



MÔNICA CRISTINA DE MORAES SILVA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA AMEBÍASE NO ESTADO DO PARÁ
UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO**

Belém - Pará

2005

MÔNICA CRISTINA DE MORAES SILVA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA AMEBÍASE NO ESTADO DO PARÁ
UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Marinete M. Póvoa

Belém - Pará

2005

MÔNICA CRISTINA DE MORAES SILVA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DA AMEBÍASE NO ESTADO DO PARÁ
UTILIZANDO DIFERENTES METODOLOGIAS PARA DIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Marinete Marins Póvoa
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Banca Examinadora: Prof. Dr. Edilene Oliveira da Silva
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. João Farias Guerreiro
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Ewander de Jesus Oliveira
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Ricardo Luiz Dantas Machado
Centro de Investigações de Microorganismos,
FAMERP

Profa. Dra. Maristela Gomes Cunha
Departamento de Patologia, UFPA

Belém (PA), 06 de junho de 2005

“Muitas vezes, ao longo da vida, deparamos com tarefas penosas para serem realizadas e caminhos difíceis a serem palmilhados. Somos, por vezes, tentados a pensar que o sacrifício não compensa e uma forte tendência de abandonar tudo e tomar novo rumo tenta apoderar-se de nós. Entretanto, quando dominamos o desânimo e nos enchemos de coragem para chegar ao fim da responsabilidade, sempre descobrimos uma compensação e nos levantamos prontos para um novo embate. O desânimo tem sido a arma mais poderosa que o inimigo usa para nos desviar do plano e do caminho traçado por Deus para a nossa vida.”

Autor desconhecido

Dedico este trabalho a minha filha Camila, que durante o momento que mais precisou de mim, estive ausente em função desta pesquisa.

E aos meus pais (Antônio e Celina) e a minha irmã Célia que, na minha ausência, sempre foram pais e mães de minha filha.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Aparecida Gomes (Cidinha) do Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela importante contribuição neste trabalho e por todas as oportunidades oferecidas para o meu desenvolvimento profissional;

À minha orientadora Dra. Marinete Marins Póvoa por me ensinar a ser crítica e a fazer pesquisa;

Ao Dr. C. G. Clark (Department of Infectious and Tropical Diseases/London School of Hygiene and Tropical Medicine - Inglaterra) pela contribuição na discussão e genotipagem dos isolados;

Ao Dr. Egbert Tannich (Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine - Alemanha) pelas sugestões e análise dos resultados;

À amiga Dorotéa Lobato pelos ensinamentos em biologia molecular;

Aos amigos Dr. Edward, João, Michelle, Edna e Elisa pelo carinho e atenção durante meu treinamento no Laboratório de Amebíase da UFMG;

Aos técnicos do Laboratório de Enteroparasitoses do IEC pela ajuda na obtenção das amostras e na realização dos métodos parasitológicos;

Aos médicos do Hospital Universitário João de Barros Barreto pelo fornecimento das amostras de exsudatos;

Às amigas Ana de Nazaré e Carla Cristiane pelo grande apoio nos momentos difíceis;

Ao amigo Luiz Carlos de Souza Rodrigues que me introduziu na pesquisa em amebíase e me ajudou na implantação da técnica de cultura;

As bibliotecárias Maria José Mateus e Vânia Araújo do IEC que ajudaram no levantamento bibliográfico;

Ao Centro Universitário do Pará (CESUPA) que financiou os primeiros anos deste estudo;

A todos os pacientes que colaboraram com este trabalho;

Aos amigos da Seção de Parasitologia/IEC e a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

	Pág.
1	INTRODUÇÃO 1
1.1	HISTÓRICO 1
1.2	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA 3
1.3	BIOLOGIA 3
1.3.1	Morfologia 5
1.3.2	Ciclo Biológico 9
1.3.3	Transmissão 12
1.4	INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO 13
1.4.1	Resposta Imune Humoral 13
1.4.2	Resposta Imune Celular 16
1.4.3	Patogenia 18
1.5	PARÂMETROS DE VIRULÊNCIA 23
1.5.1	Capacidade de produzir lesão em animais de experimentação 23
1.5.2	Capacidade de destruir monocamadas de células de mamíferos em cultura 24
1.5.3	Eritrofagocitose 25
1.5.4	Atividades das enzimas proteinase e colagenase e moléculas antigênicas 26
1.6	PATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS 28
1.6.1	Amebíase Intestinal 29
1.6.2	Amebíase Extra-Intestinal 30
1.7	O GENOMA DE <i>E. HISTOLYTICA</i> / <i>E. DISPAR</i> 33
1.8	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO 37
1.8.1	Exame Parasitológico das Fezes 38
1.8.2	Isolamento em Meio de Cultura 39
1.8.3	Caracterização Bioquímica 41
1.8.4	Métodos Imunológicos 44
1.8.4.1	Detecção de Anticorpos 45
1.8.4.2	Detecção de Antígenos 46

1.8.5	Biologia Molecular	47
1.9	EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE	50
1.9.1	No Brasil	51
1.9.2	Na Região Amazônica	53
1.10	JUSTIFICATIVA	56
1.11	OBJETIVOS	58
1.11.1	Objetivos Gerais	58
1.11.2	Objetivos Específicos	58
2	MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	59
2.2	ASPECTOS ÉTICOS	59
2.3	COLETA E ANÁLISE PARASITOLÓGICA DAS FEZES	60
2.3.1	Método Direto	60
2.3.2	Sedimentação Espontânea	61
2.3.3	Faust e Colaboradores	61
2.4	COLETA E ANÁLISE PARASITOLÓGICA DOS EXSUDATOS	61
2.5	ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE <i>ENTAMOEBIA HISTOLYTICA</i>	62
2.5.1	Procedimentos no Método ELISA	62
2.6	PLANTIO E ISOLAMENTO DE AMOSTRAS COM <i>E.</i> <i>HISTOLYTICA</i> E/OU <i>E. DISPAR</i> EM MEIO XÊNICO	63
2.6.1	Procedimento para Isolamento a partir de Fezes Formadas ou Pastosas Contendo apenas Cistos	63
2.6.2	Procedimento para Isolamento a partir de Fezes Liquefeitas contendo apenas Cistos e/ou Trofozoítos e de Exsudatos de Abscesso Hepático Amebiano	64
2.6.3	Manutenção dos Isolados	64
2.7	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	65
2.7.1	Obtenção do Extrato Enzimático	65
2.7.2	Eletroforese	66
2.7.3	Revelação do Gel	67
2.8	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	68

2.8.1	Extração do DNA	68
2.8.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a Identificação de Espécies	68
2.8.3	Genotipagem dos Isolados	70
2.9	ANÁLISE DOS DADOS	74
3	RESULTADOS	76
3.1	AMOSTRA DE FEZES	76
3.2	DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E IMUNOLÓGICO	76
3.2.1	Nível de Concordância dos Testes Coproscópicos e de ELISA	76
3.2.2	Relação Quadro Clínico e Resultado do Teste Imunoenzimático	77
3.3	AMOSTRA DE EXSUDATOS	79
3.4	ISOLAMENTO	80
3.5	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	81
3.5	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	82
3.5.1	Identificação de Espécie	82
3.5.2	Genotipagem dos Isolados	86
4	DISCUSSÃO	93
5	CONCLUSÃO	110
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
	ANEXOS	145

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Trofozoíta de <i>E. histolytica/E.dispar</i> .	6
Figura 2 - Cisto de <i>E. histolytica/E.dispar</i> .	7
Figura 3 - Ciclo de vida da <i>E. histolytica</i> .	10
Figura 4 - Modelo da patogênese da colite amebiana.	20
Figura 5 - Zimograma representando os 20 perfis isoenzimáticos (zimodemas) caracterizados para as enzimas PGM, GPI, ME e HE.	43
Figura 6- Representação esquemática do <i>locus</i> 1-2 da linhagem HM1-IMSS mostrando as duas unidades de repetição e as regiões de hibridização dos iniciadores <i>Hsp1</i> e <i>Hsp2</i> .	71
Figura 7- Representação esquemática do <i>locus</i> 1-2 da linhagem SAW760 mostrando as sete unidades de repetição e as regiões de hibridização dos iniciadores <i>Dsp1</i> e <i>Dsp2</i> .	72
Figura 8 - Eletroforese horizontal em gel de amido para a isoenzima hexoquinase de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> .	81
Figura 9 - Eletroforese vertical do produto da PCR para identificação de <i>E. histolytica</i> .	85
Figura 10 - Eletroforese vertical do produto da PCR para identificação de <i>E. dispar</i> .	85
Figura 11 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o <i>locus</i> 1-2 de <i>E. histolytica</i> .	89
Figura 12 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o <i>locus</i> 1-2 de <i>E. dispar</i> .	90
Figura 13 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o <i>locus</i> 1-2 de <i>E. dispar</i> .	90

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de 310 pb do DNA epissomal de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> (Blessmann <i>et al.</i> , 2002).	69
Tabela 2 - Iniciadores para seqüências STR's no <i>locus</i> 1-2 de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> (Zaki <i>et AL.</i> , 2002).	70
Tabela 3 - Caracterização dos isolados fornecidos pelo Laboratório de Amebíase/ICB/UFMG utilizados na genotipagem do <i>locus</i> 1-2 de <i>E. histolytica</i> e <i>E. dispar</i> .	73
Tabela 4 - Resultados dos testes coproscópicos e ELISA (<i>E. histolytica</i> Test. TechLab, Inc. Blacksburg, VA) em 334 amostras testadas.	77
Tabela 5 - Relação entre os resultados do ELISA e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal invasiva entre 191 pacientes entrevistados.	78
Tabela 6 - Resultados dos métodos microscópicos, imunoenzimático, HE e PCR dos isolados e exsudatos analisados.	83
Tabela 7 - Caracterização dos isolados e resultados dos métodos imunoenzimático, HE, PCR para identificação de espécie e genotipagem do <i>locus</i> 1-2.	87

RESUMO

A epidemiologia da amebíase está sendo reavaliada desde que a *E. histolytica* (patogênica) foi considerada espécie distinta de *E. dispar* (não patogênica). Neste estudo, investigou-se a freqüência da amebíase em uma amostra de residentes do Pará por diferentes técnicas de diagnóstico e avaliou-se a patogenia do parasito. Os participantes (n = 845) forneceram material fecal e destes, 191 foram entrevistados quanto aos sintomas de diarréia, cólicas intestinais, constipação, náuseas e vômito. Foram também analisados 8 exsudatos de pacientes com suspeita de amebíase hepática. As amostras foram observadas sob microscopia de luz e a confirmação de *E. histolytica* feita a partir da pesquisa de antígenos. Um total de 98 amostras fecais e todos os exsudatos foram semeados em meio Pavlova para isolamento e posterior caracterização bioquímica e molecular (identificação de espécie e genotipagem). Isolados de outras regiões do Brasil foram também genotipados. A positividade obtida foi de 29,35% (248/845) e não houve correlação com a faixa etária. A microscopia revelou baixa sensibilidade (45,26%; 74/334), porém elevada especificidade (87,03%; 260/334) quando comparada ao ELISA. Houve relação significativa (*OR* 4,4026) entre a presença de sintomas e a positividade no ELISA, sendo a diarréia (58,82%) e a cólica intestinal (58,82%) os sintomas mais relatados. Nenhum exsudato foi positivo no exame a fresco, porém 7 foram positivos no ELISA. Obteve-se 22 isolados de material fecal e a caracterização da HE foi possível em 13, dos quais 7 *E. histolytica* e 6 *E. dispar*. O DNA de 22 isolados e dos exsudatos foram testados para identificação molecular de espécie e genotipagem. Do total, 16 cultivos (9 cepas mistas, 4 *E. dispar* e 3 *E. histolytica*) e 5 exsudatos (todos *E. histolytica*) amplificaram na PCR. A genotipagem identificou adicional positividade para *E. histolytica* em um exsudato e revelou diferentes polimorfismos de comprimento para o locus 1-2 de *E. histolytica* e *E. dispar* do Pará e de outras regiões do Brasil e um caso de co-infecção por diferentes genótipos de *E. dispar*. Nossos resultados revelam que a amebíase invasiva é um importante problema de saúde pública em nossa população e grande variedade de genótipos de *E. histolytica* contribuem para a doença no Brasil.

Palavras-chave: *E. histolytica*, *E. dispar*, imunodiagnóstico, genotipagem.

ABSTRACT

The amebiasis epidemiology had been evaluated since the *E. histolytica* (pathogenic) was differentiated from *E. dispar* (non-pathogenic). In this study, it had investigated the amebiasis frequency in residents from Pará using different diagnostic techniques and evaluated the parasite pathogenesis. All participants (n = 845) had given their fecal material and from them, 191 were asked about the symptoms of diarrhea, abdomen pain, constipation, nausea and vomit. We had also analyzed 8 liver exudates from patients suspected of hepatic amebiasis. All samples were examined by microscopy and the *E. histolytica* confirmation was done by antigen detection (*E. histolytica* Test. TechLab). Of the total, 98 fecal samples and all exudates were cultured in Pavlova medium for parasite isolation and biochemical characterization and molecular (species identification and genotyping of the *locus* 1-2). Strains from other Brazil regions were also genotyped. The positive rate for *E. histolytica* found was 29.35% (248/845) and there was no correlation with age. The sensitivity of the microscopy method was low (45.26% - 74/334) and the specificity high (87.03% - 260/334) when compared to the ELISA test. The correlation between presence of symptoms and ELISA positive results was significant (OR 4.4026) with the diarrhea and abdominal pain being the most reported. None of the exudate samples was positive under the microscopy, but 7 of them were ELISA positive. We had success in culturing only 22 fecal samples. The characterization of HE was possible only for 13 isolates, from which, 7 were *E. histolytica* and 6 *E. dispar*. The DNA of the 22 isolates and all exudates were tested by PCR for the species identification and genotyping. Of the total, 16 strains (9 mixed, 4 *E. dispar* and 3 *E. histolytica*) and 5 exudate had amplified at the PCR. The genotyping had identified additional positivity for *E. histolytica* in one exudate and showed different length polymorphisms for the *locus* 1-2 de *E. histolytica* and *E. dispar* of Pará and other Brazil regions and one case of co-infection by different genotypes of the *E. dispar*. Our results had showed that the invasive amebiasis is an important public health problem within the Amazonian population and that the high genotype variability of *E. histolytica* contribute for the maintenance of this disease in Brazil.

Kew words: *E. histolytica*, *E. dispar*, imunodiagnosis, genotyping.

1 INTRODUÇÃO

Amebíase é definida como a doença do homem causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica* com ou sem manifestações clínicas. Estima-se que 480 milhões de pessoas sejam portadoras do parasito, sendo que 10% delas desenvolvem a forma invasiva e destas aproximadamente 2% chegam a óbito. A amebíase é considerada a segunda causa de morbidade e mortalidade entre as doenças parasitárias, superada apenas pela malária (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

No homem, a *E. histolytica* é responsável pela doença conhecida como disenteria amebiana, caracterizada por ulcerações na parede intestinal, diarreia sanguinolenta com evacuações freqüentes, dor abdominal e tenesmo (LAVENTHAL & CHEADLE, 1997).

O parasito pode também penetrar na parede intestinal e atingir vasos sanguíneos, e assim disseminar-se para outros órgãos (fígado, pulmões, cérebro, pele) onde poderá causar ulcerações graves que podem levar o indivíduo à morte (LAVENTHAL & CHEADLE, 1997).

1.1 HISTÓRICO

Relatos em documentos datados a 3.000 anos antes de Cristo mostram casos de pacientes com sintomas clássicos de disenteria, provavelmente de origem amebiana. Somente no ano de 1875, o Dr. Fedor Lösch observou a presença de amebas nas fezes de um camponês do Distrito de Arcângela (Rússia) com diarreia, tenesmo e dor abdominal, e incriminou as amebas como o agente causador da doença. Alguns anos mais tarde (1886), o

médico grego Stephanos Kartulis descreveu a ocorrência de amebas em amostras fecais de 150 pacientes com disenteria, e no ano seguinte (1887), em 20 casos de abscesso hepático. Estudos posteriores confirmaram o papel patológico das amebas, surgindo então as denominações “disenteria amebiana” e, erroneamente, “abscesso hepático amebiano” para as diferentes formas clínicas da doença causada por este protozoário. Em 1903, Schaudinn denominou a espécie de *E. histolytica*, devido a grande capacidade do parasito em lisar tecidos (MARTÍNEZ-BÁEZ, 1989).

Várias teorias tentam explicar o comportamento patogênico de *E. histolytica*. A **teoria unicista** sugere a existência de uma única espécie, a *E. histolytica*, que produz cistos tetranucleados, não patogênica, porém podendo se tornar virulenta influenciada pela flora bacteriana intestinal ou outros fatores ambientais ainda desconhecidos. Esta hipótese foi proposta por Dobell em 1919, e apoiada por Mirelman *et al.* (1986) e Andrews *et al.* (1990). A **teoria dualista**, proposta por Brumpt (1925) definiu a existência de duas espécies, com características morfológicas idênticas: uma patogênica (*E. histolytica*) capaz de produzir doença, e uma não patogênica (*E. dispar* Brumpt, 1925) que viveria no intestino como comensal. Sargeant (1987; 1992) e Diamond (1992) em apoio à teoria dualista de Brumpt (1925), acreditam que a *E. histolytica* (considerada patogênica invasiva) possui diferentes graus de virulência, enquanto que a *E. dispar* (não invasiva) não seria necessariamente não patogênica, e estaria relacionada a forma clínica de colite não disentérica.

Durante décadas, estudos imunológicos, bioquímicos e genéticos foram conduzidos a fim de esclarecer estas hipóteses, e em 1993, Diamond &

Clark redescreveram o *status* taxonômico de *E. histolytica* (patogênica) considerando-a espécie diferente de *E. dispar* (não patogênica).

1.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

Segundo o Comitê de Sistemática da Sociedade Internacional de Protozoologia, as espécies do gênero *Entamoeba* pertencem ao Filo Sarcomastigophora, Sub-filo Sarcodina, Superclasse Rhizopoda, Classe Lobosea, Ordem Amoebida, Subordem Tubulina e Família Endamoebidae. Nesta família estão incluídas várias espécies de amebas que podem parasitar o homem tais como *E. histolytica* Schaudinn 1903, *E. coli* Grassi 1879, *E. hartmani* Von Pro vazek 1912, *E. gingivalis* Gros 1849 entre outras. Destas, a *E. histolytica* é a mais importante por causar doença no homem. A maioria vive no intestino grosso como comensal.

1.3 BIOLOGIA

Devido as suas características ultraestruturais, a *E. histolytica* é considerada um dos eucariontes mais primitivos (TOVAR *et al.*, 1999).

A presença de uma organela citoplasmática, o mitossomo, que armazena o *chaperon* CPN60 parece ser um remanescente mitocondrial que perdeu totalmente o seu genoma durante o processo evolutivo. Geralmente um único mitossomo é encontrado por célula e sua função ainda é desconhecida (TOVAR *et al.*, 1999).

No citoplasma dos trofozoítas são encontrados de 1-2 núcleos, vacúolos, vesículas membranosas, glicogênio e ribossomos. Não possui

complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso. Possuem um sistema vacuolar de membranas equivalente ao complexo de Golgi e ao retículo endoplasmático liso dos eucariontes superiores (MARTÍNEZ-PALOMO, 1989). O citoesqueleto é constituído por finos microfilamentos de actina, semelhantes a actina muscular, e miosina II (EDMAN *et al.*, 1987).

Os ribossomos possuem um coeficiente de sedimentação (S) de 75S, constituídos por uma subunidade maior (55S) e uma menor (35S). Nos trofozoítas, encontram-se agrupados no citoplasma como polissomos na forma de um arranjo helicoidal, que nos cistos formam agregados cristalinos denominados corpos cromatóides (MARTINEZ-PALOMO, 1989).

O núcleo é vesiculoso, possuindo cromatina periférica rica em RNA, disposta de modo regular na membrana. Possui um cariossoma esférico e central, considerado um sítio de condensação do DNA (MARTÍNEZ-PALOMO, 1989).

A membrana plasmática dos trofozoítas mede aproximadamente 10 nm de espessura e é constituída por uma bicamada lipídica envolvida por um glicocálix de 20-30 nm de espessura que contém mucopolissacarídeos, lipofosfoglicanos e um polissacarídeo contendo várias unidades repetidas de N-acetilglicosamina (MARTÍNEZ-PALOMO, 1989).

Os trofozoítas alimentam-se por meio da fagocitose de bactérias ou restos de matéria orgânica em decomposição ou por pinocitose de nutrientes líquidos. Movimentam-se a partir da emissão de pseudópodes do tipo lobopódios (FERIA-VELASCO *et al.*, 1976). Vivem sob baixas tensões de oxigênio, portanto aeróbios facultativos e podem crescer em ambientes com

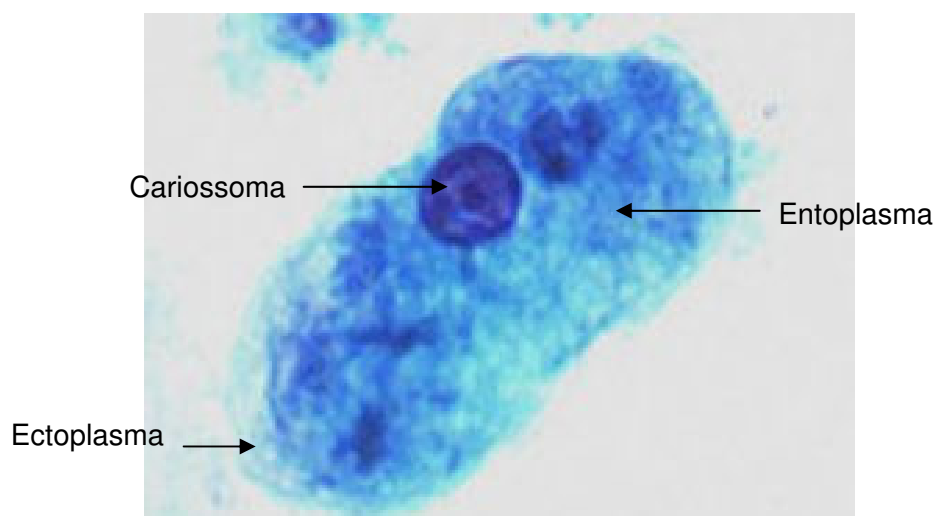
até 5% de oxigênio, realizam o metabolismo anaeróbico do piruvato (TOVAR *et al.*, 1999) e a principal fonte de energia são os carboidratos (MARTÍNEZ-PALOMO, 1989). O metabolismo parece ter sido alterado devido à perda gênica secundária ou a transferência gênica lateral com algumas bactérias, o que levou a adaptações metabólicas como a redução ou eliminação da maioria das vias bioquímicas mitocondriais (ciclo do ácido cítrico e cadeia transportadora de elétrons ausentes) e a utilização de enzimas de fermentação semelhantes às bacterianas (LOFTUS *et al.*, 2005).

1.3.1 Morfologia

Durante o ciclo biológico do parasito são observados diferentes estágios evolutivos como descritos a seguir, sendo o trofozoíta a forma mais bem estudada em nível ultraestrutural.

O trofozoíta ou forma vegetativa, mede de 10 a 60 μm , contendo um ou 2 núcleos, arredondados com tamanhos de 5 a 7 μm de diâmetro. O núcleo interfásico possui material periférico rico em RNA, formando um fino anel ao redor da membrana nuclear interna (OROZCO *et al.*, 1988). São bastante pleomórficos e emitem pseudópodes grossos ou lobopódios, responsáveis pela movimentação e alimentação do parasito. Podem emitir filopódios (extensões filamentosas) quando em contato com células epiteliais. No citoplasma podem ser observadas duas regiões distintas: o ectoplasma claro e hialino e o endoplasma granuloso, contendo vacúolos e restos alimentares. Os pseudópodes são projetados a partir da região do ectoplasma (FERIA-VELASCO *et al.*, 1976) (Figura 1). Vivem aderidos ao muco intestinal e

ao epitélio colônico do ceco ou intestino grosso através de uma lectina de membrana ligadora galactose (GAL) e N-acetil-galactosamina (NAcGAL) (HUSTON *et al.*, 1999).



Fonte: www.msu.edu/course/zol/316/ehiscyst.jpg.

Figura 1 - Trofozoíta de *E. histolytica/E. dispar* apresentando um único núcleo com cariossoma puntiforme e central, ectoplasma claro e endoplasma granuloso.

A forma cística ou de resistência, observadas em fezes sólidas ou pastosas do hospedeiro, apresenta-se esférico ou oval, medindo cerca de 10 a 15 μ m de diâmetro (TANYUKSEL & PETRI, 2003). Possui de 1 a 4 núcleos semelhantes ao dos trofozoítas. No citoplasma, são encontrados corpos cromatóides (arrajos helicoidais de ribossomos) em forma de bastão com cerca de 300 nm de comprimento por 40 nm de diâmetro (MARTINEZ-PALOMO,

1989), além da presença de glicogênio (WHO, 1997) (Figura 2). É uma forma evolutiva com metabolismo reduzido, sendo bastante resistente a acidificação, a cloração e a dissecação, bem como outros estresses ambientais (HUSTON *et al.*, 1999; BOETTNER *et al.*, 2002).



