIYAM, E.P.; Luminal host-defence mechanisms against invasive amebiasis. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 108-111, 2007.

VELAZQUEZ, C.; SHIBAYAMA-SALAS, M.; AGIRRE-GARCÍA, J.; TSUTSUMI, V.; CALDERON, J. Role of neutrophils in innate resistance to *Entamoeba histolytica* liver infection in mice. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 255-262, 1998.

VENTURA-JUAREZ, J.; BARBA-GALLARDO, L.F.; MUNOZ-FERNANDEZ, L.; MARTINEZ-MEDINA, L.; MARQUEZ-DIAZ, F.; SOSA-DIAZ, S.J.; GERARDO-RODRIGUEZ, M.; GONZALEZ-ROMO, R.; CAMPOS-RODRIGUEZ, R. Immunohistochemical characterization of human fulminant amoebic colitis. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 201-209, 2007.

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

XIMÉNEZ, C.; MORÁN, P.; ROJAS, L.; VALADEZ, A.; GÓMEZ, A. Reassessment of the epidemiology of amebiasis; state of the art. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, p. 1023-1032, 2009.

ZHANG, Z., MAHAJAN, S., ZHANG, X., STANLEY Jr. S.L. Tumor necrosis factor is a key mediator of gut inflammation seen in amebic colitis in human intestine in the SCID mouse–human intestine xenograft model of disease. **Infection and Immunity**, 71, 5355, 2003.

WALSH, J.A. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. In: RAVDIN, J. I. ed. **Amebiasis: human infection by *Entamoeba histolytica***. New York: John Wiley & Sons, p. 93-105, 1988.

WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 8, p. 228-38, 1986.

WANG, C.; KANG, S.; LEE, J.; SUN, Z.; KIM, C. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. **Mucosal Immunology**, v. 2, p. 173-183, 2009.

WANG, W.; KELLER, K.; CHADEE, K. Modulation of tumor necrosis factor production by macrophages in *Entamoeba histolytica* infection. **Infection and Immunity**, v. 60, 3169-3174, 1992.

WHO/PAHO/UNESCO. Proceedings of the XIII Seminar on Amebiasis. Mexico City, Mexico, January 29-31, 1997. **Archives of Medical Research**, 28 Spec, n. 1-329, 1997a.

WHO/PAHO/UNESCO Report: a consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico, January 28-29. **Epidemiological Bulletin**, v. 18, p. 13-14, 1997b.

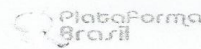
WHO. **World Health Statistics 2010**. Geneve: WHO Press, 2010.

10 Anexos

Anexos

Anexo 1 – Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MATO GROSSO - CAMPUS DO
ARAGUAIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: IMUNOMODULAÇÃO POR CITOCINAS DE CÉLULAS SANGÜÍNEAS NA PRESENÇA DE *E. histolytica*.

Pesquisador: Lucelia Campelo de Albuquerque Moraes

Área Temática:

Versão: 1

CNPq: 24220614/9.0000.5587

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Mato Grosso/ UFMT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 684.260

Data da Relatoria: 21/03/2014

Apresentação do Projeto:

A Amebíase é considerada a segunda maior causa de mortes no mundo, dentre as doenças parasitárias, ocasionando cerca de 40 a 100 mil óbitos por ano (WALSH, 1988). Essa doença foi descoberta e descrita por Lösch em 1875, relatada desde os tempos mais remotos de indivíduos que apresentaram diarreias com material esbranquiçado com sangue associado à icterícia e ulcerações intestinais (RAVDIN, 1995). A amebíase tem difusão mundial, é cosmopolita, ocorre principalmente em regiões de clima tropical e representa risco à saúde humana nos países em desenvolvimento, isso se justifica pela precariedade de condições sanitárias desses países. (VERONENSIS, 1997; SANTOS e SOARES, 2008; COURA, 2008). Dessa forma este projeto tem como objetivo estudar a imunomodulação das citocinas na presença de *E. histolytica* em fagócitos do sangue humano.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Endereço: Rod. MT100 Km 3,5-ICBS

Bairro: Campus do Araguaia

UF: MT

Telefone: (66)3402-1121

CEP: 78.698-000

Município: PONTAL DO ARAGUAIA

E-mail: marlyaugusta@yahoo.com.br

Página 01 de 03

Anexo 2 -Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO-UFMT
Campus Universitário do Araguaia – CUA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar, como voluntário, da pesquisa “**Atividade Imunomoduladora de IFN- γ e IL-17 sobre a função eritrofagocítica de *Entamoeba histolytica***”. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não terá nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que recebe assistência. Em caso de dúvida você pode procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller – UFMT – pelo telefone (65) 36157254. O objetivo deste estudo é **avaliar o comportamento do protozoário frente aos eritrócitos modulados por citocinas**. Os riscos relacionados com sua participação na pesquisa são mínimos, devido á pequena quantidade de material a ser colhido, com técnica adequada por profissionais devidamente habilitados e com materiais descartáveis.

Os dados pessoais referentes à pesquisa serão confidenciais e garantimos o sigilo de sua participação durante toda pesquisa. Inclusive na divulgação da mesma. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Você receberá uma cópia desse termo onde tem o nome, telefone e endereço do pesquisador responsável, para que você possa localizá-lo a qualquer tempo. Kelen Monik Gomes da Silva, Biomédica, nº cel. 92233350, e-mail: kelenmonikbiomed@gmail.com ou Prof. Eduardo Luzia França UFMT/Barra do Garças, email: dr.eduardo.franca@gmail.com.

Considerando os dados acima, **CONFIRMO** estar sendo informado por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa e em caso de divulgação por fotoe/ouvídeo **AUTORIZO** a publicação.

Eu (nome do participante)
idade:.....sexo:.....Naturalidade:.....portador (a) do documento
RG nº.....declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha
participação na pesquisa e concordo em participar.

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador principal