Fonte: www.msu.edu/course/zol/316/ehiscyst.jpg.

Figura 2 - Cisto de *E. histolytica*/*E. dispar* apresentando um único núcleo e corpos cromatóides em forma de bastão (seta).

Além do cisto e do trofozoíta descritos acima, duas outras formas são também observadas durante o ciclo: o trofozoíta-metacístico, uma forma multinucleada que emerge do cisto no intestino delgado e posteriormente, dão origem aos trofozoítas. O pré-cisto, fase intermediária entre o trofozoíta e o cisto, uninucleado, de aspecto oval ou ligeiramente arredondado, contendo no citoplasma agregados ribossômicos formando os corpos cromatóides com

aspecto de bastão além da presença de vacúolos alimentares (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

Diferenças ultraestruturais podem ser evidenciadas entre *E. histolytica* e *E. dispar*, e mesmo entre isolados patogênicos e não patogênicos de *E. histolytica*.

Os trofozoítas de *E. histolytica* possuem numerosos e grandes vacúolos, de tamanhos variáveis e contendo várias bactérias, enquanto que os de *E. dispar* apresentam vacúolos pouco numerosos e pequenos, geralmente agregados em algumas regiões do citoplasma, possuem tamanhos similares e contêm em seu interior apenas uma única bactéria (MUNGUIA *et al.*, 1997; PIMENTA & DIAMOND, 1997). Acredita-se que as características dos vacúolos de *E. histolytica* estejam relacionadas à capacidade do parasito em se desenvolver em cultivo axênico do que a *E. dispar* (MUNGUIA *et al.*, 1997; CLARK, 1998; RODRIGUES, 2000).

Agregados de ribossomos são observados em ambas espécies, porém mais largos e mais dispersos no citoplasma de *E. dispar*, exceto na região dos vacúolos (MUNGUIA *et al.*, 1997).

Rodrigues (2000), por meio de análise ultraestrutural de um isolado de *E. dispar* e isolados patogênicos e não patogênicos de *E. histolytica* observou diferença na organização da cromatina periférica que se apresenta distribuída de modo irregular nas cepas patogênicas.

Pimenta & Diamond (1997) observaram que o glicocalix de *E. histolytica* é mais espesso que o de *E. dispar*, além de evidente

heterogeneidade na densidade e na organização das proteínas integrais de membrana.

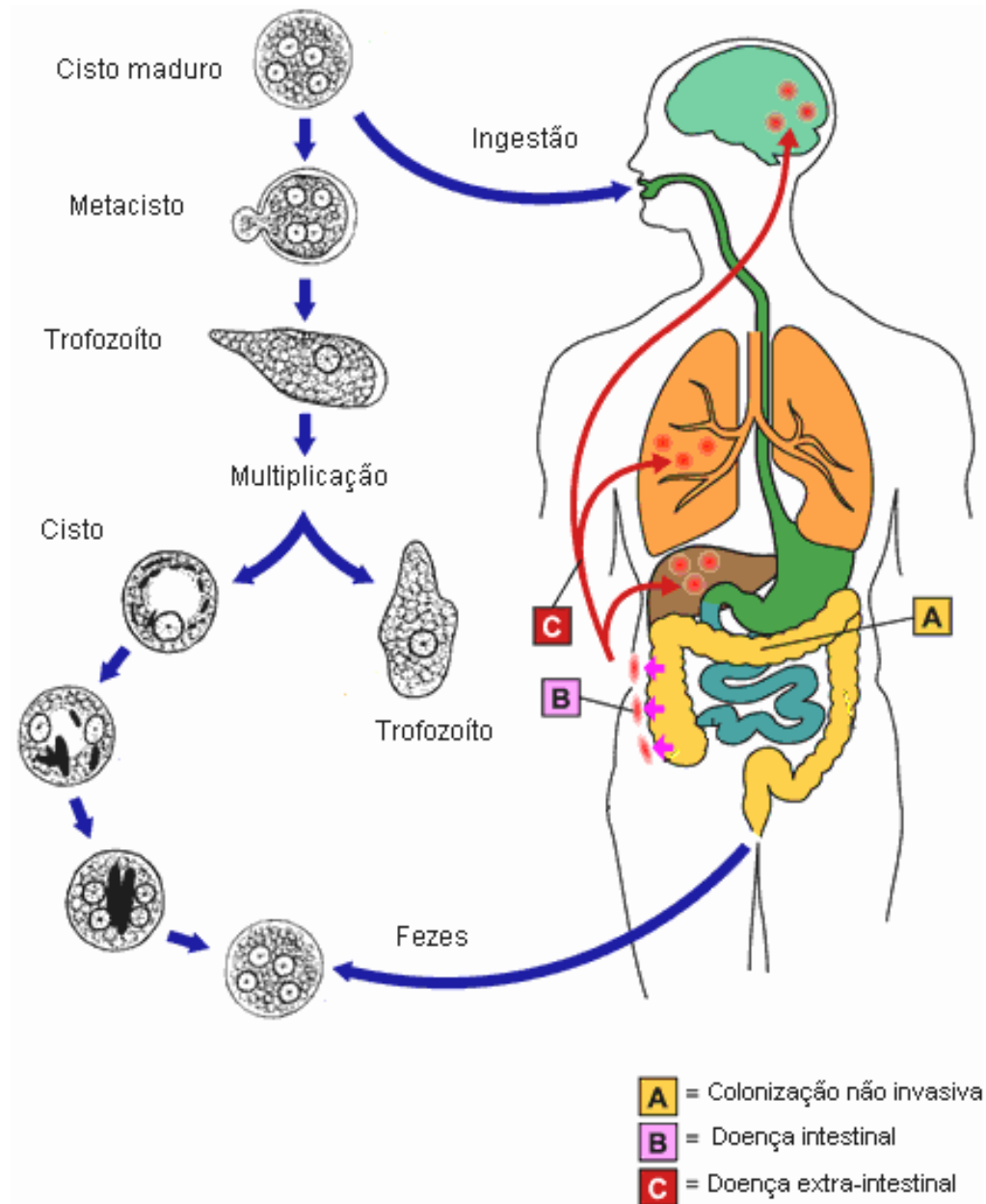
1.3.2 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *E. histolytica* é monoxênico, ou seja, se processa em um único hospedeiro.

A forma infectante, o cisto tetranucleado, chega ao homem principalmente através de água e alimentos contaminados. Após ingestão, atravessa a barreira gástrica, chegando ao final do intestino delgado e início do grosso, onde liberam um trofozoíta-metacístico tetranucleado através de uma fenda na parede cística (Figura 3). Os fatores que induzem o desencistamento ainda não foram totalmente esclarecidos, provavelmente sais inorgânicos, baixa tensão de oxigênio e apropriadas condições osmóticas do ambiente intestinal influenciariam neste processo (RAVDIN, 1988).

Após sucessivas divisões nucleares e citoplasmáticas cada trofozoíta-metacístico, origina oito trofozoítas, que migram até o final do intestino grosso onde se multiplicam por divisão binária colonizando-o aderidos à mucosa (RAVDIN, 1988) (Figura 3).

O processo de divisão celular dos trofozoítas mostra um típico ciclo celular abrangendo os períodos G₀/G₁, S, G₂ e fase M (mitose) (OROZCO *et al.*, 1988; VOHRA *et al.*, 1998). Durante a mitose são observados quatro estágios: prófase, anáfase inicial, anáfase tardia e telófase com ausência da fase de metáfase. O cariossoma e a membrana nuclear permanecem ao longo de todo o processo de divisão, porém com mudanças



Fonte: www.germology.com/Amebiasis_LifeCycle.gif, modificado).

Figura 3 - Ciclo de vida da *E. histolytica*.

morfológicas no núcleo e no material periférico (OROZCO *et al.*, 1988).

Observações em cultura demonstraram que os trofozoítas replicam várias vezes seu DNA antes da divisão celular, o que resulta em células poliplóides com 1 - 10 vezes ou mais do conteúdo do genoma. Esta evidência é sugestiva da perda dos pontos de checagem da fase S da interfase (DAS & LOHIA, 2002).

Os trofozoítas podem se converter a pré-cistos (uninucleados) que secretam uma parede cística rica em quitina e formam os corpos cromatóides. Ainda não se sabe os fatores que levam o parasito a se encistar, porém acredita-se que determinadas condições adversas do ambiente estariam contribuindo com este processo. Os pré-cistos, após duas divisões nucleares, originam os cistos (tetranucleados) que chegam então ao ambiente através das fezes (TANYUKSEL & PETRI, 2003) (Figura 3).

Alguns trofozoítas, por causas ainda desconhecidas, podem invadir a mucosa intestinal e destruir praticamente qualquer tipo de tecido do organismo humano, desde o epitélio de revestimento até órgãos sólidos e ossos (MARTÍNEZ-PALOMO, 1989). Alterações em nível de epitélio colônico causam a forma clínica denominada colite amebiana (HUSTON *et al.*, 1999), sendo mediadas por várias proteínas liberadas pelo parasito, principalmente as cisteína-proteinases (MONCADA *et al.*, 2003). A disseminação por via hematogênica ou intraperitonal para outros órgãos (fígado, pulmões, encéfalo, pele,...) estabelece infecção persistente extra-intestinal (HUSTON *et al.*, 1999).

1.3.3 Transmissão

Constitui-se de uma transmissão fecal-oral, feita principalmente pela ingestão de cistos tetranucleados presentes em água e alimentos. Vetores mecânicos podem transportar cistos viáveis ou contaminar alimentos com seus perdigotos ou fezes (RODRIGUEZ, 1985).

Pode haver transmissão direta pelo contato pessoa-pessoa, como observado na transmissão intrafamiliar (SPENCER *et al.*, 1977; BRAGA *et al.*, 2001a; ZAKI *et al.*, 2003) e em instituições para pacientes mentais (SARGEAUNT *et al.*, 1982; HAGHIGHI *et al.*, 2002). Em grupos familiares, o parasito é considerado altamente infectivo, pois há relatos de que um único membro infectado dentro de uma família é considerado importante fator de risco na transmissão (BRAGA *et al.*, 2001a).

Experimentos laboratoriais demonstraram que cerca de 2.000 a 4.000 cistos são necessários para que haja infecção, com um período pré-patente de cinco dias e um período de incubação, em média, de seis semanas (KNIGHT, 1975).

Os cistos permanecem viáveis em ambiente úmido e temperado em média por 12 dias. Podem durar de 9 a 30 dias em material fecal a uma temperatura de 25°C, e em alimentos até 15 dias (RODRIGUEZ, 1985). Os trofozoítas não são importantes na transmissão por não resistirem ao pH ácido do estômago (REED & RAVDIN, 1995) e resistirem apenas alguns minutos fora do organismo (TANYUKSEL & PETRI, 2003).

1.4 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

1.4.1 Resposta Imune Humoral

A presença de *E. histolytica* no organismo humano induz resposta imunológica sistêmica envolvendo diferentes classes de anticorpos e células.

A aderência da *E. histolytica* a célula hospedeira é mediada por uma lectina de membrana conhecida como N-Acetil galactosamina ligadora de galactose (Gal/GalNAc) (MCCOY *et al.*, 1994; VINES *et al.*, 1998), considerada a principal molécula antigênica do parasito.

A lectina é uma glicoproteína heterodimérica, com peso molecular de 260 kDa, constituída por uma cadeia pesada de 170 kDa e uma cadeia leve de 35 kDa. A cadeia pesada, mediadora da ligação parasito-epitélio colônico, apresenta um epítipo com estrutura semelhante a uma integrina $\beta 2$ encontrada em leucócitos humanos. Acredita-se que este epítipo seja responsável pela habilidade do trofozoíta em se ligar à mucosa intestinal, penetrar nos vasos sanguíneos e interagir com a matriz extracelular dos hepatócitos (ADAMS *et al.*, 1993). A porção extracelular da lectina possui dois domínios: um rico em cisteína e outro pobre em cisteína, ambos com capacidade antigênica (TANNICH *et al.*, 1991).

As regiões amino-terminais das cadeias leve e pesada possuem seqüências específicas de aminoácidos que não produzem reação cruzada com anticorpos policlonais presentes no soro (PETRI *et al.*, 1989). Experimentos laboratoriais demonstraram que roedores (*Meriones unguiculatus*) imunizados com diferentes epítipos de uma lectina recombinante (LCR3) para a cadeia de 170 kDa, produzem anticorpos IgG para uma região

de 25 aminoácidos. Neste experimento foi também observado que anticorpos produzidos para a porção amino-terminal da região pobre em cisteína não se mostraram eficazes na proteção contra a doença (LOTTER *et al.*, 1997).

A produção de anticorpos anti-lectina ocorre durante a invasão tissular do parasito e desaparece dentro de uma semana após tratamento (ABD-ALLA *et al.*, 1993; ABOU-EL-MAGED *et al.*, 1996). Persistência de anticorpos foi encontrada em pacientes assintomáticos residentes em áreas endêmicas, estando relacionada a episódios anteriores de colite amebiana ou abscesso hepático (RAVDIN *et al.*, 1990).

Na amebíase os níveis das imunoglobulinas G (IgG), M (IgM) e A (IgA) variam de acordo com a forma clínica dos pacientes. Coproanticorpos das classes IgG, IgM e IgA são encontrados em pacientes com colite amebiana, com declínio após 3 semanas da infecção, quando então aparecem os anticorpos séricos (KRETSCHMER, 1989).

Níveis elevados de IgM e IgA anti-lectina séricas são observados em pacientes com amebíase intestinal, todavia encontram-se diminuídos em pacientes com amebíase hepática, onde há predomínio da classe IgG (KAUR *et al.*, 2004).

Na forma hepática, o isotipo IgG1 apresenta-se significativamente elevado em relação à forma intestinal onde predominam os isotipos IgG4. A presença destes isotipos é sugestiva de resposta celular T-helper tipo 2. No decorrer da infecção hepática, o isotipo IgG1 é substituído pelos isotipos IgG2 e IgG3, demonstrando um *switch* de classe como um mecanismo de modulação da resposta imune (KAUR *et al.*, 2004).

Anticorpos IgA anti-lectina parecem proteger contra a amebíase intestinal de modo mais eficaz que a IgG. Haque *et al.* (1999) estudando a resposta imune de crianças à amebíase intestinal observaram que a produção destes anticorpos produz resposta protetora em 70% dos casos quando comparadas a IgG. Lotter *et al.* (1997) demonstraram que a IgA presente no soro de animais imunizados são capazes de inibir a aderência de trofozoítas de *E. histolytica* a células de ovário de hamster chineses (CHO - *chinese hamster ovary*). O processo de aderência é considerado um evento importante na patogênese da amebíase.

Níveis elevados de anticorpos IgA secretora foram encontrados na saliva de pacientes com amebíase intestinal invasiva e abscesso amebiano hepático (KELSALL *et al.*, 1994; RAMOS *et al.*, 1997; ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1998; HAQUE *et al.*, 1999). Ramos *et al.* (1997) observaram que a resposta secretora na saliva mediada pela IgA se estende por 12 meses nos pacientes assintomáticos com infecção persistente, protegendo-os contra a invasão do tecido pelo parasito. Posteriormente, Mata & Ávila (1997) purificaram anticorpos IgA do colostro humano e mostraram a eficácia inibidora destes anticorpos sobre a atividade proteolítica da *E. histolytica* “*in vitro*”.

Anticorpos IgM anti-lectina foram detectados em 55% dos pacientes com colite amebiana e em 77% com abscesso hepático em estudo conduzido por Abd-Alla *et al.* (1998).

Imunocomplexos (antígenos amebianos associados a fatores do complemento) têm sido detectados no soro de pacientes com amebíase invasiva (VINAYAK *et al.*, 1990).

Ravdin *et al.* (1990) sugeriram que o desenvolvimento de resposta imune ou mesmo competição pela flora intestinal são os responsáveis pela eliminação da infecção intestinal por formas não patogênicas, como observado na maioria dos pacientes assintomáticos que albergam isolados não patogênicos e que após algum tempo não mais eliminam cistos nas fezes.

1.4.2 Resposta Imune Celular

Extratos celulares obtidos a partir de culturas axênicas de *E. histolytica* (HM1-IMSS) são capazes de estimular a proliferação de linfócitos T sendo a lectina Gal/GalNAc responsável por esta ativação (DIAMANTSTEIN *et al.*, 1981; SALATA & RAVDIN, 1985).

Neutrófilos e outras células inflamatórias podem ser vistas na lâmina própria e camadas da submucosa, sendo os neutrófilos as células mais abundantes nos estágios iniciais da infecção (PRATHAP & GILMAN, 1970).

A ativação de macrófagos e de neutrófilos é feita a partir de alguns mediadores como IL-1, IL-8, cicloxigenase-2 (COX-2) e indução da síntese de óxido nítrico (NO₃) (STANLEY, 2001). Trofozoitos de *E. histolytica* lisam neutrófilos e monócitos, porém os macrófagos, quando devidamente ativados, são capazes de destruir as amebas. Alguns macrófagos morrem durante o processo por ação das enzimas liberadas devido à destruição do parasito (RAVDIN, 1988; KRETSCHMER, 1989).

A estimulação das células intestinais, próximas ao sítio de infecção/invasão e até mesmo à distância, é considerada o mecanismo pelo qual o trofozoíta induz resposta inflamatória aguda no intestino (STANLEY,

2001; QUE *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado que células de epitélio intestinal produzem citocinas inflamatórias na presença do parasito (ECKMANN *et al.*, 1995; YU & CHADEE, 1997), cujos genes seriam ativados pelo fator NF- κ B (STANLEY, 2001).

A liberação de IL-18 pelas células intestinais induz resposta celular tipo Th1, com conseqüente ativação de macrófagos, e parece ser requerida para a imunidade efetiva contra a amebíase. Que *et al.* (2003) demonstraram que uma cisteína proteinase de superfície da *E. histolytica* é capaz de degradar a IL-18 como um mecanismo de bloquear a resposta imune do hospedeiro.

De La Garza *et al.* (1997) identificaram altos níveis de IL-6 em pacientes com amebíase hepática aguda, considerando-a responsável pelas manifestações tóxicas e febris observadas nesta forma clínica. Entretanto, não observaram níveis séricos de IL-1 α e TNF α , consideradas citocinas de fase aguda.

Estudos "*in vitro*" mostram que trofozoítas de *E. histolytica* são susceptíveis a lise mediada pelo complemento por meio da ativação das vias clássica e alternativa. Todavia, a amebíase invasiva parece resultar de subpopulações de trofozoítas resistentes ao complemento (RAVDIN, 1988).

A resposta imune celular certamente desempenha uma função importante na prevenção ou limitação da amebíase invasiva, porém não é relevante nas etapas iniciais da invasão do epitélio colônico (RAVDIN, 1988).

Apesar da intensa necrose tecidual durante a invasão do fígado, a *E. histolytica* causa pouca resposta inflamatória o que é atribuído a apoptose

e/ou necrose das células da resposta imune induzida pelo parasito. A apoptose de neutrófilos é um mecanismo importante de diminuição da resposta inflamatória mediada por estas células e danos no parasito (SEOBO *et al.*, 2004).

Estudos “*in vitro*” demonstraram que o parasito é capaz de degradar a cadeia pesada da IgG humana (ARAIZA-OROZCO *et al.*, 1999), clivar o fator de complemento C3 em C3a e C3b e degradar IgA, C3a e C5a (QUE & REED, 1997).

1.4.3 Patogenia

A base molecular dos eventos que levam a *E. histolytica* a invadir o tecido do hospedeiro e causar doença ainda é motivo de pesquisa. Sabe-se que a invasão tecidual requer um complexo controle da expressão de várias proteínas do parasito como resposta a um processo adaptativo as condições adversas do ambiente hospedeiro (BRUCHHAUS *et al.*, 2002). Bruchhaus *et al.* (2002) identificaram a expressão diferencial de 12 genes durante a formação do abscesso hepático *in vitro*, a maioria associada a condições de estresse, regulação transcricional e tráfego de vesículas.

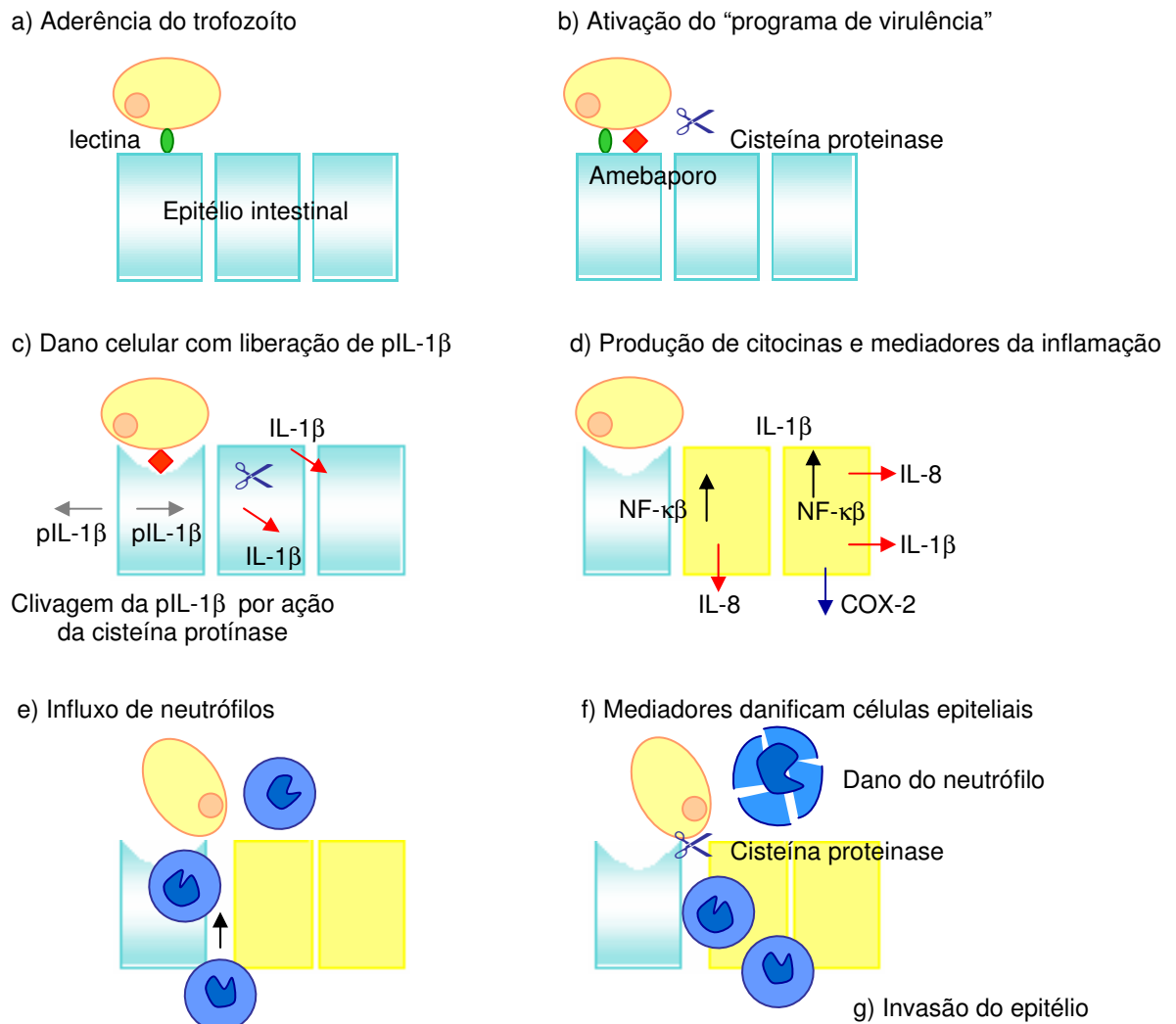
A atividade citolítica da *E. histolytica* tem sido estudada sob condições “*in vitro*” e envolve quatro etapas: adesão, citólise, fagocitose e degradação intracelular.

O contato inicial entre *E. histolytica*-célula hospedeira é mediado via lectina que se liga a resíduos de carboidratos Gal/GalNAc presentes na membrana plasmática da célula hospedeira (MCCOY *et al.*, 1994; VINES *et al.*,

1998; DODSON *et al.*, 1999) (Figura 4). As mucinas colônicas são as principais moléculas alvo por possuírem uma superfície celular rica em resíduos de Gal e GalNAc, consideradas receptoras da lectina do parasito (CHADEE *et al.*, 1987). O citoesqueleto de actina parece auxiliar no mecanismo de adesão bem como no processo citolítico da *E. histolytica* (GODBOLD & MANN, 1998; TAVARES *et al.*, 2005).

Após adesão, a ameba lisa a célula alvo usando proteínas formadoras de poros, conhecidas como amebaporos e, possivelmente fosfolipases (Figura 4). Os amebaporos se inserem na camada de fosfolipídeos da célula hospedeira e são responsáveis por parte do efeito citolítico da *E. histolytica* por promover mudanças no balanço osmótico das células e cuja atividade depende do pH do meio. A célula epitelial perde sua capacidade de adesão às células adjacentes, há alterações nas microvilosidades e desintegração da superfície (LONG-KRUG *et al.*, 1985; LEIPPE, 1997; LEIPPE *et al.*, 2005). Os amebaporos parecem formar poros na membrana celular de modo semelhante ao complemento.

Existem três isoformas de amebaporos (A, B e C), sendo que a C possui efeito citotóxico mais potente. Estas proteínas são estocadas sob a



Fonte: Stanley, 2001.

Figura 4. Modelo da patogênese da colite amebiana. Os trofozoítos ligam-se ao epitélio intestinal via lectina, o que promove mudanças em sinais celulares ativando o programa de virulência, com secreção de cisteína proteinases e liberação de amebaporos no sítio de contato. Há dano ou morte da célula epitelial, com liberação de mediadores incluindo precursores de IL-1 β pIL-1 β , que serão clivados pelas cisteína proteinases para a forma ativa (IL-1 β). A IL-1 β liberada da célula, junto com a IL-1 β liberada da célula, ligam-se as células epiteliais adjacentes e ativam o fator NF- κ B, resultando na síntese de IL-1 β , IL-8 e outros mediadores incluindo COX-2 e indução da síntese de NO $_3$. Os mediadores atraem células de resposta inflamatória, especialmente neutrófilos, para as regiões da mucosa e submucosa. Os neutrófilos que entram em contato com a ameba são lisados e liberam mediadores que podem danificar ou matar células intestinais. Os trofozoítos invadem as camadas da submucosa usando cisteína proteinases que clivam a matriz extracelular migrando pelas células danificadas.

forma de grã nulos citoplasmáticos, semelhantes a lisossomos, que também contém lisozimas, fosfolipases, cisteínas proteinases entre outras (PETRI, 2002). As vesículas somente são liberadas após contato ou lise da ameba (LEIPPE, 1997) e parecem acidificar o meio entre o parasito e a célula-alvo favorecendo a formação dos poros (LEIPPE *et al.*, 2005). As isoformas A, B e C têm a mesma estrutura básica, porém a A é considerada o maior amebaporo do parasito. O mecanismo de formação de poros, durante a invasão do tecido, é comum entre as isoformas (LEIPPE *et al.*, 2005).

Enzimas proteolíticas atuam juntamente com os amebaporos na atividade citolítica do parasito, e provavelmente são usadas na penetração do tecido, na degradação de substratos exógenos e em processos inflamatórios. Enzimas cisteína proteinases parecem ser responsáveis pelo processo de invasão (KEENE *et al.*, 1986) sendo capazes de degradar mucinas colônicas humanas “*in vitro*” (MONCADA *et al.*, 2003). Estas enzimas limitam a resposta imune do hospedeiro, provavelmente devido a sua capacidade em degradar IgG, clivar o fator de complemento C3 em C3a e C3b e degradar IgA, C3a e C5a (QUE & REED, 1997). Estudos “*in vitro*” mostram a participação das cisteína proteinases na formação de abscessos hepáticos em hamster (ANKRI *et al.*, 1999).

As cisteína proteinases recebem esta denominação por serem ricas em resíduos de cisteína. São codificadas por uma família multigênica (genes *acp* ou *ehcp*) constituída por seis genes (*ehcp1- ehcp6*) três dos quais (*ehcp1, ehcp2 e ehcp5*) são responsáveis pela expressão de 90% das cisteína proteinases existentes na ameba (REED *et al.*, 1993; BRUCHHAUS &

TANNICH, 1996). Seqüências homólogas dos genes *ehcp1*, *ehcp2* e *ehcp3* têm sido encontradas no genoma de *E. dispar* (REED *et al.*, 1993; BRUCHHAUS & TANNICH, 1996), porém com expressão menor que em *E. histolytica* (TANNICH *et al.*, 1991). Tais proteínas têm a capacidade de degradar diferentes substratos da célula hospedeira, principalmente os que formam a matriz extracelular (como colágeno e fibronectina) levando a invasão do tecido (OCÁDIZ *et al.*, 2005).

Enzimas fosfolipases A estão também envolvidas nos fenômenos citolíticos da amebíase invasiva, cuja função é promover a degradação de fosfolipídios de membrana (PETRI, 2002).

Observações “*in vitro*” demonstram que a ameba lisa neutrófilos após contato, os quais liberam constituintes tóxicos que ajudam na destruição do tecido hospedeiro, o que é considerado um evento importante na patogênese da amebíase invasiva (RAVDIN, 1988) (Figura 4).

Após a morte da célula hospedeira, o parasito segue com a fagocitose, auxiliado pela lectina e outros receptores de membrana que estariam atuando na aderência as células (VOIGT & GUILLEN, 1999; HUSTON *et al.*, 2003). A ingestão de células mortas parece limitar a resposta inflamatória do hospedeiro fazendo com que o parasito estabeleça infecção persistente. Algumas células morrem devido a apoptose (morte celular programada), e são mais eficientemente fagocitadas pela *E. histolytica* que as células mortas devido à atividade citolítica do parasito (HUSTON *et al.*, 2003). A motilidade do parasito, mediada por microfilamentos de actina e miosina, tem sido

considerada essencial no estabelecimento da infecção focal (TAVARES *et al.*, 2005).

1.5 PARÂMETROS DE VIRULÊNCIA

Isolados de *E. histolytica* possuem grande variabilidade quanto a sua capacidade em produzir doença. Diversos experimentos laboratoriais têm sido utilizados na determinação da patogenicidade e da virulência destes isolados, e os resultados comparados a cepas de referência isoladas de pacientes com amebíase aguda, sendo as mais utilizadas a HM1-IMSS, a HK-9 e a 200:NIH.

1.5.1 Capacidade de produzir lesão em animais de experimentação

A virulência e a patogenicidade de cepas de *E. histolytica* pode ser determinada fazendo-se inoculação de trofozoítas em animais de experimentação. A virulência, definida como o número mínimo de trofozoítas necessários para produzir abscesso em fígado de hamster, pode ser medida pelo tamanho e tipo de abscesso (OROZCO *et al.*, 1983). Enquanto que a patogenicidade pode ser determinada pela capacidade do parasito em produzir o abscesso (DIAMOND *et al.*, 1974). Cepas patogênicas mostram diferentes graus de virulência. Embora isolados axênicos de *E. dispar* sejam capazes de induzir resposta inflamatória local quando inoculados em fígado de hamster, são considerados não patogênicos por não produzirem lesões necróticas (ESPINOSA-CASTELLANO *et al.*, 1997).

Para o estudo da amebíase hepática o hamster e o gerbil são os animais mais utilizados. Ratos e cobaias são naturalmente resistentes à produção de abscessos hepáticos, por isso são pouco utilizados como modelos experimentais. Nenhum modelo de amebíase intestinal está perfeitamente padronizado, onde sejam produzidas lesões ou úlceras semelhantes as produzidas no homem. Neste caso os resultados demonstram grande heterogeneidade e pouca confiabilidade (TSUTSUMI, 1994).

1.5.2 Capacidade de destruir monocamadas de células de mamíferos em cultura

Orozco *et al.* (1978) observaram que trofozoítas de *E. histolytica* possuem graus variáveis de efeito citopático sobre monocamadas de células de rim de cães (MDCK - Madin Darby canine kidney) podendo ser medidos quantitativamente. Demonstraram também que o grau do efeito citopático produzido “*in vitro*” está relacionado com a virulência mostrada “*in vivo*” pelas memas linhagens. Isolados axênicos de *E. dispar* (linhagem SAW 76) produzem menor efeito citopático sobre células MDCK quando comparados a isolados de *E. histolytica* (MUNGUIA *et al.*, 1997; ESPINOSA-CASTELLANO *et al.*, 1998).

Bracha & Mirelman (1984) demonstraram a capacidade dos trofozoítas da linhagem HM1-IMSS (*E. histolytica*) axênica em destruir monocamadas de células de rim de hamster jovens (BHK - baby hamster kidney). Observaram um aumento na virulência, determinada pela taxa de destruição da monocamada, após associação de linhagens de *E. histolytica*

(HM1-IMSS, HK-9 e 200:NIH) axênicas com bactérias (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* entre outras). A HM1-IMSS foi considerada a mais virulenta, em relação as demais. As bactérias sozinhas não tiveram efeito sobre células BHK.

1.5.3 Eritrofagocitose

Este parâmetro avalia a capacidade de fagocitose dos trofozoítas a partir do número de amebas fagocíticas e número médio de eritrócitos fagocitados por ameba.

Trissl *et al.* (1978a) ao compararem a taxa de eritrofagocitose entre dois isolados monoxênicos (um patogênico e um não patogênico) observaram que o isolado patogênico fagocitou maior número de eritrócitos que o isolado não patogênico. Estes pesquisadores sugeriram que o processo de fagocitose pode ser utilizado como marcador de linhagens invasivas de *E. histolytica*. Estes dados foram corroborados pelo mesmo grupo de pesquisadores ao analisarem um número maior de isolados (TRISSL *et al.*, 1978b).

Posteriormente, Orozco *et al.* (1983) demonstraram que trofozoítas mutantes da linhagem HM1-IMSS (clone L-6) com baixa taxa de eritrofagocitose foram incapazes de produzir necrose em fígado de hamster jovem. Entretanto, quando a virulência do parasito era revertida por meio de sucessivas passagens através do fígado do hamster, os trofozoítas readquiriam a capacidade de produzir abscesso hepático e taxa elevada de

eritofagocitose. Baseados em seus resultados, estes pesquisadores concluíram que a fagocitose é um dos mecanismos de agressão da *E. histolytica*.

1.5.4 Atividades das enzimas proteinase e colagenase e moléculas antigênicas

Keene *et al.* (1990) mostraram que clones L-6 da linhagem HM1-IMSS com deficiente expressão de proteinases apresentam baixo efeito citopático, enquanto que aqueles com expressão igual ou superior a linhagem HM1-IMSS selvagem produzem efeito maior. Estes resultados correlacionaram o efeito citopático com a virulência do parasito.

Tsutsumi *et al.* (1992) encontraram correlação entre a atividade colagenolítica de trofozoítas da linhagem HM1-IMSS axênica e o tamanho do abscesso produzido em fígado de hamster, e consideraram este ensaio como o melhor marcador de virulência de *E. histolytica* cultivadas sob condições axênicas.

Araiza-Orozco *et al.* (1999) encontraram boa correlação entre a atividade proteolítica e colagenolítica de linhagens de *E. histolytica* monoxênicas e axênicas de diferentes graus de virulência.

Moléculas de superfície foram caracterizadas em *E. histolytica* estando alteradas, ausentes ou em pequenas quantidades em *E. dispar*, entre estas podemos citar: os antígenos de superfície de 96 kD (TORIAN *et al.*, 1990) e de 125 kD (EDMAN *et al.*, 1990), e a adesina de 112 kD (ARROYO & OROZCO, 1987).

Apesar dos parâmetros listados acima serem bastante utilizados na diferenciação de cepas patogênicas e não patogênicas resultados contraditórios têm sido encontrados entre diferentes ensaios “*in vivo*” e “*in vitro*”.

Tsutsumi *et al.* (1992) encontraram correlação entre a atividade colagenolítica e o tamanho do abscesso hepático produzido “*in vitro*”, demonstraram que isolados axênicos com a mais alta taxa de eritrofagocitose produziam pequenas lesões em fígado de hamster, enquanto que isolados com taxa de eritrofagocitose relativamente baixa produziam os maiores abscessos.

Montfort *et al.* (1993) observaram que os isolados axênicos incapazes de produzir lesão em fígado de hamster apresentaram as mais altas taxas de eritrofagocitose, e não encontraram qualquer correlação entre a atividade proteásica e a patogenicidade. Estes pesquisadores concluíram que a fagocitose e a atividade proteásica não são bons marcadores de patogenicidade.

Gomes *et al.* (1997) encontraram baixa correlação entre os ensaio de virulência “*in vitro*” e “*in vivo*” ao avaliarem o comportamento de isolados axênicos de *E. histolytica* quanto à capacidade de produzir lesão em fígado de hamster, a taxa de eritrofagocitose e o efeito citopático sobre células VERO. Estes pesquisadores não encontraram correlação entre a capacidade de produzir lesão hepática e o número médio de eritrócitos fagocitados, percentagem de amebas fagocíticas e efeito citopático. Todavia, encontraram correlação entre o efeito citopático e o número médio de eritrócitos fagocitados. Gomes *et al.* (1997) concluíram que a virulência não pode ser diretamente

mensurada, mas sim as diferentes características biológicas ou funcionais do parasito as quais devem ou não estar relacionadas aos mecanismos patogênicos da amebíase invasiva. Posteriormente, Ankri *et al.* (1999) sugeriram que o efeito citopático “*in vitro*” não é suficientemente indicativo de virulência.

1.6 PATOLOGIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O parasito comumente vive no intestino grosso, onde pode causar alterações na mucosa intestinal, caracterizando a forma clínica denominada amebíase intestinal. Cerca de 90% dos pacientes infectados não desenvolvem doença o que é atribuído à presença da *E. dispar*. Em alguns indivíduos, o parasito pode invadir a mucosa colônica e atingir a circulação sanguínea disseminando-se para outros órgãos como fígado, pulmão, coração, encéfalo, pele entre outros caracterizando o quadro de amebíase extra-intestinal, sendo a forma mais comum a necrose coliquativa do fígado, erroneamente denominada de abscesso hepático (CARRADA-BRAVO, 1989). A veia porta é considerada a via de disseminação dos trofozoítas para o fígado, porém a rota intraperitoneal tem sido sugerida como possível via de disseminação (SHIBAYAMA *et al.*, 1997).

Segundo Walsh (1986), um em cada dez infectados com *E. histolytica* não desenvolve sintomatologia. Entretanto, Haque *et al.* (2002) observaram que crianças infectadas com *E. histolytica* assintomáticas desenvolvem manifestação clínica dentro de 2 meses, das quais 10% apresentam diarreia e 4% manifestam colite amebiana.

A infecção varia de formas leves a graves, podendo levar o indivíduo à morte. Os quadros sintomáticos estão relacionados à forma invasiva da doença e apresentam grande variedade de quadros clínicos, como descritos a seguir:

1.6.1 Amebíase Intestinal

Na amebíase intestinal invasiva são observadas ulcerações nodulares ou irregulares no cólon (especialmente no ceco), região sigmóide e reto. As lesões nodulares são pequenas (0,1 a 0,5 cm), arredondadas, com região central necrosada, freqüentemente preenchida por material mucoso amarelado, rodeada por uma borda de tecido edematoso. Úlceras irregulares ou serpiginosas de 1,0 a 5,0 cm, com bordas elevadas e preenchidas com fibrina, são comumente encontradas na região cecal e cólon ascendente (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

A amebíase intestinal apresenta-se sob os seguintes quadros clínicos:

- **Colite (ulceração e inflamação do cólon) não disentérica:** é a forma clínica mais comum e encontrada em 90% dos casos (ESPINOSA-CANTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Caracteriza-se por um começo insidioso, seguido de crises diarréicas (3 à 5 evacuações) com fezes amolecidas ou pastosas, com muco ou sangue, cólica, flatulência e sensação de desconforto abdominal. As crises se intercalam com períodos de acalmia e obstipação intestinal (SALLES *et al.*, 1998). Acredita-se que a colite não

disentérica está relacionada à presença de *E. dispar* (SARGEAUNT, 1987; 1992; DIAMOND, 1992).

- **Colite amebiana disentérica:** considerada quadro agudo da amebíase, sendo mais rara que a colite não disentérica. Caracteriza-se por diarreia (podendo chegar a 10 ou mais evacuações ao dia) com fezes líquidas, muco-sanguinolentas ou muco-pio-sanguinolentas, dores abdominais tipo cólica, tenesmo, dor epigástrica, pirose, plenitude e flatulência. Pode haver melhora espontânea seguida de períodos de obstipação intestinal, flatulência e desconforto abdominal (SALLES *et al.*, 1998).

- **Colite necrotizante:** forma grave da amebíase intestinal que atinge 0,5% dos indivíduos infectados. Caracteriza-se por necrose, isquemia e hemorragia que comprometem extensas áreas do intestino grosso, mais precisamente do ceco e cólon ascendente, com perfuração do intestino e peritonite, podendo levar a óbito. Pode ocorrer também apendicite amebiana devido a ulcerações na região cecal apendicular (SALLES *et al.*, 1998).

- **Ameboma:** decorrente de uma reação tecidual do tipo granulomatosa provocando edema e estreitamento da luz do intestino, podendo ser único ou múltiplo. Acomete de 0,5 a 1% dos pacientes com colite amebiana (SALLES *et al.*, 1998).

1.6.2 Amebíase Extra-Intestinal

- **Necrose coliquativa do fígado:** é forma extraintestinal mais freqüente é a necrose coliquativa do fígado, caracterizada histologicamente por regiões de morte de hepatócitos, com presença de células liquefeitas e restos

celulares, circundadas por uma borda de tecido conectivo, e marcada resposta inflamatória aguda, com presença principalmente de neutrófilos, porém poucos trofozoítas (SHIBAYAMA *et al.*, 1997; STANLEY, 2001). A produção de múltiplos focos de inflamação ao redor das amebas leva a formação de lesões do tipo granulomatosas e extensa necrose tissular, o que demonstra que as células inflamatórias do hospedeiro participam na produção do dano hepático (TSUTSUMI, 1994).

Mudanças macroscópicas são observadas cerca de 6 h após a inoculação intraperitoneal em hamster e se apresentam como pequenas lesões amareladas (1-2 mm de diâmetro), múltiplas, localizadas na superfície do fígado. Com o decorrer da infecção (24 a 48 h), evoluem para lesões conspícuas, elevadas, com bordas irregulares, tornando-se maiores nos estágios mais avançados (SHIBAYAMA *et al.*, 1997).

As diferenças patológicas observadas entre a colite amebiana e a amebíase hepática podem ser devida a variação de virulência do parasito nos dois órgãos ou devida as diferentes repostas imunes do hospedeiro no intestino e fígado (STANLEY, 2001).

Os abscessos podem ser únicos ou múltiplos, de tamanhos variados, localizando-se preferencialmente no lado direito. A doença hepática caracteriza-se pela tríade dor no hipocôndrio direito, febre e hepatomegalia. São comuns calafrios, anorexia, perda de peso e às vezes diarreia. O aparecimento de icterícia é indicativo de múltiplos abscessos e/ou grande comprometimento hepático (SALLES *et al.*, 2003).

Complicações podem ocorrer devido à presença de bactérias translocadas do meio intestinal causando infecções secundárias. Bactérias como *E. coli* e *Klebsiella* têm sido encontradas em culturas de exsudatos do fígado (SHARMA *et al.*, 1997). Pode haver ruptura do abscesso com disseminação do parasito para outros órgãos como peritônio (peritonite grave), pulmões, pericárdio e cérebro (SALLES *et al.*, 2003).

- **Amebíase pleuropulmonar:** é menos freqüente e deve-se a ruptura de um abscesso hepático ou, mais raramente, a disseminação hematogênica a partir do intestino. Nestes casos há formação de abscessos, pneumonites, empiema e fístula hepatobrônquica (SALLES *et al.*, 1998). Pode ser confundido com abscesso bacteriano ou doença neoplásica (HARA *et al.*, 2004).

- **Amebíase cutânea:** é mais freqüentemente observada na região do períneo, seguida da genital, períneo-genital e torácica. Nas crianças, as lesões vulvovaginais apresentam-se aumentadas em volume, dolorosas e com presença de exsudato mucosanguinolento, evoluindo para úlceras dolorosas que se disseminam rapidamente com histólise da região afetada. Nas mulheres adultas as lesões podem ser confundidas com neoplasias malignas. Nos homens se inicia como uma lesão ulceronecrótica aguda discreta, que nos estágios mais avançados pode levar a destruição do pênis (CARRADA-BRAVO, 1989).

A localização do parasito em outros órgãos como cérebro e rins foi relatada, porém é considerada rara (LAWFORD & SORRELL, 1994; GALARZA *et al.*, 2002;

1.7 O GENOMA DA *E. HISTOLYTICA*/E. *DISPAR*

O genoma da *E. histolytica* foi recentemente descrito e possui 23.751.788 pb de comprimento com cerca de 9.938 genes que ocupam 49% do genoma do parasito, com tamanho médio de 1,17 kb (LOFTUS *et al.*, 2005).

É um organismo poliplóide com cariótipo $4n$ ou mais, apresentando um baixo conteúdo GC de 22,4% e composto por cromossomos lineares e pequenas moléculas de DNA circular (BHATTACHARYA *et al.*, 2000).

Variações no tamanho dos cromossomos são observadas entre diferentes isolados de *E. histolytica* (e mesmo após cultivos prolongados de uma única linhagem) que chegam até 1 Mb de comprimento. Tais variações podem ser decorrentes de mudanças no número de genes para RNAt repetidos em *tandem*, localizados nas regiões subteloméricas dos cromossomos (WILLHOEFT & TANNICH, 1999). Vinte e cinco arranjos de RNAt repetidos em *tandem* podem ser identificados no genoma, cada um contendo de um a cinco genes para RNAt por unidade repetida (LOFTUS *et al.*, 2005).

Pequenas moléculas de DNA circular com tamanhos de até 60 kilobases (kb) são comumente encontradas. Um tipo de DNA plasmidial de 24,6 kb que contém os genes para RNAr é o epissomo mais abundante (HUBER *et al.*, 1989; BHATTACHARYA *et al.*, 1989). Este epissomo possui dois cístrons de RNAr separados por uma região de DNA repetitivo (HUBER *et al.*, 1989) e múltiplas origens de replicação (GHOSH *et al.*, 2003). Existem três tipos de RNAr: 25S, 17S e 5S. O processamento do RNAr 25S origina as

subunidades 16S e 5.8S. Dois tipos de RNA polimerases dependente de DNA estão presentes (RNA polimerase I e II) (ALBACH, 1989).

Os genes são separados por pequenas regiões intergênicas menores que 100 kb. Os íntrons são pequenos, com tamanhos entre 45 a 128 pares de bases (pb), tendo em média 65 pb de comprimento. São delimitados pelas seqüências GTTGTA, na extremidade 5', e TAG, na extremidade 3' (WILLHOEFT *et al.*, 2001). Estima-se que ¼ dos genes contém íntrons, 6% dos quais contém múltiplos íntrons. Os genes codificadores de proteínas de virulência (lectina GalGalNAc, cisteína proteinases e amebaporos) foram identificados em redundância no genoma (LOFTUS *et al.*, 2005).

Os genomas de *E. histolytica* e *E. dispar* mostram 95% de identidade nas seqüências das regiões codificadoras e 80% nas não codificadoras. Tem sido observado que a ordem dos genes nos cromossomos são idênticas (PETRI, 2002).

A família multigênica para as enzimas cisteína proteinases (cp1-6) estão também presentes em *E. dispar*, porém o gene cp5 é altamente degenerado e contém numerosas mudanças pontuais, inserções e deleções resultando em múltiplos códons de parada (WILLHOEFT *et al.*, 1999). Recentemente, dez novos genes para cisteína proteinases foram identificados no genoma de *E. histolytica* (LOFTUS *et al.*, 2005).

Tannich *et al.* (1989) encontraram diferenças significativas entre os genomas das duas espécies a partir da análise de sequenciamento de um gene estrutural de 1,9 kb. Estes pesquisadores também descreveram um

número variável de repetições de 140 pb no *locus* de virulência de *E. histolytica* localizado no DNA plasmidial extracromossomal.

Samuelson *et al.* (1989) e Bracha *et al.* (1990) utilizaram duas diferentes sondas de DNA na identificação de cepas patogênicas e não patogênicas. Uma das sondas se hibridizava, exclusivamente, a uma sequência repetitiva de 145 pb em isolados patogênicos, enquanto que a outra era específica para uma sequência de 133 pb encontrada apenas em isolados não patogênicos.

Clark & Diamond (1991), utilizando sondas de DNA, encontraram diferenças estruturais no gene para o RNAr (DNAr) de *E. histolytica* e *E. dispar*, sugerindo que a distância genética entre as duas espécies é comparável a do homem e o camundongo, considerando-as espécies diferentes.

Mackenstedt & Johnson (1995) encontraram diferentes polimorfismo de RFLP nos isolados estudados, e demonstraram que linhagens patogênicas são fortemente relacionadas filogeneticamente e claramente separadas de linhagens não patogênicas, e, portanto, espécies diferentes.

A clonagem do gene para a enzima hexoquinase (HE) por Ortner *et al.* (1997) demonstrou a existência de quatro diferentes cDNAs para quatro diferentes padrões da isoenzima (2 patogênicos, característicos de *E. histolytica*, e 2 não patogênicos, característicos de *E. dispar*). A comparação entre as sequências de nucleotídios das duas espécies e destas com outros organismos demonstrou uma pequena distância evolutiva entre as duas espécies. Com base em seu estudo, estes autores reforçaram o *status* de espécies diferentes.

Diferenças genéticas entre *E. histolytica* e *E. dispar* parece ser o ponto principal da interação parasito-hospedeiro e a caracterização de novas regiões gênicas tem sido o alvo de muitos pesquisadores. A genotipagem dos isolados pode ser obtida a partir de diferentes metodologias.

O polimorfismo genético obtido por meio da RAPD-PCR tem sido correlacionado com a virulência das cepas (MACKENSTEDT & JOHNSON, 1995; VALLE *et al.*, 2000). A RAPD-PCR deve ser empregada apenas para isolados axênicos, pois bactérias presentes no meio de cultura influenciam no resultado da técnica (GOMES *et al.*, 2000). Adicionalmente, esta técnica pode ser aplicada apenas na caracterização de isolados de *E. histolytica*, devido a dificuldade em se obter cultivos axênicos de *E. dispar* (apenas um isolado foi obtido no mundo todo). Alguns estudos no Brasil utilizaram a RAPD-PCR na caracterização de isolados de *E. histolytica*, mostrando variabilidade genética nos isolados brasileiros (VALLE *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2000).

Mais recentemente, a caracterização molecular baseada na variação do número de pequenas seqüências repetidas em *tandem* (short tandem repeat – STR) em diferentes *loci* tem fornecido conhecimentos sobre as diferentes linhagens de *E. histolytica* e *E. dispar* dentro e entre populações e em grupos familiares, sendo os *loci* 1-2, 5-6, do gene da proteína rica em serina (SREHP) e da quitinase como um dos mais polimórficos entre os analisados (ZAKI & CLARK, 2001; ZAKI *et al.*, 2002; HAGHIGHI *et al.*, 2002; ZAKI *et al.*, 2003; HAGHIGHI *et al.*, 2003). Técnicas de genotipagem de *E. dispar* por STR's ainda não estão disponíveis no Brasil.

1.8 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de rotina da amebíase intestinal é feito a partir do encontro de cistos nas fezes. Entretanto, o exame microscópico do material fecal não pode ser empregado para diagnóstico das formas extra-intestinais, pois apenas 1/3 dos pacientes apresentam parasitoscopia positiva (RODRIGUES FILHO *et al.*, 1963).

Com a aceitação de que a *E. histolytica* é uma espécie distinta de *E. dispar*, houve a necessidade do emprego de técnicas alternativas para confirmação da infecção, que foram criadas a partir das diferenças biológicas, imunológicas e genômicas entre estas espécies.

Outros métodos, como a retossigmoidoscopia, a radiologia, a colonoscopia e o exame histopatológico do material suspeito, podem ter grande valia no diagnóstico da amebíase intestinal invasiva. Trofozoítas podem ser freqüentemente encontrados no muco sanguíneo e no exsudato sobre a mucosa ulcerada e podem ser coletados durante a retossigmoidoscopia (ESPINOSA-CASTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). Este método é valioso na caracterização de lesões ulceradas do intestino (SALLES *et al.*, 1998).

O diagnóstico da amebíase hepática, na maioria das vezes é difícil. Em áreas endêmicas, a presença de sintomas como febre, perda de peso e dor no hipocôndrio direito é sugestiva da infecção. O diagnóstico pode ser confirmado por ultrasonografia ou tomografia computadorizada (ESPINOSA-CASTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000).

1.8.1 Exame Parasitológico das Fezes

O método mais amplamente utilizado no diagnóstico da amebíase é o exame parasitológico que consiste na identificação de cistos e/ou trofozoítas nas fezes a partir do emprego de métodos direto ou de concentração.

A visualização a fresco de cistos ou trofozoítas deve ser usada apenas como orientação no diagnóstico da amebíase. Entretanto, é fundamental que o material suspeito seja devidamente fixado e corado com hematoxilina férrica para permitir o diagnóstico diferencial de *E. histolytica*/*E. dispar* das outras espécies de amebas pertencentes à classe Lobosea, como *E. coli* e *E. hartmani*, esta última considerada uma raça de *E. histolytica* (LEVENTHAL & CHEADLE, 1997).

O tamanho dos trofozoítas e cistos, número de núcleos nos cistos maduros, a estrutura nuclear e o aspecto dos corpos cromatóides auxiliam na diferenciação de *E. histolytica*/*E. dispar* de outras amebas, células e outros parasitos (GONZÁLES-RUIZ *et al.*, 1994). Nas fezes, o encontro de trofozoítas contendo eritrócitos no seu interior pode ser utilizado na distinção de *E. histolytica* de *E. dispar* (CARRADA-BRAVO, 1989; RAVDIN *et al.*, 1990; GONZÁLES-RUIZ *et al.*, 1994).

O baixo número de cistos presentes nas fezes e a excreção intermitente diminuem a sensibilidade dos métodos coproscópicos. Para um resultado mais seguro, torna-se necessária à investigação de pelo menos três amostras fecais (WALSH, 1986) que devem ser coletadas em dias alternados e preservadas em soluções fixadoras como formalina (10%) e MIF (Mertiolato-

Iodeto-Formalina). Além disso, é importante evitar a presença de substâncias como antibióticos, laxantes e anti-diarréicos, pois danificam a estrutura do parasito (PROCTOR, 1991).

Embora os métodos parasitológicos permitam a identificação de *E. histolytica*/*E. dispar*, a diferenciação entre estas duas espécies é recomendada pela WHO/PAHO/UNESCO (1997), pois o tratamento só deverá ser adotado apenas na presença de *E. histolytica*. Para suprir esta necessidade, outras técnicas estão disponíveis como isolamento do parasito em meios de cultura seguida da caracterização bioquímica, técnicas para detecção de antígenos, de anticorpos e de ácidos nucleicos.

1.8.2 Isolamento em Meio de Cultura

Isolados de *E. histolytica* e *E. dispar* podem ser obtidos a partir de amostras fecais, exsudatos ou biópsias utilizando diferentes meios de cultura. Apesar da cultura consumir tempo e ser de custo elevado, e isoladamente não ser suficiente na identificação das duas espécies, os isolados fornecem extratos protéicos e ácidos nucléicos importantes na caracterização de *E. histolytica* e *E. dispar*.

A cultura obtida diretamente das fezes produz isolados xênicos onde também são isoladas bactérias da flora intestinal. O meio mais comumente utilizado é o de Robinson (ROBINSON, 1968) suplementado com soro de cavalo.

Em 1961, Diamond desenvolveu um método de cultura para obtenção de isolados axênicos, ou seja, isolados de *E. histolytica* sem a

presença de qualquer outro microorganismo. As amebas eram inicialmente cultivadas em meio xênico, em seguida transferidas para um meio monofásico contendo o tripanossomatídeo do gênero *Crithidia*. Após estabelecimento neste meio, as amebas eram então transferidas para um meio difásico, denominado TTY-S-CEEM₂₅-diphasic (Tryptose, Trypticase, yeast extract-serum-chick embryo extract mild, 25%), onde o tripanossomatídeo morria após três repiques. Apenas um único isolado de *E. histolytica* foi axenizado neste meio.

A fim de melhorar a qualidade da axenização, novos meios foram desenvolvidos a partir de modificações do meio de Diamond (1961) e denominados TP-S-1 monofásico (Tryptcase, Panmed-serum) e TYI-S-33 (Tryptcase-Yeast extract-iron serum) para cultivo em massa de trofozoítas (DIAMOND, 1968; DIAMOND *et al.*, 1978), sendo este último o mais utilizado para cultivo axênico.

A obtenção de isolados axênicos intensificou as pesquisas no campo da amebíase. A observação que diferentes isolados cultivados sobre diferentes condições de cultura (polixênica, monoxênica e axênica) possuem graus variáveis de patogenicidade e virulência mostrando-se importante na caracterização de *E. histolytica* e *E. dispar*.

Em condições axênicas, Wittner (1970) observou maior virulência do parasito quando comparada com amebas isoladas em cultivos xênicos.

Bos & van de Griend (1977) demonstraram que apenas cultivos xênicos de *E. histolytica* são capazes de produzir necrose coliquativa em fígado de hamster enquanto que cultivos axênicos são incapazes de produzir tais lesões.

Vargas *et al.* (1990) encontraram maior atividade de proteases em *E. histolytica* cultivadas em meio axênico, o que está correlacionado à sua grande capacidade de destruir células epiteliais da linhagem MDCK. Contudo, os isolados cultivados em meio monoxênico (*E. histolytica* cultivada com o protozoário *Crithidia*) tiveram menor atividade de proteases e menor capacidade de destruição celular.

Segundo Clark (1998), a obtenção de culturas axênicas de formas não patogênicas de *E. histolytica* são difíceis, e que até hoje apenas poucos isolados, nestas condições, foram obtidos com sucesso. Condições de axenização são consideradas extremamente estressantes para o parasito, o que justifica o pequeno número de isolados axênicos obtidos de linhagens não invasivas.

1.8.3 Caracterização Bioquímica

O método padrão-ouro para caracterização de *E. histolytica* e *E. dispar* consiste no isolamento do parasito a partir das fezes seguida da determinação do padrão de isoenzimas (zimodema) por eletroforese em gel de amido. Todavia, a dificuldade em se obter culturas e fazer a caracterização isoenzimática de grande número de amostras torna estas técnicas impraticáveis no diagnóstico de rotina da amebíase.

O estudo do perfil eletroforético das isoenzimas glucose fosfato isomerase (GPI), L-malato desidrogenase (MDH) e fosfoglucomutase (PGM) por Sargeaunt & Williams (1978) e Sargeaunt *et al.* (1978), demonstrou a presença de quatro diferentes isolados de *E. histolytica*, e encontraram

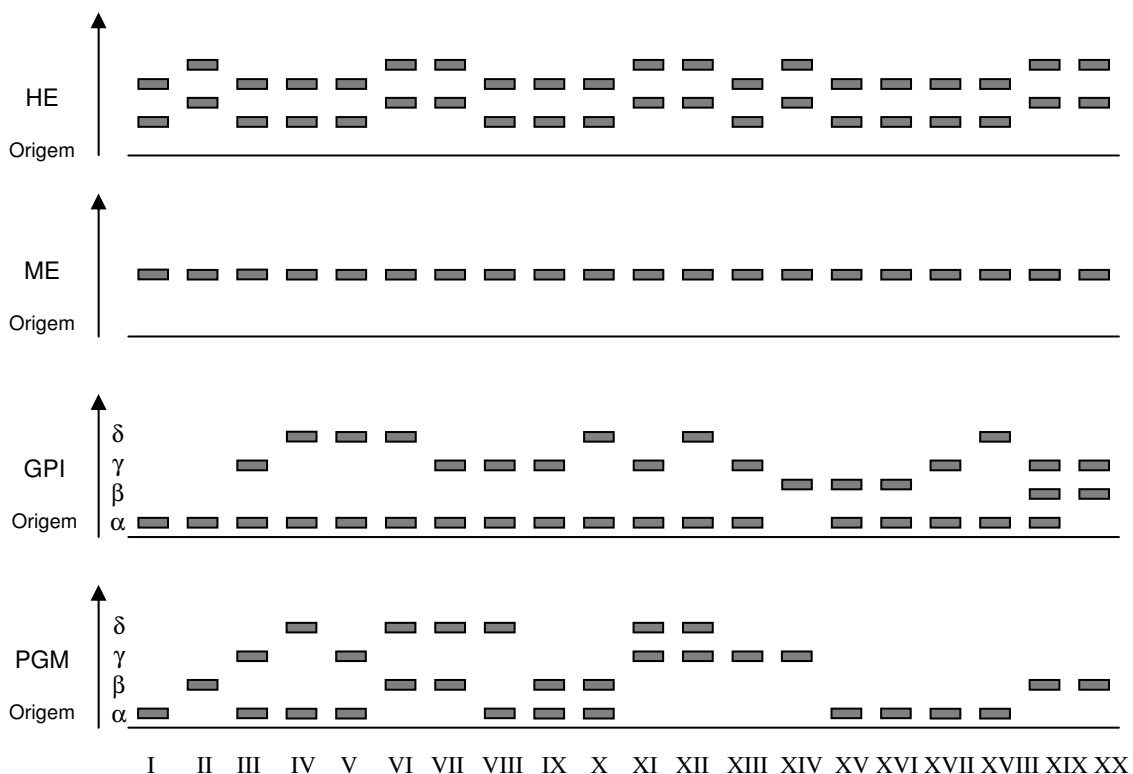
correlação entre a presença de uma banda rápida (banda □) na PGM e ausência de uma banda lenta (banda □) com isolados provenientes de pacientes sintomáticos. Diferentes padrões foram encontrados para *E. hartmani*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii*, *Dientamoeba fragilis*, *E. moshkovskii*, *E. invadens* e *E. chattoni* (SARGEAUNT & WILLIAMS, 1979; SARGEAUNT *et al*, 1980a).

Sargeaunt *et al.* (1980b) estudando o padrão das enzimas PGM, GPI, MDH e hexoquinase (HE) descreveram sete novos zimodemas de *E. histolytica*, dos quais três (zimodemas II, VI e XI) eram provenientes de pacientes com amebíase clínica e os demais de pacientes assintomáticos. Além disso, observaram a presença de duas bandas rápidas na enzima HE apenas em isolados considerados patogênicos.

Foram caracterizados pelo menos 20 zimodemas cujo padrão eletroforético da HE, PGM, MDH e GPI diferem entre formas patogênicas e não patogênicas e por isso são considerados indicadores de patogenicidade.

A diversidade no padrão eletroforético relacionada a isolados de *E. histolytica* e *E. dispar* demonstra que nove dos zimodemas (zimodemas II, VI, VII, XI, XII, XIII, XIV, XIX e XX) são característicos de *E. histolytica* e são considerados patogênicos. Os demais têm sido utilizados na caracterização de isolados de *E. dispar* e não estão relacionados a patogenicidade (SARGEAUNT *et al*, 1982) (Figura 5).

Apesar da caracterização bioquímica ser um excelente marcador para diferenciação das duas espécies, Mirelman *et al.* (1986) acreditam na instabilidade quanto ao padrão de zimodemas, por terem demonstrado que



Fonte: Sargeaunt *et al.*, 1982.

Figura 5 - Zimograma representando os 20 perfis isoenzimáticos (zimodemas) caracterizado para as enzimas PGM, GPI, ME e HE.

durante a axenização, zimodemas não patogênicos eram convertidos para padrões patogênicos acompanhado do aumento na virulência, sugerindo a presença de uma única espécie, a *E. histolytica*. Este fato permitiu a conclusão de que a presença de determinadas bactérias na flora intestinal estariam

relacionadas à conversão dos zimodemas, determinando um caráter patogênico ou não a espécie.

Andrews *et al.* (1990), observaram que isolados com zimodema não patogênico (tipo I) são capazes de se transformar em padrão patogênico (tipo II) durante o processo de axenização na presença de *Escherichia coli* em lugar de *Crithidia*. A re-conversão para zimodema não patogênico foi obtida quando a microflora original foi restabelecida. Estes resultados corroboraram os de Mirelman *et al.* (1986), sugerindo que as condições de cultura influenciam sobre o perfil das isoenzimas e, portanto, na condição patogênica ou não da *E. histolytica*.

Outros grupos tentaram reproduzir o trabalho de Mirelman *et al.* (1986) e Andrews *et al.* (1990), porém não foram capazes de confirmar o processo de conversão de zimodemas.

O estudo de Jackson *et al.* (1992) demonstrou que a axenização de isolados com zimodemas II, XI e XIV de *E. histolytica* e I e III de *E. dispar* não sofrem qualquer alteração quanto ao perfil enzimático de PGM e HE, sendo contrários à hipótese de Mirelman *et al.* (1986) e Andrews *et al.* (1990).

Posteriormente, Jackson & Suparsad (1997) monitorando isolados (xênicos, monoxênicos e axênicos) da linhagem SAW 1769 (zimodema XIX), desde o isolamento até a axenização não observaram conversão para outros padrões, corroborando os dados de Jackson *et al.* (1992).

1.8.4 Métodos Imunológicos

A obtenção de antígenos mais puros a partir de isolados axênicos, bem como a identificação de moléculas antigênicas do parasito permitiu o desenvolvimento de métodos imunológicos, mais específicos e sensíveis na diferenciação das duas espécies.

Torian *et al* (1989) observaram que 68% dos pacientes com amebíase invasiva possuem anticorpos séricos que reconhecem o antígeno de 96 kDa na superfície de *E. histolytica*.

Ravdin *et al.* (1990) identificaram a cadeia pesada de 170 kDa da lectina como uma região antigênica e altamente conservada.

1.8.4.1 Detecção de Anticorpos

A sorologia tem se mostrado útil no diagnóstico da amebíase extraintestinal e em estudos epidemiológicos da amebíase invasiva. Estas técnicas apresentam diferentes sensibilidades e especificidades e permitem resultados mais fidedignos que o exame parasitológico de fezes. Os testes sorológicos mostram positividade em cerca de 75% dos pacientes com amebíase intestinal invasiva e em mais de 90% dos pacientes com abscesso hepático (ESPINOSA-CASTELLANO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000). As técnicas mais utilizadas são: ensaio imunoenzimático (ELISA), reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e hemaglutinação indireta (HAI), algumas delas estão disponíveis comercialmente.

A detecção de anticorpos IgG (produzidos durante a invasão tecidual) através da técnica de RIFI mostra boa sensibilidade (> 90%) auxiliando no diagnóstico de formas invasivas, seja na colite amebiana ou

amebíase extraintestinal, bem como no acompanhamento de cura (FEITOSA, 1986; BRAGA *et al.*, 1996). Na técnica de HAI são utilizados eritrócitos sensibilizados com antígenos obtidos a partir de isolados axênicos e mostraram-se sensíveis na detecção de anticorpos anti-*E. histolytica* (KRUPP, 1970). A combinação das técnicas de RIFI e HAI chega a 100% de positividade nos casos de abscesso hepático (KRETSCHMER, 1989).

No teste de ELISA podem ser usados tanto antígenos recombinantes como solúveis. Esta técnica se mostra bastante sensível no diagnóstico de amebíase hepática (KRETSCHMER, 1989). Segundo Abd-Alla *et al.* (1998), o ELISA para a detecção de IgM anti-lectina parece ter maior utilidade clínica no grupo de pacientes com colite amebiana aguda que o ELISA para a detecção de IgG.

O emprego do teste de ELISA na detecção de anticorpos IgA na saliva revelou altos níveis de IgA anti-*E. histolytica* em pacientes com amebíase intestinal e hepática (RAMOS *et al.*, 1997). Pesquisa de IgG na saliva tem demonstrado alta especificidade e sensibilidade no diagnóstico da colite aguda e amebíase hepática (ABD-ALLA *et al.*, 2000).

Infelizmente, as provas sorológicas não são capazes de distinguir infecções recentes, presentes e passadas o que diminui a aplicabilidade da sorologia no diagnóstico da amebíase (GRUNDY, 1982; KRETSCHMER, 1989).

1.8.4.2 Detecção de Antígenos

O teste de ELISA para detecção de antígenos nas fezes (coproantígenos) mostra boa sensibilidade e especificidade no diagnóstico da amebíase (BENZEGUIR & KETTIS, 1997; EVANGELOPOULOS *et al.*, 2001). Segundo Haque *et al.* (1998) os resultados da pesquisa de coproantígenos são comparáveis aos da análise de zimodemas e PCR. Quando comparada a outras técnicas, a detecção de coproantígenos parece ser a melhor em termos de praticidade e tempo de execução, principalmente em estudos de campo (EVANGELOPOULOS *et al.*, 2001).

Algumas técnicas foram desenvolvidas para detectar antígenos circulantes (imunocomplexos) presentes no soro de pacientes com amebíase. Segundo Vinayak *et al.* (1990), o ELISA para a detecção de imunocomplexos tem considerável limitação no diagnóstico de pacientes com colite não disentérica, porém de boa sensibilidade no diagnóstico de pacientes com amebíase hepática.

A pesquisa de imunocomplexos na saliva utilizando teste de ELISA é considerada sensível e específica no diagnóstico da colite amebiana aguda (ABD-ALLA *et al.*, 2000).

1.8.5 Biologia Molecular

A partir da descoberta de diferenças genéticas entre as cepas de *E. histolytica* (patogênica) e *E. dispar* (não patogênica) foi possível desenvolver técnicas mais sensíveis para diagnóstico diferencial das duas espécies.

Garfinkel *et al.* (1989) construíram duas sondas de DNA, P145 e B133, específicas para zimodemas patogênicos e não patogênicos,

respectivamente. Estas sondas se hibridizam exclusivamente a uma sequência de DNA repetitivo de 145 pb (presente em isolados patogênicos) e 133 pb (em isolados não patogênicos) de comprimento no epissomo de 24,6 kb. Posteriormente, Romero *et al.*, (1992) e Acuña-Soto *et al.* (1993) desenvolveram uma técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando dois pares de oligonucleotídeos específicos para as sequências repetitivas de 145 pb e 133 pb, que foi empregada no diagnóstico de *E. histolytica* e *E. dispar* em amostras fecais.

Aguirre *et al.* (1995, 1997) associaram a técnica da PCR ao ensaio colorimétrico (ELISA-PCR ou PCR-SHELA) para diferenciar as duas espécies tendo como seqüências-alvo o DNA repetitivo no epissomo. Nesta técnica, um iniciador de cada par de oligonucleotídeos é marcado com digoxigenina e os produtos da PCR são detectados através de uma solução de hibridização não isotópica, utilizando sondas biotinaladas específicas para *E. histolytica* e *E. dispar*. A absorbância é mensurada em um leitor de ELISA após a adição de um anticorpo anti-digoxigenina marcado com fosfatase alcalina e *p*-nitrofenol fosfato. Britten *et al.* (1997) modificaram a técnica de Aguirre *et al.* (1995; 1997) transferindo a marcação pela biotina para os iniciadores e a hibridização detectada a partir de dois diferentes anticorpos.

Gomes *et al.* (1997) empregaram a técnica de LSSP-PCR (PCR sob condições de baixa estringência utilizando um único iniciador específico) desenvolvida por Pena *et al.* (1994) para amplificação de uma região de 482 pb do DNA genômico. Os resultados demonstraram a presença de dois diferentes

grupos: um específico para isolados patogênicos (*E. histolytica*) e um para isolados não patogênicos (*E. dispar*).

Blessmann *et al.* (2002) desenvolveram uma técnica de PCR em tempo real para amplificação de um fragmento de 310 pb no DNA epissomal, capaz de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*. A técnica mostrou boa correlação com a análise isoenzimática.

A análise dos Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição (RFLP) mostrou-se importante na diferenciação das duas espécies e os resultados obtidos foram comparáveis aos da análise isoenzimática e de outras técnicas de biologia molecular (TANNICH & BURCHARD, 1991; KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; EVANGELOPOULOS *et al.*, 2000).

Tannich & Burchard (1991) demonstraram diferentes sítios de restrição em uma sequência de 482 pb do gene M17 em cepas patogênicas e não patogênicas, cujos pontos de restrição para as enzimas *XmnI* e *TaqI* estão presentes apenas em cepas patogênicas, enquanto que as cepas não patogênicas contêm um único sítio para a enzima *Accl*. No ano seguinte, Tachibana *et al.* (1992) demonstraram que o emprego da PCR seguida da digestão com a enzima de restrição *HinfI* é uma técnica sensível para o diagnóstico da amebíase. Katzwinkel-Wladarsch *et al.* (1994) empregaram um nested-PCR (para a subunidade menor do DNAr (SSU-RNAr) seguido da digestão com as enzimas *DraI* e *Sau96I* na detecção de *E. histolytica* e *E. dispar* nas fezes. Posteriormente, Evangelopoulos *et al.* (2000) desenvolveram um nested-PCR-multiplex para SSU-RNAr que detecta simultaneamente as duas espécies.

1.9 EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE

A aceitação de *E. dispar* e *E. histolytica* como espécies distintas, porém fortemente relacionadas, trouxe implicações na epidemiologia da amebíase. Diversos parasitologistas têm relacionado a *E. dispar* aos casos assintomáticos da doença.

Esta parasitose apresenta ampla distribuição geográfica com alta prevalência em regiões tropicais onde as condições de higiene e a educação sanitária são consideradas deficientes. A África, Ásia, Europa e Américas do Norte e do Sul são consideradas as regiões de maior prevalência da doença (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Não se sabe a verdadeira freqüência da amebíase no mundo. Estudos indicam que a freqüência varia entre 0,2 a 50% (RODRIGUEZ, 1985).

O parasito compromete indivíduos de todas as idades e níveis sociais. A prevalência da amebíase é maior em pessoas de baixo nível sócio-econômico, sendo 4 vezes menor em grupos sócio-econômicos superiores. Há maior freqüência de amebíase hepática na faixa etária de 30-50 anos, e em homens numa proporção de 4:1 em relação as mulheres (GAYTAN, 1987).

A amebíase invasiva é mais comum em cidades em desenvolvimento, e está relacionada a uma variedade de condições que favorecem a transmissão fecal-oral de cistos (ESPINOSA-CANTELLNO & MARTÍNEZ-PALOMO, 2000) ou contaminação fecal de água e alimentos (RAVIDIN, 1989). Há maiores possibilidades de contaminação em núcleos urbanos e aglomerações, com deficientes condições de saneamento básico ambiental, tais como carência de água potável intradomiciliar, destino

inadequado das excretas, maus hábitos pessoais e coletivos de higiene assim como carências alimentares e nutricionais (RODRIGUEZ, 1985).

Nas Américas, o México é o país com maior número de casos de amebíase e onde ocorrem as formas mais graves da doença. Atinge principalmente as populações mais pobres, sendo a forma hepática considerada a quarta maior causa de morte (BRANDT & TAMAYO, 1976). A incidência é de 1.000 casos para cada 100.000 habitantes, o que representa cerca de 1 milhão de casos anuais no México. A incidência do abscesso hepático é de 3-4 casos/100.000 habitantes e acomete principalmente indivíduos do sexo masculino (GARCIA-MANZO *et al.*, 1997). O abscesso cerebral é mais raro e parece ser mais comum em crianças do que em adultos (CARRADA-BRAVO, 1989). A amebíase é mais freqüente nos primeiros anos de vida, diminuindo com a idade. No verão a incidência da doença é duas vezes maior que no inverno (GARCIA-MANZO *et al.*, 1997). Nos demais países a incidência da doença é menor e as manifestações clínicas menos severas.

A amebíase hepática é a forma mais freqüente da amebíase extra-intestinal, e segundo estudos realizados na Índia, 11,8% dos pacientes com a doença chegam a óbito (SHARMA *et al.*, 1997).

1.9.1 No Brasil

Vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados para se estimar a incidência e a prevalência da amebíase no Brasil utilizando diferentes metodologias para diagnóstico. Na maioria dos estudos, os métodos

parasitológicos das fezes são os mais utilizados, e portanto, a real estimativa da doença não pode ser determinada.

Segundo Cunha *et al.* (1991) a prevalência da protozoose é bastante variável (5,6% a 40%) nas diferentes regiões do país, assim como sua patogenicidade e virulência.

A forma disentérica da amebíase ocorre menos freqüentemente que a forma não disentérica (CUNHA, 1975). Entretanto, Feitosa (1986) encontrou freqüência relativamente alta de pacientes com esta sintomatologia no Hospital Universitário Getúlio Vargas de Manaus (AM).

Gonçalves *et al.* (1990) utilizando método de ELISA para diagnóstico sorológico da amebíase em residentes de uma área rural de Recife encontraram positividade em 7,2% da amostra.

Carvalho *et al.* (1991) investigando a prevalência de anticorpos anti-*E. histolytica* em 154 pacientes, provenientes de três diferentes regiões geográficas do Brasil, encontraram 16,9% de positividade na técnica de RIFI, considerada a mais sensível por estes pesquisadores.

Tachibana *et al.* (1992) analisando 47 isolados de Pernambuco utilizando RFLP não encontraram linhagens patogênicas de *E. histolytica*, demonstrando o predomínio de linhagens não patogênicas no nordeste do Brasil.

Braga *et al.* (1998) investigando a prevalência de anticorpos em residentes de favelas no nordeste do Brasil encontraram soropositividade de 10,6% para *E. histolytica*. Em estudo posterior, utilizando método imunoenzimático, Braga *et al.* (2001b) encontraram positividade de 14,9% para

E. histolytica e 25,4% para *E. histolytica* /*E. dispar*, demonstrando a presença das duas espécies nesta população.

Alves *et al.* (2003), utilizando métodos coproscópicos, encontraram positividade de 6,8% para *E. histolytica*/*E. dispar* em uma cidade do sudeste do Piauí.

1.9.2 Na Região Amazônica

Na Amazônia, as precárias condições sociais e econômicas bem como a falta de saneamento básico na maioria das localidades desta região despertou o interesse de vários grupos de pesquisa acerca da prevalência das diversas enteroparasitoses e vários inquéritos epidemiológicos têm sido realizados durante décadas. Segundo Feitosa (1986) a alta frequência de colite disentérica e abscesso hepático amebiano na região Amazônica está relacionada aos tipos de cepas de *E. histolytica* presentes nesta região, o que demonstra que estas se apresentam de forma mais patogênica e virulenta do que em outras localidades do Brasil.

Costa *et al.* (1955) investigaram 6 municípios da zona Bragantina (PA) onde encontraram prevalência de 15,1% de *E. histolytica*. Enquanto que Azevedo & Maroja (1956) observaram prevalência de 12,1% nos municípios de Soure e Ponta de Pedras (PA).

Rodrigues Filho *et al.* (1963) relataram 32 (2,97%) casos de colite amebiana e 6 (0,55%) de amebíase hepática entre 1.075 necrópsias de pacientes atendidos no Departamento de Anatomia e Fisiologia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade do Pará.

Na cidade de Macapá (AP), Nohmi (1974) relatou prevalência de 13,8% de amebíase baseado em estudos coproscópicos.

Em Manaus (Am), Feitosa (1986) encontrou frequência de 7,4% de *E. histolytica* em amostras de fezes. Neste estudo, houve predominância de formas sintomáticas (65,22%) das quais 26,7% estavam na forma de disenteria amebiana. Esta pesquisadora também relatou 14 casos de amebíase hepática em 20 pacientes diagnosticados apenas como portadores de abscesso hepático durante um período de 12 meses. Nesta mesma cidade, Silva *et al.* (1988) relataram 1 caso de necrose hepática entre 9 crianças com diagnóstico de abscesso hepático. Posteriormente, Dantas *et al.* (1999) encontraram 56% de positividade para amebíase intestinal entre estudantes e funcionários de uma escola pública utilizando método parasitológico.

Araújo *et al.* (1988), ao analisarem 2.330 necrópsias de pacientes atendidos no Centro de Ciências Sociais e da Saúde da Universidade Federal do Pará, encontraram alterações características de amebíase intestinal em 34, as quais foram mais comuns na faixa etária de 21-40 anos com predomínio do sexo masculino.

Nozaki *et al.* (1990) encontraram zimodema do tipo XIX (patogênico) com prevalência de 9,3% em amostras de crianças da região Amazônica (Manaus e Belém) e do Nordeste (Recife e São Luis) do Brasil.

Pardal *et al.* (1991) relataram 16 casos de abscesso amebiano no fígado, no período de abril/1989 a setembro/1990, no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará, em Belém. Nesta mesma cidade, Santos (1993) encontrou 25,8% da forma invasora da amebíase.

Martinez (1993) estudando 16 isolados da região Amazônica, procedentes de Manaus, identificou os zimodemas II e XIX, ambos patogênicos (*E. histolytica*), em 2 isolados. Os demais foram caracterizados como não patogênicos.

Neste mesmo ano, Ferraz & Bezerra (1993), utilizando métodos coproscópicos, encontraram 17,2% de positividade para *E. histolytica* em 524 crianças de uma escola pública da periferia de Belém.

Martins & Menezes (1994) detectaram parasitismo por *E. histolytica* em 84,0% dos indígenas da aldeia Parakanã no Estado do Pará. Posteriormente, Miranda *et al.* (1998) obtiveram positividade de 65,1% para *E. histolytica* neste mesmo grupo indígena em estudo realizado em 1992. O parasito foi considerado o mais prevalente nesta população.

Martinez *et al.* (1996) analisando o perfil das isoenzimas HE, PGM, GPI e ME de 33 isolados da região Amazônica e Sudeste do Brasil descreveram a presença dos zimodemas patogênicos II e XIX.

Silva *et al.* (1999), pesquisando anticorpos séricos contra *E. histolytica*, encontraram positividade de 6% em uma amostra da população de Belém (PA), o que mostra a presença de amebíase com potencial invasivo. Na mesma cidade, a pesquisa de coproantígenos de *E. histolytica*, realizada por Machado *et al.* (1999) observaram frequência de 18,5% e 23,2% em amostras de adultos e crianças, respectivamente. Posteriormente, Póvoa *et al.* (2000) encontraram positividade de 28,99% na mesma população.

Diversos estudos têm sido realizados, porém a grande variedade de técnicas utilizadas prejudica a estimativa da doença no Brasil.

1.10 JUSTIFICATIVA

Embora diversos estudos tenham sido realizados, a amebíase ainda constitui importante problema de saúde pública mundial, visto que é responsável por cerca de 100.000 óbitos por ano, perdendo apenas para a malária em índice de mortalidade entre as doenças causadas por protozoários (WHO/PAHO/UNESCO, 1997).

Apesar da importância médica da amebíase, houve considerável perda sobre o conhecimento epidemiológico da doença desde que *E. dispar*, espécie morfológicamente semelhante, porém não patogênica, foi aceita como espécie diferente de *E. histolytica* (WHO/PAHO/UNESCO, 1997). No Brasil, os poucos estudos realizados utilizando técnicas mais sensíveis na diferenciação das duas espécies demonstra que as freqüências variam entre as localidades estudadas, podendo haver maior ou menor freqüência de *E. histolytica* em relação a *E. dispar* (NOZAKI *et al.*, 1990; TACHIBANA *et al.*, 1992; ACA *et al.*, 1994; BRAGA *et al.* 1998; 2001b; PINHEIRO *et al.*, 2004).

Em áreas endêmicas do mundo, a *E. histolytica* é comumente relacionada a quadros de diarreia e disenteria (ABD-ALA & RAVDIN, 2002; HAQUE *et al.*, 2003), porém alguns estudos demonstram persistência do parasito por vários meses sem desenvolvimento de doença (BLESSMANN *et al.*, 2003). No Brasil, o comportamento patogênico da *E. histolytica* também é variável. A amebíase invasiva mostrou-se mais freqüente nas cidades de Manaus/AM, Belém/PA, João Pessoa/PB e Porto Alegre/RS (REY, 1991), porém indivíduos assintomáticos, com *E. histolytica* confirmada em método

imunoenzimático, foram relatados por Braga *et al.* (1998, 2001b) em residentes de uma área endêmica do Ceará.

No Pará, vários casos de formas invasivas, inclusive amebíase hepática, têm sido relatados há décadas (RODRIGUES-FILHO *et al.*, 1963; CHAVES, 1987; SILVA *et al.*, 1988; SALLES *et al.*, 2003). O que demonstra a presença de cepas com potencial patogênico em nossa região.

Diferenças genéticas entre *E. histolytica* e *E. dispar* parecem ser o ponto principal da interação parasito-hospedeiro e a caracterização de novas regiões gênicas são alvo de muitas pesquisas. Os isolados podem ser genotipados por meio das técnicas de RAPD (MACKENSTEDT & JOHNSON, 1995; VALLE *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2000), da caracterização molecular de STR's (ZAKI & CLARK, 2001; ZAKI *et al.*, 2002; HAGHIGHI *et al.*, 2002; ZAKI *et al.*, 2003; HAGHIGHI *et al.*, 2003), e dos genes para a proteína rica em serina (SREHP) e para a quitinase (HAGHIGHI *et al.*, 2002; 2003).

Com base nos dados acima, este estudo foi proposto visando contribuir com os dados epidemiológicos da amebíase no Brasil, utilizando técnicas mais sensíveis e específicas para diagnóstico e nova abordagem molecular, bem como analisar a relação parasito-hospedeiro em amostras da região Amazônica.

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 Objetivos Gerais

Realizar estudo epidemiológico dos protozoários *E. histolytica* e *E. dispar* em indivíduos residentes em Belém e interior do estado do Pará utilizando diferentes metodologias para diagnóstico;

1.11.2 Objetivos Específicos

- Investigar a frequência da amebíase na amostra estudada utilizando métodos parasitológicos e imunoenzimático (ELISA);
- Isolar cepas xênicas de *E. histolytica* e *E. dispar* em meio Pavlova;
- Caracterizar os isolados por meio da análise bioquímica e molecular;
- Caracterizar os polimorfismos genéticos no *locus* 1-2 de *E. histolytica* e *E. dispar*;
- Comparar os polimorfismos das cepas locais com aqueles observados em isolados de outras regiões do Brasil;
- Relacionar a presença de *E. histolytica* e/ou os polimorfismos genéticos com a patogenicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A demanda espontânea foi composta por pacientes que apresentavam sinais ou sintomas sugestivos de enteroparasitoses e aqueles encaminhados ao Laboratório de Enteroparasitoses pelos diferentes setores do Instituto Evandro Chagas/SVS para diagnóstico complementar. Participaram também pacientes com suspeita de amebíase hepática que haviam recebido atendimento médico no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB).

A amostra foi composta por 845 pacientes que forneceram material fecal, dos quais 191 foram questionados quanto à presença de sintomas sugestivos de amebíase intestinal (diarréia/disenteria, cólicas abdominais, constipação intestinal, vômitos e náuseas).

Para diagnóstico clínico de amebíase hepática, o médico atendente do HUJBB levou em consideração a tríade dor no hipocôndrio direito, hepatomegalia e febre e o resultado do exame da tomografia computadorizada. Amostras de exsudato foram coletadas de oito pacientes.

Os participantes deste estudo pertenciam a diferentes faixas etárias e sexo e residiam na área metropolitana de Belém ou interior do Estado do Pará.

2.2 ASPECTOS ÉTICOS

Após explicação detalhada sobre o conteúdo e objetivos do trabalho, e se aceitar participar do estudo voluntariamente, um termo de

consentimento foi assinado pelo participante e/ou seu responsável e preenchida uma ficha individual com dados pessoais e relativos à infecção (Anexos 1 e 2).

O presente projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (IEC/CEP-nº 06/2000) do Instituto Evandro Chagas.

2.3 COLETA E ANÁLISE PARASITOLÓGICA DAS FEZES

O estudo foi conduzido no período de janeiro/2000 a fevereiro/2005.

Os participantes forneceram material fecal acondicionado em frasco coletor, devidamente identificado, e entregue no Laboratório de Enteroparasitoses do IEC para diagnóstico. No mesmo dia da coleta as amostras foram analisadas sob microscopia de luz, utilizando-se os métodos direto (salina/Lugol), sedimentação espontânea e de Faust e colaboradores. Uma alíquota do material fecal foi destinada a isolamento em meio de cultura Pavlova e o restante guardado à - 4°C para posterior análise por ensaio imunoenzimático (ELISA).

A análise parasitológica das fezes obedeceu aos seguintes procedimentos:

2.3.1 Método Direto

Cerca de 1 g do material fecal foi misturada a uma gota de solução salina em uma lâmina e sobre esta solução pôs-se a lamínula. Este mesmo

procedimento foi feito utilizando solução de Lugol. O material foi observado sob microscopia de luz utilizando objetivas de 10X e 40X.

2.3.2 Sedimentação Espontânea

Foi feita uma mistura utilizando uma pequena porção do material fecal e cerca de 2 mL de água destilada e posteriormente filtrada em gaze para um cálice de sedimentação. Deixou-se o material sedimentar por cerca de 1 hora, após a qual o líquido sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. O sedimento foi novamente ressuspenso em 10 mL de água destilada. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Após a última lavagem, transferiu-se 1 gota do sedimento para uma lâmina seguida de coloração pelo Lugol. A amostra foi analisada sob microscopia de luz utilizando objetivas de 10X e 40X.

2.3.3 Faust e Colaboradores

Foi feita uma suspensão utilizando 1 g de fezes e 10 mL de água destilada. O material foi centrifugado e o sobrenadante desprezado. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes, ao final do qual foi adicionado sulfato de zinco à 33%. A mistura foi centrifugada e a película formada sobre a superfície foi transferida para uma lâmina e corada com Lugol. A amostra foi analisada sob microscopia de luz utilizando objetivas de 10X e 40X.

2.4 COLETA E ANÁLISE PARASITOLÓGICA DOS EXSUDATOS

Oito amostras de exsudatos de abscessos hepáticos foram

obtidas por drenagem a partir de pacientes com suspeita de amebíase hepática, realizada por médico do HUUJBB.

Os espécimes foram acondicionados em frascos estéreis devidamente identificados e em seguida levados ao Laboratório de Enteroparasitoses do IEC para análise à fresco entre lâmina e lamínula. Uma pequena alíquota (5 gotas) do exsudato foi submetida a isolamento em meio de cultura Pavlova e o restante acondicionado em frascos e congelados a - 4°C para posterior análise por método imunoenzimático e caracterização molecular.

2.5 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA DETECÇÃO DE *ENTAMOEBIA HISTOLYTICA*

O kit ELISA utilizado neste estudo (*E. histolytica* Test. TechLab, Inc. Blacksburg, VA) foi desenvolvido para rápida detecção da infecção por *E. histolytica* em amostras fecais utilizando anticorpos monoclonais (AcMo). O teste baseia-se na detecção da adesina (lectina ligadora de GAL/GALNAc), presente na membrana do parasito e que promove a ligação dos trofozoítos às células da mucosa intestinal. Este teste, quando comparado aos resultados de cultura/zimodemo, revelou sensibilidade e especificidade de 96,9% e 100%, respectivamente (dados do fabricante).

2.5.1 Procedimentos no Método ELISA

Fez-se uma diluição utilizando uma pequena quantidade das fezes e 400 µL de solução diluente (contida no kit de ELISA). Para fezes formadas foi utilizado um *swab* enquanto que para fezes diarréicas 400 µL da

própria amostra. Transferiu-se 200 µL desta solução para placas sensibilizadas com anticorpos policlonais (AcPo). Adicionou-se uma gota do conjugado (AcMo conjugado a adesina) em cada cavidade da placa de ELISA seguida da incubação da placa a temperatura ambiente por 2 horas.

A revelação foi feita com a adição do substrato enzimático (tetrametilbenzidina). A positividade foi determinada pelo aparecimento de cor e confirmada por leitura em Espectrofotômetro (Titerteck Multiskan ®Plus MK II) com filtro de luz de 450 nm, sendo consideradas positivas as amostras com DO inferior a 0,50 após subtração do controle negativo.

2.6 PLANTIO E ISOLAMENTO DE AMOSTRAS COM *E. histolytica* e/ou *E. dispar* EM MEIO XÊNICO

As amostras de fezes, contendo cistos e/ou trofozoítos, e exsudatos foram cultivadas à 37°C em tubos de ensaio contendo meio de Pavlova (Anexo 3), pH 7,2-7,4, modificado por Silva (1972), para isolamento de *E. histolytica* e/ou *E. dispar* e de bactérias da flora intestinal. O plantio e o isolamento foram realizados sob condições de esterilidade.

2.6.1 Procedimentos para o Isolamento a partir de Fezes Formadas ou Pastosas Contendo apenas Cistos

As amostras fecais foram submetidas à sedimentação espontânea em cálice usando filtro de gaze descartável e água destilada estéril. Deixou-se o material sedimentar por aproximadamente 2 horas. O líquido sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o sedimento ressuspensão novamente em

água destilada. Este procedimento foi repetido por mais 2 vezes. Após a última lavagem, transferiu-se 1 mL do sedimento para um tubo contendo 5 mL de meio Pavlova, sob condições de esterilidade. A cultura foi incubada à 37°C.

Cerca de 24 horas após o plantio, 1 gota do sedimento era analisada a fresco sob microscopia de luz utilizando-se objetiva de 40X. Quando trofozoítas eram observados em cultura, transferia-se 1 - 3 gotas do sedimento para um novo meio de cultura, sob condições de esterilidade e incubava-se a 37°C. Amostras que não apresentavam trofozoítas eram novamente incubadas a 37°C e observadas diariamente até desencistamento. Caso não desencistassem até 5 dias após plantio, as culturas eram desprezadas.

2.6.2 Procedimentos para o Isolamento a partir de Fezes Liquefeitas Contendo Cistos e/ou Trofozoítas e de Exsudatos de Abscesso Hepático Amebiano

Cerca de 1 mL do material fecal/exsudato foi semeado diretamente em um tubo contendo 5 mL de meio Pavlova. O plantio foi realizado imediatamente ou até aproximadamente 1 hora após a coleta do material. A cultura foi incubada à 37°C e a observação do crescimento de trofozoítas foi realizada a cada 24 horas, como descrito anteriormente.

2.6.3 Manutenção dos Isolados

Após obtenção dos trofozoítas (por desencistamento ou por plantio direto) foram realizados repiques a cada 48 ou 72 horas sob condições

de esterilidade, transferindo-se uma gota do sedimento para um novo tubo contendo meio de cultura e procedendo-se a leitura do material à fresco sob microscopia de luz.

2.7 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

A caracterização da enzima HE foi realizada segundo a técnica de Jackson & Suparsad (1997) e consiste na conversão da α -D-glicose a α -D-glicose-6 fosfato mediada pela enzima HE, e posterior revelação na presença de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP), metil tiazolil tetrazólico (MTT) e fenazina metosulfato (PMS). O padrão de migração da enzima na eletroforese foi utilizado para caracterização de isolados de *E. histolytica* e *E. dispar*.

2.7.1 Obtenção do Extrato Enzimático

Para obtenção da massa de amebas, selecionou-se isolados xênicos com bom desenvolvimento de trofozoítos e transferiu-se para garrafas de cultura contendo 75 mL de meio Pavlova. As culturas foram incubadas a 37°C durante 48 h.

Os cultivos foram submetidos a banho de gelo por 5 min e então centrifugados a 350 g por 15 min a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o sedimento contendo as amebas foi lavado 3 vezes com solução salina estéril para retirar o excesso de bactérias e de meio. O sedimento restante foi então acondicionado em tubo *ependorf* e congelados a -20°C.

A obtenção dos extratos enzimáticos foi feita a partir da massa de amebas mantidas a -20°C . Os tubos foram descongelados a temperatura ambiente e as amebas submetidas a lise osmótica a partir da adição de $50\ \mu\text{L}$ do estabilizador enzimático (Anexo 4). O lisado foi centrifugado a $15.000\ \text{g}$ por $60\ \text{min}$ a 4°C . O extrato enzimático (sobrenadante) foi congelado sob a forma de pérolas de $10\ \mu\text{L}$ e armazenado em nitrogênio líquido à -196°C .

2.7.2 Eletroforese

Os extratos enzimáticos foram submetidos à eletroforese horizontal em camada fina de gel de amido a baixa temperatura. Para preparo do gel utilizou-se $5,4\ \text{g}$ de amido misturado a $50\ \text{mL}$ de tampão peptidase pH $8,6$ previamente diluído na proporção $1:10$ (Anexo 5). A suspensão de amido foi aquecida e homogeneizada até completa diluição dos grãos. Com auxílio de uma bomba de vácuo, retirou-se as bolhas de ar, e espalhou-se o gel rapidamente sobre uma placa de vidro medindo $12\ \text{cm} \times 10\ \text{cm}$. Deixou-se o gel solidificar a temperatura ambiente por cerca de 10 minutos. As placas foram então refrigeradas em geladeira por cerca de $20\ \text{min}$, antes da aplicação dos lisados.

As pérolas que estavam no nitrogênio líquido foram descongeladas e mantidas em banho de gelo até aplicação. Para aplicação da amostra no gel utilizou-se pequenos pedaços de linhas branca de algodão com cerca de $0,5\ \text{cm}$ de comprimento. Com auxílio de uma pinça, a linha foi umedecida no extrato enzimático e colocada sobre o ponto de aplicação no gel. O gel foi mantido a temperatura ambiente por cerca de $10\ \text{min}$ para completa

absorção dos lisados. A placa com o gel foi montada sobre a cuba eletroforética, cujos extremos foram contactados com os pólos negativo e positivo. A migração foi feita sob refrigeração a 200 V durante 2 horas utilizando tampão peptidase pH 8,6 como tampão de corrida.

2.7.3 Revelação do Gel

A revelação foi realizada a partir de duas soluções. Inicialmente preparou-se uma solução composta por 3 mL Tris/HCl, 1 mL de NADP (10mg/mL), 2 mL de MgCl₂, 50 µL de G6PD, 25 mg de ATP, 10 mg de glicose, 2 ml de MTT (2mg/mL), 2 mL de PMS (1mg/mL) e 10 mL de H₂O destilada em um Becker de 100 mL. Uma segunda solução foi preparada em um frasco elenmeyer contendo 180 mg de ágar a 10 mL de água destilada, a qual foi aquecida até completa diluição dos grãos. Após resfriamento (até cerca de 60°C), esta solução foi então misturada a inicial, e imediatamente, despejada sobre o gel de amido.

Deixou-se a solução reveladora solidificar a temperatura ambiente por 10 minutos, e posteriormente fez-se a incubação do gel à 37°C por 30 a 60 minutos até o aparecimento das bandas. O gel foi fotografado sob luz branca.

Para leitura utilizou-se o padrão de migração das bandas segundo Sargeant *et al.*, (1980b). Foram consideradas *E. histolytica* amostras com duas bandas de migração rápida no gel, e como *E. dispar* aquelas que apresentaram duas bandas lentas.

2.8 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

2.8.1 Extração do DNA

O DNA do parasito foi extraído a partir de cultivos xênicos e exsudatos utilizando-se kit comercial (QIAamp® DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Kit Handbook - Qiagen) que utiliza sistema de coluna para purificação do DNA. As amostras foram processadas de acordo com as informações do protocolo dos fabricantes.

2.8.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Identificação de Espécie

A PCR utilizada neste estudo foi uma modificação (M. A. Gomes, UFMG) da técnica descrita por Blessmann *et al.* (2002) para uma PCR em tempo real aplicado a amostras fecais. A temperatura de hibridização foi adaptada para 56°C ao invés de 58°C e o número de ciclos reduzido para 30.

A seqüência-alvo estudada foi uma seqüência de 310 pb presente no epissomo que contém o DNAr. Na PCR foram utilizados três iniciadores (Invitrogen) (BLESSMANN *et al.*, 2002): um específico para *E. histolytica* (Eh-S26C), um para *E. dispar* (Ed-27C) e um (Eh/Ed-AS25) compartilhado por ambas espécies e utilizado junto com cada iniciador específico durante a PCR (Tabela 1). As amostras de DNA foram testadas de modo independente para cada par de iniciador.

A reação de amplificação foi composta por: tampão Tris-HCl 10 mM pH 9,0, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de dNTPs, 5 pmoles de cada iniciador, 0,1 U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 20 ng de DNA e água Milli-Q q.s.p.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na amplificação do fragmento de 310 pb do DNAr epissomal de *E. histolytica* e *E. dispar* (BLESSMANN *et al.*, 2002).

Oligonucleotídios	Sequência
Eh-S26C	5'-GTA CAA AAT GGC CAA TTC ATT CAA CG-3'
Eh/Ed-AS25	5'-GAA TTG ATT TTA CTC AAC TCT AGA G-3'
Ed-27C	5'-GTA CAA AGT GGC CAA TTT ATG TAA GCA-3'

estéril para um volume final de 10 μ L. Essa mistura foi submetida a 30 ciclos de amplificação com as seguintes temperaturas e tempo: 1) desnaturação = 94°C por 1 minuto, 2) hibridização = 55°C por 1 minuto e 30 segundos e 3) extensão = 72°C por 2 minutos, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 5%, obedecendo as seguintes proporções dos reagentes (anexo 7):

- Solução de acrilamida/bisacrilamida 29:1 = 4 m L
- Tampão TBE 50X = 600 μ L
- Persulfato de amônio a 10% = 250 μ L
- TEMED = 20 μ L
- Água q.s.p. = 30 mL

Após aplicação das amostras, o gel foi submetido à eletroforese vertical por cerca de 2 h a 100 V imerso em tampão TBE 1X. Decorrido este tempo, o gel foi fixado em solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5% por

3 minutos e em seguida corado com solução de nitrato de prata a 10% por 7 minutos. O gel foi lavado com água destilada por 3 vezes. A revelação foi feita com NaOH a 3% e 0,3% de formaldeído. Após aparecimento das bandas, a solução de revelação foi desprezada e o gel transferido para a solução fixadora para interrupção da reação, secado e fotografado. Um marcador molecular de 100 pb (Promega) foi utilizado como controle do tamanho dos fragmentos amplificados.

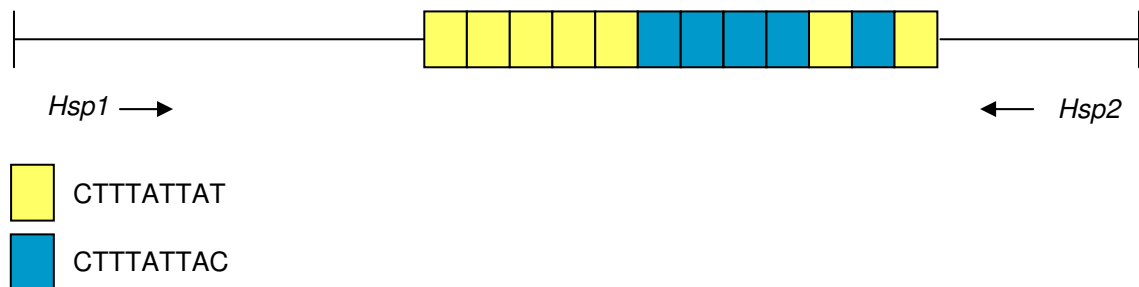
2.8.3 Genotipagem dos Isolados

Para genotipagem dos isolados foi investigada a variabilidade no número de repetições STR's para o *locus* 1-2. Segundo CG Clark (comunicação pessoal) as seqüências STR's analisadas estão flanqueadas por genes para RNAt. Na PCR foram utilizados os pares de iniciadores descritos por Zaki *et al.* (2002) (Tabela 2).

Tabela 2 - Iniciadores para seqüências STR's no *locus* 1-2 de *E. histolytica* e *E. dispar* (ZAKI *et al.*, 2002).

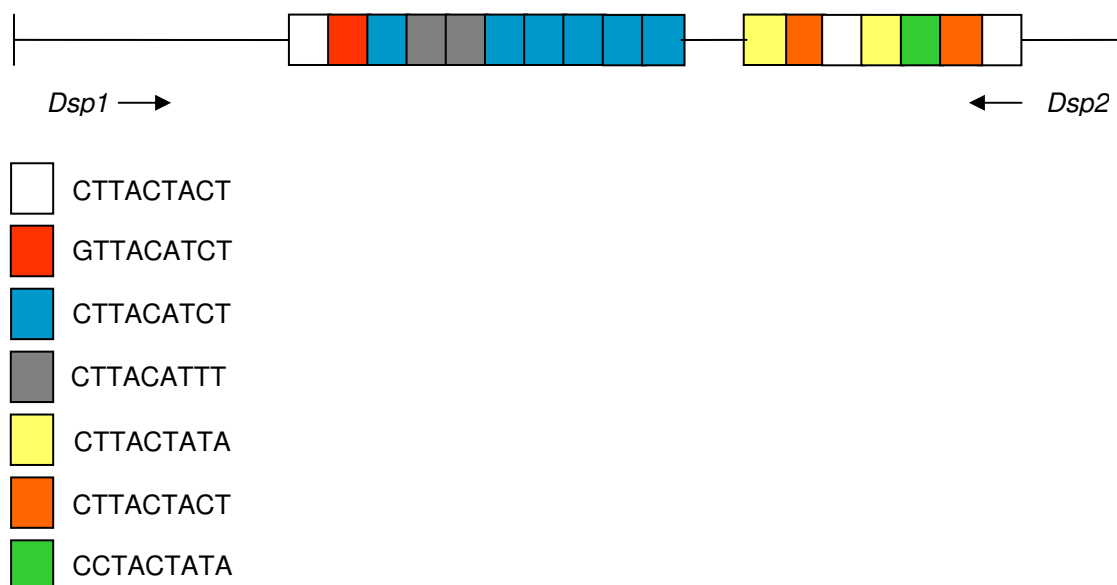
Oligonucleotídios	Seqüência
<i>Hsp1</i>	5' GAG TTC TCT TTT TAT ACT TTT ATA TGT T 3'
<i>Hsp2</i>	5' ATT AAC AAT AAA GAG GGA GGT 3'
<i>Dsp1</i>	5' TTG AAG AGT TCA CTT TTT ATA CTA TA 3'
<i>Dsp2</i>	5' TAA CAA TAA AGG GGA GGG 3'

O *locus* 1-2 de *E. histolytica* foi clonado a partir da cepa mexicana HM1-IMSS e possui um comprimento de 402 pb, contendo internamente um bloco de nucleotídeos com dois arranjos de repetições *em tandem* (ZAKI & CLARK, 2001) (Figura 6). O *locus* de *E. dispar*, clonado a partir da cepa inglesa SAW760 possui um comprimento de 495 pb, apresentando dois blocos internos de nucleotídeos com sete diferentes tipos de repetições *em tandem* (ZAKI *et al.*, 2002) (Figura 7). Nas duas espécies este *locus* encontra-se no genoma como múltiplas cópias. A PCR do *locus* 1-2 utilizando os iniciadores *Hsp1/Hsp2* e *Dsp1/Dsp2* produz fragmentos de 350 pb para HM1-IMSS e 430 pb para SAW760 (*E. dispar*) (ZAKI *et al.*, 2002).



Fonte: Zaki *et al.* (2002).

Figura 6 - Representação esquemática do *locus* 1-2 da linhagem HM1-IMSS mostrando as duas unidades de repetição e as regiões de hibridização dos iniciadores *Hsp1* e *Hsp2*.



Fonte: Zaki *et al.* (2002).

Figura 7 - Representação esquemática do *locus* 1-2 da linhagem SAW760 mostrando as sete unidades de repetição e as regiões de hibridização dos iniciadores *Dsp1* e *Dsp2*.

As amostras de DNA foram testadas de modo independente para cada par de iniciador e comparadas aos resultados da PCR para identificação de espécie. Foram também genotipados 11 isolados procedentes de outras regiões do Brasil (3 de Manaus e 8 de Belo Horizonte) e 2 da Colômbia fornecidos pelo Laboratório de Amebíase da Universidade Federal de Minas Gerais. A cepa mexicana HM1-IMSS (axênica), *E. histolytica*, foi utilizada como controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização dos isolados fornecidos pelo Laboratório de Amebíase/ICB/UFMG utilizadas na genotipagem do *locus* 1-2 de *E. histolytica* e *E. dispar*.

Amostra	Procedência	Clínica	Cultivo	Espécie
HM1-IMSS	México	CD*	Axênico	<i>E. histolytica</i>
DRP	Manaus/AM	Ameboma	Xênico	<i>E. histolytica</i>
JCAOR9	Manaus/AM	CND**	Xênico	<i>E. dispar</i>
EGG	Belo Horizonte/MG	CD/AH***	Moxênico	<i>E. histolytica</i>
452	Belo Horizonte/MG	CND	Axênico	<i>E. histolytica</i>
462	Belo Horizonte/MG	CND	Axênico	<i>E. histolytica</i>
ADO	Belo Horizonte/MG	CND	Xênico	<i>E. dispar</i>
CSPr	Belo Horizonte/MG	CD	Axênico	<i>E. histolytica</i>
JC	Belo Horizonte/MG	Assintom.	Xênico	<i>E. dispar</i>
ANSL	Belo Horizonte/MG	Assintom.	Xênico	<i>E. dispar</i>
VEJ	Belo Horizonte/MG	CND	Xênico	<i>E. dispar</i>
JPPC	Belo Horizonte/MG	Assintom.	Xênico	<i>E. dispar</i>
ICS	Colômbia	CD	Xênico	<i>E. dispar</i>
C6	Colômbia	CD	Xênico	<i>E. histolytica</i>

*CD: colite disentérica

**CND: colite não disentérica

***AH: amebíase hepática

A reação de amplificação do DNA foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por C. G. Clark no Department of Infectious and

Tropical Diseases.London School of Hygiene and Tropical Medicine (comunicação pessoal). Cada 50 μ L da mistura para reação foi composta por 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 μ M de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 2,0 μ M de cada iniciador. A mistura foi submetida a 30 ciclos de amplificação com as seguintes temperaturas e tempo: 1) desnaturação = 94°C por 1 minuto, 2) hibridização = 50°C por 1 minuto e 30 segundos e 3) extensão = 72°C por 2 minutos e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 minutos.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,8% por cerca de 1 hora a 100 V, em tampão Tris-EDTA-Ácido Bórico (1 X). Os resultados foram visualizados em transiluminador UV após coloração com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos foram comparados a um marcador molecular de 100 pb (Promega).

2.9 ANÁLISE DOS DADOS

A frequência da infecção por *E. histolytica* nos métodos coroscópicos e imunoenzimático foi obtida por contagem direta, e a significância estatística calculada pelo teste do Qui-Quadrado (χ^2) adotando nível de significância de 5%.

A relação entre os resultados observados nos testes utilizados e a presença de sintomas sugestivos de amebíase intestinal foi analisada estatisticamente pelo programa BioEstat versão 2.0 (AYRES *et al.*, 2000) utilizando-se o teste *Odds Ratio* (Razão de Chances) e intervalo de confiança de 95%.

A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos positivo e negativo do método coproscópico em relação ao ELISA foram calculados pelo mesmo programa utilizando-se o *Screening Test* como teste estatístico.

3 RESULTADOS

3.1 AMOSTRA DE FEZES

A amostra foi composta por 845 indivíduos que coletaram amostras fecais, das quais 495 correspondiam a pacientes pertencentes a faixa etária de 0 - 14 anos (grupo 1) e 350 acima de 14 anos (grupo 2).

3.2 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO E IMUNOLÓGICO

As 845 amostras foram testadas usando o kit ELISA e parte destas (334) também foram analisadas quanto à presença de protozoários e helmintos a partir do uso de métodos parasitológicos de fezes.

Foi encontrada infecção por *E. histolytica*/*E. dispar* em 84/334(25,15%), das quais 17 pertenciam a pacientes do grupo 1 e 67 do grupo 2, sendo este o parasito mais prevalente nos dois grupos etários.

Utilizando-se o kit para detecção de antígenos de *E. histolytica*, obteve-se positividade em 248 das 845 amostras testadas, representando um percentual de 29,35%. A presença da infecção por *E. histolytica* foi maior no grupo 2 (30,36%) que no grupo 1 (28,28%), porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

3.2.1 Nível de Concordância dos Testes Coproscópicos e de ELISA

Quando comparamos os resultados das 334 amostras analisadas por ambos os métodos (ELISA e coproscópicos), 83 (24,85%) foram discordantes quanto aos resultados tendo ocorrido maior número de positivos

no teste imunoenzimático. Do total de amostras testadas, 43 foram positivas no método ELISA e coproscópico (E+C+), 52 E+C-, 31 E-C+ e 208 E-C- (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados dos testes coproscópicos e ELISA (*E. histolytica* Test. TechLab, Inc. Blacksburg, VA) em 334 amostras testadas.

COPROSCÓPICO	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo*	43	31	74
Negativo	52	208	260
Total	95	239	334

**E. histolytica*/*E. dispar*

A discordância entre os métodos foi testada estatisticamente, obtendo-se um resultado significativo com $\chi^2 = 4,82$ ($p < 0,05$).

A sensibilidade e a especificidade do coproscópico quando comparadas ao teste ELISA foram 45,26% e 87,03%, respectivamente. O valor preditivo do teste positivo foi 58,11% e do teste negativo foi 80%.

3.2.2 Relação Quadro Clínico e Resultado do Teste Imunoenzimático

Do total da amostra, apenas foi possível a obtenção de dados clínicos em 191 pacientes, os quais foram questionados quanto à presença de diarreia, cólica abdominal, constipação intestinal, náuseas e vômito. Destes, 64

(33,51%) relataram um ou mais dos sintomas acima e 127 (66,49%) foram considerados assintomáticos (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre os resultados do ELISA e a presença ou não de sintomas sugestivos de amebíase intestinal invasiva entre 191 pacientes entrevistados.

Resultado do teste de ELISA	Quadro Clínico		Total
	Sintomáticos*	Assintomáticos	
ELISA +	34 (53,12%)	26 (20,47%)	60
ELISA -	30 (46,88%)	101 (79,53%)	131
Total	64 (100,00%)	127 (100,00%)	191

* presença de sintomas intestinais (diarréia, cólicas abdominais, constipação intestinal, náuseas e vômitos)

Odds Ratio 4,4026 ($p = 0,0000$; IC 95% = 2,2907 - 8,4614)

Do total de pacientes sintomáticos ($n = 64$), 53,12% (34/64) apresentaram positividade no teste de ELISA e 46,88% (30/64) foram negativos. Entre os assintomáticos, a positividade foi menor (20,47%; 26/127) (Tabela 5).

A análise estatística resultou em um *Odds Ratio* de 4,4026 ($p = 0,0000$; IC 95% = 2,2907 - 8,4614), que mostra relação altamente significativa entre a presença do parasito e os sintomas clínicos.

Diarréia e cólicas intestinais foram os sintomas mais freqüentemente associados à presença de *E. histolytica*, sendo relatados por 58,82% dos pacientes, seguida da constipação intestinal (20,59%), náuseas (17,66%) e vômito (8,82%).

3.3 AMOSTRA DE EXSUDATOS

Os exsudatos analisados foram obtidos de pacientes com suspeita de amebíase hepática atendidos por médico especializado do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Todos os pacientes receberam tratamento prévio com Metronidazol e Secnidazol 5 – 7 dias antes da coleta do exsudato.

Do total de pacientes, 7 eram do sexo masculino e 1 do feminino com idade entre 22 e 74 anos. Sete pacientes eram procedentes da região metropolitana de Belém e 1 do interior do Estado do Pará. Todos os pacientes relataram doença amebiana progressiva, dos quais 7 relataram amebíase intestinal invasiva e 1 amebíase hepática.

Os sintomas clínicos dor no hipocôndrio direito, hepatomegalia e febre foram relatados por todos os pacientes. Sintomas de diarréia (2), constipação intestinal (1), vômitos (1) e náuseas (1) também foram citados.

Nos métodos de imagem, 7 indivíduos, todos imunocompetentes, apresentaram um único abscesso, com tamanhos variando entre 10,3 cm x 7,5 cm a 13,5 x 9,2 cm e localizado no quadrante superior direito. Abscessos múltiplos foram observados em um paciente imunodeprimido (HIV positivo) e localizados nos lobos direito e esquerdo abrangendo uma área de 18 x 11 cm.

A análise microscópica dos exsudatos não revelou presença de trofozoítos, embora a pesquisa de antígenos pelo ELISA tenha sido positiva em 7 exsudatos, um dos quais proveniente do paciente imunodeprimido com múltiplos abscessos.

3.4 ISOLAMENTO

Noventa e oito (98) amostras fecais (70 positivas na microscopia) e todos os exsudatos foram semeados em meio de cultura Pavlova modificado, diretamente (fezes líquidas/exsudatos) ou após realização da sedimentação espontânea (fezes formadas ou pastosas).

O isolamento foi possível a partir de 39 (39,80%) amostras fecais, das quais 21 (53,85%) positivas e 18 (46,15%) negativas para *E. histolytica*/*E. dispar* no exame parasitológico de fezes. Nenhuma amostra de exsudato, todas microscopicamente negativas, forneceu isolamento em cultura.

Durante os repiques, apenas 22 isolados foram mantidos viáveis, e os demais perdidos devido a diversos fatores, tais como proliferação de *Blastocystis hominis*, crescimento excessivo de bactérias, contaminação com fungos e ciliados de vida livre e variações na temperatura de incubação.

O *B. hominis* foi determinante na perda dos isolados nas duas primeiras semanas do isolamento, devido ao crescimento excessivo. Após estabelecimento do cultivo (cerca de 14 dias após plantio), a resistência bacteriana aos antibióticos (estreptomicina e penicilina) utilizados no meio de cultura foi considerado o principal fator.

3.5 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Dos 22 isolados estabelecidos em cultura a caracterização bioquímica da enzima HE foi possível apenas em 13 amostras por não se conseguir massa de trofozoítos suficiente para obtenção dos extratos enzimáticos.

O parâmetro utilizado para classificação de espécie na eletroforese foi a presença de duas bandas rápidas para *E. histolytica* e de duas bandas lentas para *E. dispar* de acordo com Sargeant *et al.* (1980b) (Figura 8).

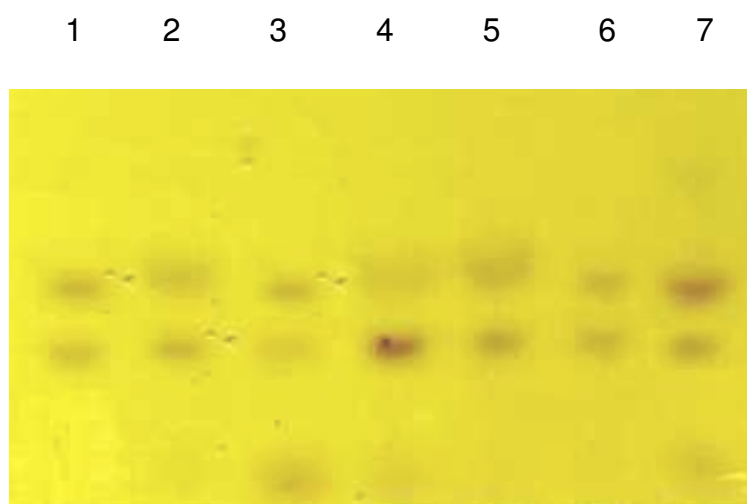


Figura 8 - Eletroforese horizontal em gel de amido para a isoenzima hexoquinase de *E. histolytica* e *E. dispar*. Duas bandas rápidas = *E. histolytica* e duas bandas lentas: *E. dispar*. 1: 10136 IEC (Ed); 2: 10661 SC (Eh); 3: 10925 IEC (Ed); 4: 10096 IEC (Eh); 5: 477 PMD (Eh); 6: 1215 PMD (Ed); 7: 1090 PMD (Ed).

Do total de isolados caracterizados pela HE, 7 (53,85%) foram identificados como *E. histolytica*, 5 dos quais eram provenientes de pacientes sintomáticos e 2 de assintomáticos. Seis (42,15%) cultivos foram *E. dispar*, 2 dos quais de pacientes assintomáticos, 3 de sintomáticos e 1 sem informação clínica (Tabela 6).

A comparação dos resultados da HE e ELISA foi possível em 12 isolados e discordâncias foram observadas em 4 (33,33%) amostras. Dois isolados (10074 IEC e 832 PMD) identificados como *E. histolytica* na HE tiveram resultado negativo no teste de ELISA, e 2 (10925 IEC e 1215 PMD) identificados como *E. dispar* foram positivos.

Não houve correlação entre a HE e a presença de doença ($p > 0,05$).

3.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

3.5.1 Identificação de Espécie

O DNA extraído dos 22 isolados em cultura e dos 8 exsudatos foram investigados quanto a caracterização de espécie. Apenas 16 cultivos e 5 exsudatos foram identificados, os demais não apresentaram produtos de amplificação nesta técnica.

Nove isolados (56,25%) amplificaram para ambos os pares de iniciadores, mostrando-se, portanto, como cepas mistas (*E. histolytica* e *E. dispar*). Três (18,75%) foram caracterizados como *E. histolytica* e 4 como *E. dispar* (25%) (Tabela 6. Figuras 9 e 10).

Tabela 6 - Resultados dos métodos microscópicos, imunoenzimático, HE e PCR dos isolados e exsudatos analisados.

Amostra	Procedência	Idade	Clínica	Microscopia	ELISA	HE**	PCR Eh/Ed
10661 SC	Belém/PA	---	Colite disentérica	Eh/Ed*	NF	<i>E. histolytica</i>	Mista
10136 IEC	Icoaraci/PA	20 a	--	Eh/Ed	Neg	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
10925 IEC	Belém/PA	7 a	Diarréia/cólicas/constipação	Eh/Ed	Pos	<i>E. dispar</i>	Mista
10891 IEC	Ananindeua/PA	20 a	--	Eh/Ed	Neg	--	<i>E. dispar</i>
10624 IEC	Portel/PA	16 a	Cólicas abdominais	Eh/Ed	Pos	<i>E. histolytica</i>	--
10121 IEC	Abaetetuba/PA	24 a	Cólicas/constipação	Eh/Ed	Neg	--	Mista
10096 IEC	Belém/PA	43 a	Colite disentérica	Eh/Ed	Pos	<i>E. histolytica</i>	--
10074 IEC	Belém/PA	39 a	Diarréia	Eh/Ed	Neg	<i>E. histolytica</i>	Mista
9912 IEC	Belém/PA	31 a	Assintomático	Eh/Ed	Pos	<i>E. histolytica</i>	--
1090 PMD	Belém/PA	21 a	Assintomático	Neg	Neg	<i>E. dispar</i>	--
1010 PMD	Belém/PA	44 a	Assintomático	Neg	Neg	--	Mista
1215 PMD	Belém/PA	12 a	Cólicas abdominais	Eh/Ed	Pos	<i>E. dispar</i>	<i>E. histolytica</i>
959 PMD	Belém/PA	12 a	Assintomático	Eh/Ed	Neg	--	<i>E. histolytica</i>
919 PMD	Belém/PA	8 a	Assintomático	Neg	Pos	--	<i>E. dispar</i>
918 PMD	Belém/PA	24 a	Assintomático	Eh/Ed	Pos	<i>E. histolytica</i>	
852 PMD	Belém/PA	50 a	Assintomático	Neg	Pos	--	<i>E. dispar</i>
832 PMD	Belém/PA	17 a	Assintomático	Neg	Neg	<i>E. histolytica</i>	Mista
753 PMD	Belém/PA	8 a	Assintomático	Eh/Ed	Neg	--	Mista

767 PMD	Belém/PA	25 a	Assintomático	Neg	Neg	--	<i>E. histolytica</i>
477 PMD	Belém/PA	46 a	Cólicas abdominais	Neg	Pos	<i>E. histolytica</i>	--
463 PMD	Belém/PA	10 a	Assintomático	Neg	Neg	<i>E. dispar</i>	Mista
252 PMD	Belém/PA	52 a	Assintomático	Neg	Pos	--	Mista
AHBB01	Abaetetuba/PA	36 a	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	<i>E. histolytica</i>
AHBB02	Belém/PA	22 a	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	<i>E. histolytica</i>
AHBB03	Icoaraci/PA	52 a	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	S,A.***
AHBB04	Icoaraci/PA	74 a	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	<i>E. histolytica</i>
AHBB05	Belém/PA	57 a	Abscesso hepático	Neg	Neg	--	S.A.***
AHBB06	Belém/PA	?	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	<i>E. histolytica</i>
AHBB07	Belém/PA	35 a	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	<i>E. histolytica</i>
AHBB08	Belém/PA	?	Abscesso hepático	Neg	Pos	--	S.A.***

*Eh/Ed: *E. histolytica*/*E. dispar*

**HE: hexoquinase

***S.A.: sem produto de amplificação.

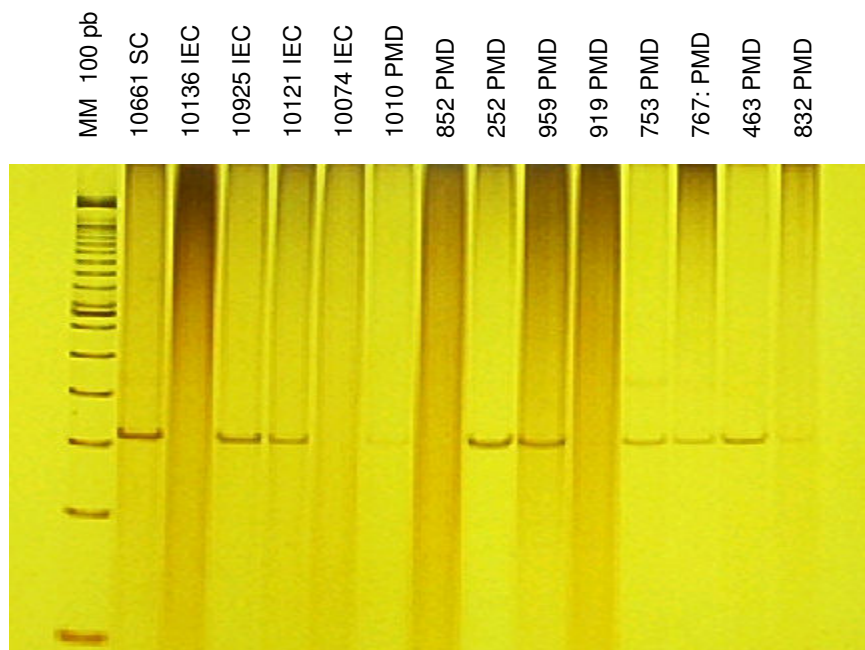


Figura 9 - Eletroforese vertical do produto da PCR para identificação de *E. histolytica*. MM: marcador molecular.

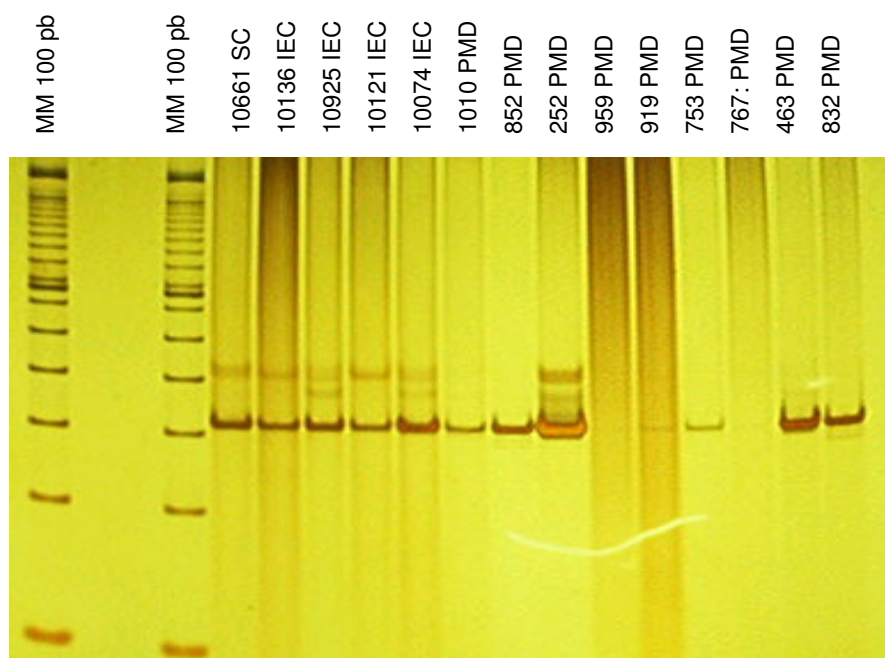


Figura 10 - Eletroforese vertical do produto da PCR para identificação de *E. dispar*. MM: marcador molecular.

Dos 8 exsudatos testados, 5 foram identificados como *E. histolytica*, todos os quais haviam sido positivos no teste ELISA. Três amostras (AHBB03, AHBB05 e AHBB08) não amplificaram, apesar de duas (AHBB03 e AHBB008) terem resultado positivo no imunoenzimático.

Oito amostras (5 mistas, 2 *E. histolytica* e 1 *E. dispar*) foram discordantes quanto aos resultados do ELISA e da PCR. Todavia, 6 das 7 amostras caracterizadas tanto pela hexoquinase quanto pela PCR foram concordantes. A amostra 1215 PMD foi discordante, sendo caracterizada como *E. dispar* na técnica bioquímica e como *E. histolytica* na PCR. Amostras que na PCR foram identificadas como mistas apresentaram padrão na bioquímica para apenas uma das espécies (Tabela 6).

O resultado da PCR teve maior correlação clínica que a técnica de ELISA e HE, tendo detectado infecção por *E. histolytica* em 11 (78,57%) dos 14 pacientes sintomáticos.

3.5.2 Genotipagem dos Isolados

Os DNAs das 22 culturas foram genotipados para o *locus* 1-2. Apenas 10 amostras de cultivo foram amplificadas para o *locus* de *E. dispar*, 7 das quais eram mistas (*E. histolytica*/*E. dispar*). Nenhuma cultura de *E. histolytica* amplificou para este *locus*.

A genotipagem dos 8 exsudatos mostrou produtos de amplificação em 6 amostras, um dos quais (AHBB08) não havia sido identificado na caracterização de espécie (Tabela 7).

Tabela 7 - Caracterização dos isolados e resultados dos métodos imunoenzimático, HE, PCR para identificação de espécie e genotipagem do *locus* 1-2.

Amostra	Procedência	Clínica	Cultivo	ELISA	HE**	PCR Eh/Ed	Locus 1-2
10136 IEC	Icoaraci/PA	--	Xênico	Neg	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
10925 IEC	Belém/PA	Diarréia/cólicas/const	Xênico	Pos	<i>E. dispar</i>	Mista	<i>E. dispar</i>
10891 IEC	Ananindeua/PA	---	Xênico	Neg	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
10121 IEC	Abaetetuba/PA	Cólicas/constipação	Xênico	Neg	--	Mista	<i>E. dispar</i>
10074 IEC	Belém/PA	Diarréia/fezes past	Xênico	Neg	<i>E. histolytica</i>	Mista	<i>E. dispar</i>
1010 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Neg	--	Mista	<i>E. dispar</i>
919 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Pos	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
852 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Pos	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
832 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Neg	<i>E. histolytica</i>	Mista	<i>E. dispar</i>
753 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Neg	--	Mista	<i>E. dispar</i>
463 PMD	Belém/PA	Assintomático	Xênico	Neg	<i>E. dispar</i>	Mista	<i>E. dispar</i>
AHBB01	Abaetetuba/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
AHBB02	Belém/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
AHBB04	Icoaraci/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
AHBB06	Belém/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
AHBB07	Belém/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>

AHBB08	Belém/PA	Abs. Hepático	NO*	Pos	--	--	<i>E. histolytica</i>
DRP	Manaus/AM	Ameboma anal	Xênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
JCAOR9	Manaus/AM	Colite não disentérica	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
EGG	Manaus/AM	Colite disentérica/Abs. Hepático	Monoxênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
452	Belo Horizonte/MG	Colite não disentérica	Axênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
462	Belo Horizonte/MG	Colite não disentérica	Axênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
ADO	Belo Horizonte/MG	Colite não disentérica	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	NA***
CSP _R	Belo Horizonte/MG	Colite disentérica	Axênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
JC	Belo Horizonte/MG	Assintomático	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
ANSL	Belo Horizonte/MG	Assintomático	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	NA***
VEJ	Belo Horizonte/MG	Colite não disentérica	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
JPPC	Belo Horizonte/MG	Assintomático	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>
ICS	Colômbia	Colite disentérica	Xênico	--	<i>E. dispar</i>	<i>E. dispar</i>	NA***
C6	Colômbia	Colite disentérica	Xênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>
HM1	México	Colite disentérica	Axênico	--	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>	<i>E. histolytica</i>

* NO: Não obtido

**HE: hexoquinase

***NA: não amplificado

O perfil das bandas observado para o *locus* 1-2 foi variável entre os diferentes isolados de *E. histolytica* (Figura 11) e *E. dispar* (Figuras 12 e 13) procedentes de Belém e interior do Estado. Três diferentes polimorfismos para *E. histolytica* foram observados entre as 6 amostras de exsudatos que amplificaram na PCR.

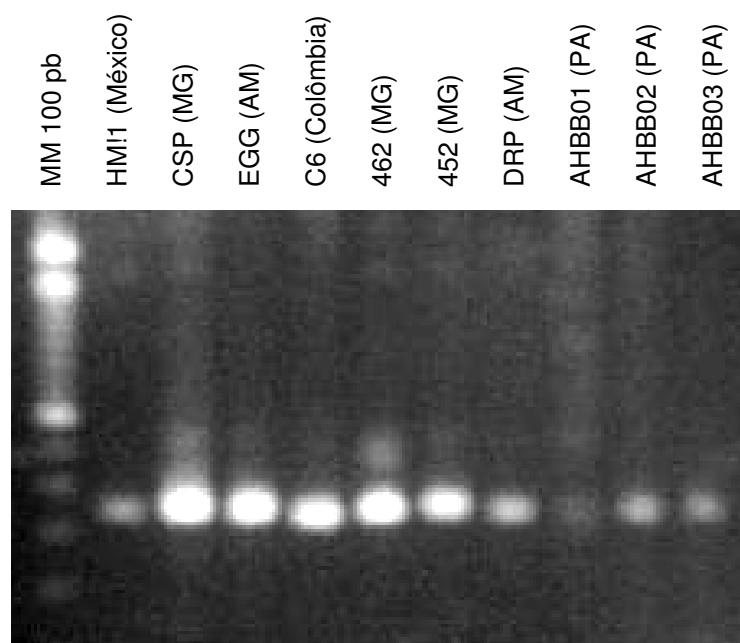


Figura 11 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o *locus* 1-2 de *E. histolytica*. MM: marcador molecular. HM1-IMSS: cepa de referência.

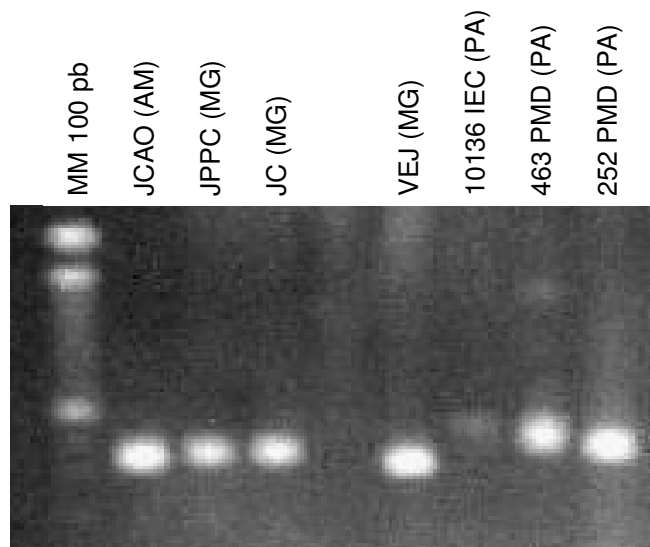


Figura 12 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o *locus* 1-2 de *E. dispar*. MM: marcador molecular.

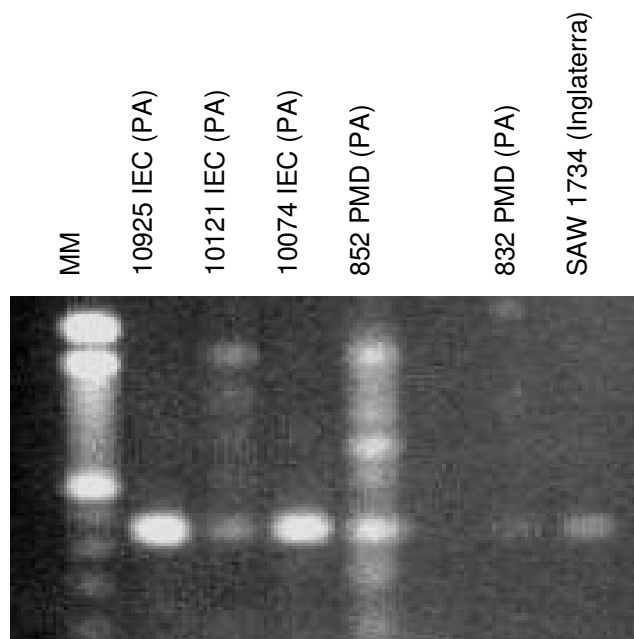


Figura 13 - Eletroforese horizontal dos produtos da PCR para o *locus* 1-2 de *E. dispar*. MM: marcador molecular. SAW 1734 (cepa de referência).

Os 11 isolados procedentes de outras regiões do Brasil (3 de Manaus e 8 de Belo Horizonte) também mostraram-se polimórficos (Figuras 11, 12 e 13). Grande variabilidade foi encontrada nas amostras de Belo Horizonte (MG). Não foi possível comparar os polimorfismos nas amostras de Manaus devido ao número de isolados investigados.

O *locus* 1-2 de *E. histolytica* mostrou pelo menos 5 padrões distintos de banda na PCR. As amostras de abscessos hepáticos apresentaram maior polimorfismo genético entre si que as demais. Três padrões de banda foram observados nos 6 exsudatos amplificados.

No *locus* 1-2 de *E. dispar* foram observados pelo menos 6 padrões de migração entre os isolados analisados. Dois produtos de amplificação foram observados no isolado 463 PMD (*E. dispar*, Belém/PA), apresentando uma banda forte com cerca de 450 pb e outra mais fraca, entre os marcadores de 500 pb e 600 pb, o que pode ser considerado como presença de duas populações geneticamente distintas de *E. dispar*. Esta última banda foi também observada no isolado 10136 IEC de Belém (PA).

Dois isolados (10121 IEC e 852 PMD) apresentaram bandas extras além da correspondente a amplificação do *locus* 1-2 de *E. dispar*, e foram consideradas bandas inespecíficas.

Comparando-se os resultados da genotipagem e do teste ELISA dos 17 isolados do Pará, observou-se discordância em 3, todos provenientes de amostras fecais, um dos quais identificado como cepa mista na PCR.

Quanto a bioquímica, dos 5 isolados caracterizados por ambos os métodos (HE e genotipagem) 3 apresentaram correlação nos resultados, todos

identificados como uma única espécie na PCR. Dois isolados mistos (832 PMD e 10074 IEC) apresentaram resultados discordantes (Tabela 7).

Embora tenha havido relação entre o resultado da PCR e a genotipagem, nos isolados que haviam sido considerados mistos, apenas o *locus* 1-2 de *E. dispar* foi amplificado, não foi observado nenhum produto de amplificação para *E. histolytica*.

4 DISCUSSÃO

A amebíase é considerada importante causa de morbimortalidade no homem, com ampla distribuição geográfica, e maior prevalência em regiões tropicais devido às condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias deficientes das populações (WHO/PAHO/UNESCO, 1997). Na região Amazônica as precárias condições sociais e econômicas e a falta de saneamento básico na maioria das localidades contribuem para o alto índice da doença.

Durante décadas, grupos de pesquisa estudaram a amebíase na região Amazônica e encontraram prevalências elevadas pelos métodos coproscópicos (COSTA *et al.*, 1955; AZEVEDO & MAROJA, 1956; FERRAZ & BEZERRA, 1994; MARTINS & MENEZES, 1994; MIRANDA *et al.*, 1998). No Pará, diversos casos de formas invasivas, inclusive amebíase hepática foram identificados por vários pesquisadores (RODRIGUES-FILHO *et al.*, 1963; CHAVES, 1987; Pardal *et al.*, 1998; SALLES *et al.*, 2003), o que mostra que a doença deve ser considerada um importante problema de saúde pública nesta região.

Diagnóstico Laboratorial das Fezes

Diversos inquéritos epidemiológicos foram realizados no Brasil objetivando estimar a freqüência da amebíase no país. Na maioria, os métodos parasitológicos de fezes foram os mais utilizados (CARDOSO *et al.*, 1995; TAVARES-DIAS & GRANDINI, 1999; PRADO *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2003).

É consenso, que o exame microscópico não produz resultados satisfatórios sobre a real estimativa da doença numa região, pois são incapazes de diferenciar *E. histolytica* de *E. dispar*. A fim de reavaliar a importância epidemiológica da amebíase, técnicas capazes de identificar características antigênicas e genéticas específicas de *E. histolytica* têm sido empregadas como métodos alternativos para diagnóstico visando dar maior acurácia aos resultados.

O emprego do imunodiagnóstico (ABD-ALLA *et al.*, 1993; HAQUE *et al.*, 1993; BRAGA *et al.*, 1996; BERNAL *et al.*, 2000; ABD-ALA & RAVDIN, 2002) e da biologia molecular (TANNICH & BURCHARD, 1991; ACUÑA-SOTO *et al.*, 1993; KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; BRITTEN *et al.*, 1997; AGUIRRE *et al.*, 1997; BLESSAMANN *et al.*, 2002) para diferenciação das duas espécies, tem mostrado boa sensibilidade e especificidade quando comparadas a análise isoenzimática, que é considerada o padrão-ouro. Devido ao alto custo, estas metodologias ainda não estão disponíveis para uso regular, porém têm auxiliado em estudos epidemiológicos que resultam no conhecimento da prevalência da amebíase nas diferentes regiões do mundo.

Estudos comparando a frequência de *E. histolytica* utilizando diferentes técnicas revelaram que a microscopia pode resultar em uma super ou sub-estimativa da doença numa determinada localidade. No Brasil, Braga *et al.* (2001b) investigando a infecção em residentes de Fortaleza (CE) encontraram positividade de 7,7% na microscopia e 14,9% no ELISA, o que mostra uma sub-estimativa da infecção nos métodos de rotina na população em estudo. Recentemente, Pinheiro *et al.* (2004) não encontraram positividade

para *E. histolytica* entre 1.437 amostras fecais de residentes de Macaparana (PE), as quais haviam sido testadas pelo mesmo método ELISA utilizado por Braga *et al.* (2001b). Estes dados demonstram a diferença da distribuição geográfica da doença no Brasil, havendo ausência ou predomínio de *E. histolytica* (patogênica) em algumas cidades.

O kit ELISA (TechLab Blacksburg VA) utilizado tem sido eficaz para o diagnóstico da amebíase como mostrado em diversos estudos epidemiológicos (HAQUE *et al.*, 1995, 1998; BRAGA *et al.*, 1998; 2001b), demonstrando alta sensibilidade e especificidade (HAQUE *et al.*, 1998) em relação aos métodos isoenzimático e molecular. Além disso, reduz o tempo de execução dos testes, é de fácil execução e produz resultados satisfatórios.

No Brasil, poucos estudos utilizaram este kit no diagnóstico do protozoário, porém, freqüências variáveis de *E. histolytica* foram observadas. Em Fortaleza (CE), Braga *et al.* encontraram positividade de 10,6% (BRAGA *et al.*, 1998) e 14,9% (BRAGA *et al.*, 2001b) em 564 e 735 amostras estudadas, respectivamente. Schnack *et al.* (2003) obtiveram freqüência de 56,4% em uma população infantil de Criciúma (SC). Póvoa *et al.* (2001) encontraram freqüência de 28,99% na população de Belém ao analisarem 438 amostras fecais, o que corrobora nossos resultados.

Nível de Concordância dos Testes Coproscópicos e de ELISA

Neste estudo, comparamos a freqüência da infecção por *E. histolytica* utilizando métodos coproscópicos e imunoenzimáticos, a fim de verificar a importância de ambos nos estudos epidemiológicos. Os resultados

mostram que a positividade é elevada nos dois métodos, porém com grande número de resultados discordantes (24,85%; 83/334), resultando em baixa sensibilidade do coproscópico (45,26%). As discordâncias podem ser decorrentes da não diferenciação entre *E. histolytica* e *E. dispar* nos métodos parasitológicos. Além disso, na microscopia é necessária que a forma evolutiva do parasita esteja preservada para caracterização da morfologia. Todavia, o método ELISA é capaz de detectar mesmo o parasita rompido.

Vários autores relataram diferentes sensibilidades dos métodos parasitológicos. Haque *et al.* (1997) e Evangelopoulos *et al.* (2001), comparando os resultados da microscopia e ELISA, mostraram que a sensibilidade do coproscópico é cerca de 60% em relação ao imunoenzimático. Mais recentemente, Delialioğlu *et al.* (2004) analisando 88 amostras fecais utilizando coloração tricromática e ELISA encontraram sensibilidade de 53,8%. Póvoa *et al.* (2001) observaram discordância de 28,08% em uma amostra de Belém, mesmo quando utilizaram a coloração pela hematoxilina férrica.

Embora a frequência da amebíase em nosso estudo (29,35%) seja a esperada para populações brasileiras, 5,4-46% (REY *et al.*, 1999), as discordâncias observadas nos dois métodos e a baixa sensibilidade do coproscópico, em relação aos dados acima (HAQUE *et al.*, 1997; EVANGELOPOULOS *et al.*, 2001; PÓVOA *et al.*, 2001; DELIALIOĞLU *et al.*, 2004) sugere que a microscopia deve ser revista como uma metodologia para diagnóstico da amebíase em nossa população.

Análise da Patogenicidade dos Isolados do Pará

Diferenças no comportamento patogênico do parasito foram observadas por vários autores e métodos moleculares e imunoenzimáticos têm sido importantes no estudo da relação entre a presença de *E. histolytica* e o desenvolvimento de doença invasiva.

Em Fortaleza, Braga *et al.* (1998, 2001b) não encontraram qualquer sintoma clínico sugestivo de amebíase intestinal invasiva em indivíduos infectados de uma área endêmica de Fortaleza. Posteriormente, estes mesmos autores (BRAGA *et al.*, 2001a) demonstraram que cerca de 30% dos infectados manifestaram pelo menos um episódio de diarreia num período de 45 dias de estudo.

Haque *et al.* (1998) observaram que 51,02% dos indivíduos de Dhaka (Bangladesh, Índia) com diarreia eram portadores de *E. histolytica* pelo método de ELISA. Bernal *et al.* (2000) relacionaram a *E. histolytica* como agente causador de sintomas gastrointestinais em crianças do México, devido a elevada frequência observada em seu estudo (98%). Abd-Alla & Ravdin (2002) apontaram a *E. histolytica* como um dos principais patógenos de diarreia aguda em residentes do Cairo, Egito, pois a mesma foi detectada em 38% dos casos. Em crianças de Bangladesh, Haque *et al.* (2003) encontraram uma associação de 62% entre o sintoma de diarreia ou disenteria e a presença de *E. histolytica*. No Brasil, alta prevalência de *E. histolytica* (56,4%) foi detectada por Schnack *et al.* (2003) em menores de 5 anos com diarreia na cidade de Criciúma (SC), sendo incriminada como o segundo agente causador.

Contrariamente, Blessmann *et al.*, (2003), em estudo realizado na

cidade de Hué, Vietnã, observaram que nenhum dos 383 pacientes acompanhados durante um período de 15 meses apresentou sintomas de amebíase intestinal invasiva, apesar de um dos indivíduos ter desenvolvido amebíase hepática num período de 1 mês.

Observamos uma relação significativa ($OR = 4,4026$; $IC\ 95\% = 2,2907 - 8,4614$; $p = 0,0000$) entre a presença do parasito e o desenvolvimento de doença, principalmente diarréia e cólicas intestinais, que acometeram 58,82% dos pacientes. Nossos resultados confirmam os dados de alguns autores que relataram a amebíase invasiva como uma doença comum nesta população (RODRIGUES-FILHO *et al.*, 1963; CHAVES, 1987; Pardal *et al.*, 1998; SALLES *et al.*, 2003).

Apesar da diarréia ser o sintoma mais comumente relacionado à amebíase intestinal invasiva, encontramos elevada freqüência de cólicas abdominais. Segundo Haque *et al.* (2003), estes sintomas estão freqüentemente associados à diarréia por *E. histolytica*.

Os casos assintomáticos (20,47%) ELISA positivo corroboram os dados de Walsh (1986) e de outros autores que relatam que alguns indivíduos infectados com *E. histolytica* não manifestam sintomas da doença. Provavelmente, o aparecimento de imunidade adquirida espécie-específica ou as diferenças genéticas entre isolados sejam fatores determinantes na evolução da doença (BRAGA *et al.*, 2001b; GHOSH *et al.*, 2000; ZAKI *et al.*, 2002; HAGHIGHI *et al.*, 2002; ZAKI *et al.*, 2003; HAQUE *et al.*, 2003). É importante reiterar, que nenhum paciente ELISA positivo foi acompanhado

clínicamente após diagnóstico, portanto não podemos afirmar que não houve desenvolvimento de doença.

Assim podemos determinar que o relato de diarreia ou disenteria acompanhado ou não de cólicas intestinais pode ser considerado um indicativo de amebíase invasiva em nossa população, já que outros métodos mais sensíveis que a microscopia ainda não estão sendo utilizados na rotina laboratorial.

Análise dos Exsudatos

A pesquisa de antígenos de *E. histolytica* em exsudatos hepáticos tem auxiliado na confirmação diagnóstica do agente etiológico (BHAVE *et al.*, 1985; ZENGZHU *et al.*, 1999).

Bhave *et al.* (1985) analisando 25 amostras de exsudatos de pacientes com suspeita de amebíase hepática por meio da imunoeletroforese encontraram positividade em 23. Uma das amostras negativas foi confirmada posteriormente como abscesso piogênico e uma mostrou resultado falso-negativo. Posteriormente, Zengzhu *et al.* (1999) compararam a performance da pesquisa de antígenos e da PCR confirmando a sensibilidade do método.

O kit ELISA TechLab *E. histolytica* foi inicialmente desenvolvido para pesquisa de antígenos fecais, porém tem sido utilizado na detecção da lectina no exsudato e no soro de pacientes com amebíase hepática. Haque *et al.* (2000) demonstram que este kit detecta antígenos no pus em 100% dos pacientes sem tratamento prévio com metronidazol e em 33,3% dos tratados, mostrando o desaparecimento da antigenemia após tratamento.

Em nosso estudo, o ELISA mostrou positividade em 7 dos 8 aspirados analisados, e boa correlação com os métodos moleculares, embora todos os nossos pacientes tivessem sido tratados com Metronidazol e/ou Secnidazol há pelo 5 dias antes da coleta.

Segundo relatos dos médicos do HUUJBB, métodos de imagens podem ser usados no diagnóstico da amebíase hepática. Todavia, Salles *et al.* (2003) sugerem que estes métodos não são decisivos no diagnóstico da doença hepática por não ser capaz de diferenciar com precisão abscesso hepático de piogênico.

Um outro critério adotado neste hospital na diferenciação dos tipos de abscessos é a resposta terapêutica ao metronidazol e aos antibióticos, os quais também foram sugeridos por Salles *et al.* (2003). Assim, caso o paciente não tenha boa resposta terapêutica é instituído tratamento para abscesso piogênico, o que já havia sido relatado em estudos anteriores realizados por outros pesquisadores (BHAVE *et al.*, 1985).

O paciente (AHBB05), cujo exsudato foi ELISA negativo, estava sendo tratado com cefalexina e ciprofloxacina (antibióticos) além do metronidazol, o que mostra a suspeita clínica de abscesso piogênico. Provavelmente, a negatividade tenha sido devido à presença de um abscesso de origem bacteriana, ou talvez, ao uso do Metronidazol e do Secnidazol.

Assim, a pesquisa de antígenos no pus pelo kit ELISA poderá auxiliar no diagnóstico diferencial da amebíase hepática e abscesso piogênico antes da instituição do tratamento em nossa região.

Cultura e Bioquímica

O isolamento de *E. histolytica*/*E. dispar* seguido da caracterização bioquímica são considerados os métodos padrão-ouro no diagnóstico. Todavia, além de serem técnicas bastante laboriosas, o sucesso no isolamento do parasito a partir de amostras fecais microscopicamente positivas é cerca de 50 a 70% (Clark & Diamond, 2002).

Neste estudo, podemos afirmar que a quantidade de isolados foi relativamente boa (39,80%), pois as amostras eram semeadas independentemente do resultado do método coproscópico. Outro fator que deve ter influenciado na eficácia da cultura foi o tempo levado entre a coleta e o plantio, em média 3 a 5 dias, pois a maioria das amostras foi coletada em estudos de campo e era conservada sob refrigeração até o momento do plantio. Nos exsudatos dos abscessos de etiologia amebiana, o tratamento prévio com Metronidazol ou Secnidazol deve ter sido determinante no insucesso do cultivo.

Após desencistamento, o principal fator responsável pela perda de isolados nas primeiras semanas de manutenção foi o crescimento de *B. hominis*. Este protozoário tem sido considerado um dos mais prevalentes na espécie humana e pode não ser detectado no exame parasitológico de fezes. O *B. hominis* cresce com sucesso em todos os meios de cultura utilizados para cultivo xênico de *E. histolytica* ou *E. dispar*, e caso não eliminado inviabiliza o crescimento dos trofozoítos (Clark & Diamond, 2002).

Com o estabelecimento da cultura (em média 14 dias), o crescimento excessivo de bactérias foi a principal causa da perda dos isolados,

apesar do uso de antibióticos (estreptomicina e penicilina) no meio. Mesmo quantidades adicionais durante os repiques não foram capazes de reduzir o número de bactérias do cultivo. Segundo Clark & Diamond (2002), a disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos tem dificultado o estabelecimento dos tipos e quantidades dos antibióticos a serem utilizados no controle do crescimento da flora bacteriana humana.

A cultura do material fecal detectou adicional parasitismo (*E. histolytica*/*E. dispar*) em 46,15% das amostras, cuja microscopia havia sido negativa. Nossos dados corroboram os de McMillan & McNeillage (1984) e Parija & Rao (1995) que relataram a importância do cultivo independente do resultado do método coproscópico.

A caracterização dos isolados pela HE demonstra a presença de *E. histolytica* e *E. dispar* em nosso meio em frequências (53,85% e 46,15%, respectivamente) relativamente iguais, o que deve favorecer a coexistência das duas espécies em um mesmo indivíduo, e que foi confirmado na técnica de PCR.

A HE de cepas identificadas como mistas (co-infecção com *E. histolytica* e *E. dispar*) pela PCR, detectou apenas uma das espécies, o que mostra a diminuição da sensibilidade da técnica bioquímica em casos de co-infecção. Neste estudo, a técnica bioquímica não foi importante na caracterização da patogenicidade dos isolados em contraste com vários autores (SARGEAUNT *et al.*, 1982; SARGEAUNT *et al.*, 1980b). Resultado semelhante foi observado por Aguirre (1999) e Myjak *et al.* (2000).

As discordâncias observadas nos resultados do método bioquímico e do ELISA podem ser decorrentes da sensibilidade do kit (96,9%, segundo o fabricante).

PCR para Identificação de Espécie

A maioria dos cultivos (56,25%) analisados neste estudo foi identificada como linhagens mistas, até o momento não descritas para populações brasileiras. Braga *et al.* (2001b) utilizando os kits ELISA *Entamoeba* (TechLab, Blacksburg VA), que não diferencia *E. histolytica* de *E. dispar*, e o ELISA para detecção específica de *E. histolytica*, relataram a presença das duas espécies em Fortaleza, porém o artigo não deixa claro se houve co-infecção pelas duas espécies. Co-infecção com *E. histolytica* e *E. dispar* parece ser comum em localidades onde as duas espécies coexistem.

Acuña-Soto *et al.* (1993) realizando estudo epidemiológico em uma comunidade rural do México, encontraram 56% de infecções mistas utilizando técnica de PCR seguida de hibridização com sondas específicas para cada espécie.

Aguirre (1999) analisando cultivos procedentes da Colômbia e Bangladesh por meio da técnica de PCR-ELISA identificaram infecções mistas em 25% e 28,57%, respectivamente.

Nunez *et al.* (2001) encontraram positividade de 24,5% entre 49 espécimes fecais de residentes da Província de Cienfuegos em Cuba detectados pela técnica de PCR multiplex. Nenhum indivíduo albergou *E. histolytica* isoladamente. A maioria das amostras foram *E. dispar* (75,5%).

Hooshyar *et al.* (2004) identificaram 3,5% e 3,7% de co-infecção na região central e sul do Iran, respectivamente por meio da técnica de PCR-RFLP.

Mais recentemente, Furrows *et al.* (2004) detectaram 3 casos de infecções mistas entre 15 amostras de pacientes residentes em Londres por meio da técnica de PCR-ELISA.

Nossos resultados reforçam os dados acima sobre a coexistência das duas espécies em um mesmo indivíduo, os quais foram detectados a partir do emprego de uma nova ferramenta de biologia molecular.

Melhor estimativa da frequência das duas espécies seria obtida a partir da extração do DNA fecal, todavia a presença de inibidores da PCR em amostras fecais bem como substâncias capazes de degradar o DNA podem influenciar na performance das técnicas moleculares (FURROWS *et al.*, 2004).

Nas etapas iniciais deste estudo, realizamos extração de DNA fecal utilizando um kit comercial (QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook (Qiagen). Nenhuma das amostras amplificou na PCR apesar de terem sido positivas no ELISA e no cultivo. A extração do DNA a partir da cultura do parasito mostrou-se a técnica de escolha para a realização deste estudo. Este procedimento tem sido adotado por vários grupos de pesquisa (BRACHA *et al.*, 1990; BRITTEN *et al.*, 1997; MYJAK *et al.*, 2000; ZAKI & CLARK, 2001; ZAKI *et al.*, 2002; 2003; HAGHIGHI *et al.*, 2002; 2003; PINHEIRO *et al.* 2004; HOOSHYAR *et al.*, 2004),

Diversos protocolos de extração têm sido avaliados na obtenção de DNA fecal (KATZWINKEL-WLADARSCH *et al.*, 1994; AGUIRRE, 1999;

VIANNA *et al.*, 2003) mostrando resultados satisfatórios. Kits para extração de DNA fecal encontram-se disponíveis comercialmente, porém o alto custo torna impraticável sua utilização em estudos epidemiológicos onde um grande número de espécimes é investigado.

Nos exsudatos, provavelmente a presença de inibidores nos coágulos ou mesmo a degradação do DNA devido ao tratamento prévio com Metronidazol, devem ter influenciado na performance da PCR dos exsudatos que tiveram resultado positivo no teste ELISA.

A PCR mostrou-se mais sensível na detecção de *E. histolytica* que o método ELISA, corroborando os dados de vários autores (HAQUE *et al.*, 1995; MIRELMAN *et al.*, 1997; GONIN & TRUDEL, 2003; FURROWS *et al.*, 2004).

A baixa sensibilidade da HE em relação a PCR mostra sua pouca aplicabilidade em populações onde a frequência das duas espécies é elevada. Apesar de ser considerada importante na identificação de *E. histolytica* e *E. dispar* esta técnica falhou na identificação de co-infecções. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (AGUIRRE, 1999; MYJAK *et al.*, 2000; ZAKI *et al.*, 2003).

A PCR teve correlação clínica superior à observada no ELISA e na HE. Entretanto, o baixo custo do kit ELISA em relação a PCR, e sua boa correlação clínica, são argumentos que favorecem o emprego desta técnica no diagnóstico confirmatório da amebíase em nossa região. A PCR poderá ser usada na determinação da frequência das duas espécies em estudos populacionais.

Genotipagem de E. histolytica e E. dispar

Métodos de genotipagem têm sido desenvolvidos a fim de identificar prováveis genótipos relacionados à capacidade do parasito em promover doença no homem, porém dados precisos ainda não estão disponíveis.

O emprego da RAPD-PCR tem sido importante na investigação da variabilidade genética de isolados de *E. histolytica*. Valle *et al.* (2000) comparando isolados axênicos do Brasil com cepas de referência (HM1, HK-9, 200-NIH) observaram correlação entre os polimorfismos gerados pela RAPD e a virulência do parasito. Contrariamente, Prakash *et al.* (2002) não encontraram relação entre os diversos RAPDemes obtidos a partir de isolados da Índia e a apresentação clínica da doença. O emprego da técnica de RAPD deve ser restrito a caracterização de isolados axênicos, pois a presença de bactéria no cultivo leva a perda da especificidade dos iniciadores, como sugerido por Gomes *et al.* (2000).

A análise de seqüências repetitivas em regiões codificadoras (gene SREHP) e não codificadoras do genoma (gene quitinase, *loci* 1-2, 5-6 e NK) têm sido alvo de vários pesquisadores, embora os dados disponíveis até o momento não tenham demonstrado qualquer relação entre determinados genótipos e a capacidade patogênica do parasito. Esta metodologia pode ser empregada no estudo genético independente da fonte de DNA (fezes, pus, cultivos), o que é uma vantagem em relação à técnica de RAPD.

Haghighi *et al.* (2002) analisando os *loci* 1-2, 5-6, SREHP e quitinase em 30 isolados de *E. histolytica* mostraram grande variabilidade

genética para SREHP e 5-6. Todavia, o seqüenciamento das bandas observados na PCR revelou um complexo polimorfismo de comprimento, número e localização das unidades de repetições nos *loci* SREHP e 1-2, não observado nos *loci* 5-6 e do gene da quitinase. A análise de um número maior de isolados de diferentes regiões do mundo revelou que a *E. histolytica* possui uma complexa estrutura genética independente de sua localização geográfica (HAGHIGHI *et al.*, 2003). Nenhuma associação entre a apresentação clínica e os diferentes genótipos do parasito foi observada. Estudos populacionais utilizando estes polimorfismos genéticos mostraram-se relevantes no comportamento da infecção numa população ao longo de um determinado tempo (BLESSMAN *et al.*, 2003) ou entre grupos populacionais (ZAKI *et al.*, 2002; HAGHIGHI *et al.*, 2002).

Neste estudo encontramos grande variedade de polimorfismos no *locus* 1-2 para ambas as espécies em amostras procedentes do Pará e de outras regiões do Brasil, confirmando a presença de diferentes linhagens genótípicas em nossa população como demonstrado em vários estudos realizados no Brasil (NOZAKI *et al.*, 1990; GOMES *et al.*, 2000; VALLE *et al.*, 2000). O seqüenciamento dos produtos da PCR irá mostrar o verdadeiro grau de polimorfismos dos isolados, o que foi observado por HAGHIGHI *et al.* (2002; 2003).

Recentemente, C.G. CLARK (comunicação pessoal) analisaram 46 *loci* STR's relacionados a RNAt para *E. histolytica* e *E. dispar*. Surpreendentemente, a maioria dos *loci* (30/46) mostrou pouco ou nenhuma variação entre os isolados estudados, 12 produziram múltiplos produtos de

amplificação e apenas 6 foram selecionados pelos autores como sendo adequados para o estudo dos polimorfismos. O sucesso da amplificação a partir de culturas polixênicas foi um dos critérios adotados pelos pesquisadores, o que demonstra a dificuldade na obtenção de amplicons utilizando seqüências STR's de *E. histolytica* e *E. dispar*. O *locus* com maior performance teve sucesso de 80% e cepas axênicas apresentam melhor performance.

Em nosso estudo, alguns isolados não amplificaram para o *locus* 1-2, o que também tem sido observado por C. G. Clark (comunicação pessoal) que relata um sucesso de 70% na amplificação deste *locus*. Resultados semelhantes foram encontrados por ZAKI *et al.* (2003) que utilizaram os mesmos iniciadores (Hsp1/Hsp2 e Dsp1/Dsp2) e analisaram um número maior de *loci*. Segundo estes autores variações genéticas no ponto de hibridização dos iniciadores, devem influenciar na performance da PCR.

Adicionalmente, isolados mistos amplificaram para apenas um dos pares de iniciadores. Algumas técnicas de biologia molecular têm falhado na identificação de co-infecções (Aguirre *et al.*, 1999; Zaki *et al.*, 2003; Furrows *et al.*, 2004).

Embora tenha sido demonstrada grande variabilidade genética observada no *locus* 1-2 nos estudos realizados até o momento, não há relatos da presença de dois produtos de amplificação em um único isolado de *E. dispar*. Zaki *et al.* (2003) encontraram dupla banda para o *locus* 1-2 de *E. histolytica* sugerindo infecção por diferentes linhagens genotípicas.

A presença de dupla banda, uma entre os marcadores de 500 pb e 600 pb e outra com cerca de 450 pb no isolado 463 PM (Belém/PA) sugere co-infecção por diferentes isolados de *E. dispar*. A banda mais lenta, também encontrada na amostra 10136 IEC (Belém/PA), parece não ser um genótipo com frequência baixa em nossa população.

Apesar de não ter sido observada correlação entre diferentes genótipos e a capacidade patogênica de *E. histolytica*, a caracterização genotípica do *locus* 1-2 em um número maior de isolados irá auxiliar no estudo da epidemiologia molecular, bem como nos mecanismo de transmissão das duas espécies nas diferentes regiões do Brasil.

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo concluímos que:

- A freqüência de amebíase intestinal na população em estudo é elevada independente do método utilizado. Todavia, a sensibilidade do método ELISA mostra a importância do seu emprego nos estudos epidemiológicos em nossa região;

- A alta positividade (53,12%) para *E. histolytica* em pacientes sintomáticos (OR 4,4026; $p = 0,0000$; IC 95% = 2,2907 - 8,4614) revela o potencial patogênico das cepas circulantes;

- O uso do kit ELISA (TechLab Blacksburg VA) na pesquisa de antígenos em exsudatos de abscessos hepáticos deve ser o método de escolha para diagnóstico diferencial das formas extra-intestinais da doença;

- O isolamento poderá ser empregado como método alternativo para obtenção de DNA de *E. histolytica* e *E. dispar*;

- A HE detectou freqüências equivalentes de *E. histolytica* (53,85%) e *E. dispar* (46,15%), porém o perfil enzimático teve baixa correlação com a apresentação clínica da amebíase e falhou na identificação de infecções mistas;

- A PCR (modificada por M. A. Gomes) utilizada neste estudo mostrou-se sensível na detecção de *E. histolytica* e *E. dispar*, revelando elevada freqüência de co-infecções (56,25%);

- A genotipagem dos isolados demonstra que diferentes polimorfismos genéticos de *E. histolytica* e *E. dispar* ocorrem no Brasil;

- Apesar de observamos diferentes genótipos no *locus* 1-2 de ambas as espécies, co-infecções com diferentes linhagens genotípicas de uma mesma espécie parecem ser raras nas populações.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ALLA, M., JACKSON, T.F.H.G., RAVDIN, J.I. Serum IgM antibody response to the galactose-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **59**:431-434, 1998.
- ABD-ALLA, M., JACKSON, T.F.H.G., GATHIRAM, V., EL-HAWEY, A.M., RAVDIN, J.I. Differentiation of pathogenic *Entamoeba histolytica* infections from nonpathogenic infections by detection of galactose-inhibitable adherence protein antigen in sera and feces. **Journal of Clinical Microbiology**, **31**:2845-2850, 1993.
- ABD-ALLA, M., JACKSON, T.F.H.G., REDDY, S., RAVDIN, J.I. Diagnosis of invasive amebiasis by enzyme-linked immunosorbent assay of saliva to detect amebic lectin antigen and anti-lectin immunoglobulin G antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**:2344-2347, 2000.
- ABD-ALLA, M.D., RAVDIN, J.I. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting with acute diarrhoea in Cairo, Egypt. **Tropical Medicine & International Health**, **7**: 365-370, 2002.
- ABOU-EL-MAGED, I., SOONG, C.J., EL-HAWEY, A.M., RAVDIN, J.I. Humoral and mucosal IgA antibody response to a recombinant 52-kDa cysteine-rich portion of the *Entamoeba histolytica* galactose-inhibitable lectin correlates with detection of native 170-kDa lectin antigen in serum of patients with amebic colitis. **Journal of Infectious Diseases**, **174**:157-162, 1996.
- ACA, I.S., KOBAYASHI, S., CARVALHO, L.B., TATENO, S., TAKEUCHI, T. Prevalence and pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in three different

- regions of Pernambuco, northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **36**:519-524, 1994.
- ACUÑA-SOTO, R., SAMUELSON, J., DE GIROLAMI, P., ZARATE, L., MILLAN-VELASCO, F., SCHOOLNICK, G., WIRTH, D. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **48**:58-70, 1993.
- ADAMS, S.A., ROBSON, S.C., GATHIRAM, V., JACKSON, T.F.H.G., PILLAY, T.S., KIRSCH, R.E., MAKGOBA, M.W. Immunological similarity between the 170 kD amoebic adherence glycoprotein and human $\beta 2$ integrins. **The Lancet**, **341**:17-19, 1993.
- AGUIRRE, A. **Standardisation and evaluation of differential diagnostic systems for detection of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar***. Tese (Doutorado) – London, London School of Hygiene and Tropical Disease, 1999. 210p.
- AGUIRRE, A., MOLINA, S., BLOTKAMP, C., VERVEIJ, J., VINUESA, T., VALLS, M.E., GUHL, F., POLDERMAN, A., JIMENEZ DE ANTA, M.T., GONZALEZ-RUIZ, A., FRAME, I.A., WARHURST, D.C. Diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical specimens by PCR-SHELA. **Archives of Medical Research**, **28**:282-284, 1997.
- AGUIRRE, A., WARHURST, D.C., GUHL, F., FRAME, I.A. Polymerase chain reaction - solution hybridization enzyme-linked immunoassay (PCR-SHELA) for the differential diagnosis of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and**

- Hygiene**, **89**:187-188, 1995.
- ALBACH, R.A. Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Protozoology**, **36**:197-205, 1989.
- ALVES, J.R., MACEDO, H.W., RAMOS, A.N., FERREIRA, L.F., GONÇALVES, M.L.C., ARAÚJO, A. Parasitoses intestinais em região semi-árida do nordeste do Brasil: resultados preliminares distintos das prevalências esperadas. **Cadernos de Saúde Pública**, **19**:667-670, 2003.
- ANDREWS, B.J., MENTZONI, L., BJORVATN, B. Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **84**:63-65, 1990.
- ANKRI, S., STOLARSKY T., BRACHA, R., PADILLA-VACA, F., MIRELMAN, D. Antisense inhibition of expression of cysteine proteinases affects *Entamoeba histolytica*-induced formation of liver abscess in hamsters. **Infection and Immunity**, **67**:421-422, 1999.
- ARAIZA-OROZCO, L.M., ÁVILA, E.E., MUNOZ, M.L., ARIAS-NEGRETE, S. *Entamoeba histolytica*: surface proteolytic activity and its relationship with in vitro virulen. **Folia Parasitológica**, **46**:161-167, 1999.
- ARAÚJO, R., CRUZ, E.M., ARAÚJO, M.T.F. Estudo anátomo-patológico da amebíase em Belém do Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **21**(Suplemento):141, 1988.
- ARROYO , R., OROZCO, E. Localization and identification of an *Entamoeba histolytica* adhesin. **Molecular of Biochemical Parasitology**, **23**:151-158, 1987.
- AYRES, M., AYRES JR., M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat:**

Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas.

Sociedade Civil Mamirauá e MCT-CNPq (Eds.), Manaus, 2000, 193 pp.

AZEVEDO, M.C., MAROJA, R.C. Inquérito parasitológico entre crianças, realizados nos municípios de Ponta de Pedras e Soure-Pará. **Revista do Serviço Especializado em Saúde Pública**, **8**:469-478, 1956.

BENZEGUIR, A.K., KETTIS, A. A. Evaluation of an enzyme-immunoassay test kit for diagnosing infections with *Entamoeba histolytica*. **Archives of Medical Research**, **28**:276-278, 1997.

BERNAL, R., MARTINEZ, L.G., ZEPEDA, B., HERNANDEZ, G., BAER, G.M. Determination of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infection by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. **Archives of Medical Research**, **31(4 Suppl)**:S55-S56, 2000.

BHATTACHARYA, S., BHATTACHARYA, A., DIAMOND, S.L., SOLDI, A.T. Circular DNA of *Entamoeba histolytica* encodes ribosomal RNA. **Journal of Protozoology**, **36**:455-458, 1989.

BHATTACHARYA, A., SATISH, S., BAGCHI, A., BHATTACHARYA, S. The genome of *Entamoeba histolytica*. **International Journal of Parasitology**, **30**:401-10, 2000.

BHAVE, G.G., WANLE, N.M., JOSHI, U.M. Detection of amebic antigen by enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA). **Journal of Postgraduate Medicine**, **31**:146-149, 1985.

BLESSMANN, J., ALI, I.K., NU, P.A., DINH, B.T., VIET, T.Q., VAN, A.L., CLARK, C.G., TANNICH, E. Longitudinal study of intestinal *Entamoeba*

- histolytica* infections in asymptomatic adult carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:4745-50, 2003.
- BLESSMANN J., BUSS H., NU, P.A., DINH, B.T., NGO, Q.T., VAN, A.L., ALLA, M.D., JACKSON, T.F., RAVDIN, J.I., TANNICH, E. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:4413-4417, 2002.
- BOS, H. G, VAN DE GRIEND, R.J.. Virulence and toxicity of axenic culture of *Entamoeba histolytica*. **Nature**, **265**:341-343, 1977.
- BRACHA, R., DIAMOND, L.S., ACKERS, J.P., BURCHARD, G.D., MIRELMAN, D. Differentiation of clinical isolates of *Entamoeba histolytica* by using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, **28**:680-684, 1990.
- BRACHA, R., MIRELMAN, D. Virulence of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Effects of bacteria, microaerobic conditions, and metronidazole. **Journal of Experimental Medicine**, **160**:353-368, 1984.
- BRAGA, L.L., LIMA, A.A.M., SEARS, C.L., NEWMAN, R.D., WUHIB, T., PAIVA, C.A., GUERRANT, R.L., MANN, B.J. Seroepidemiology of *Entamoeba histolytica* in a slum in northeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **55**:693-697, 1996.
- BRAGA, L.L., GOMES, M.L., SILVA, M.W., FAÇANHA, F.E., FIÚZA, L., MANN, B.J. Household epidemiology of *Entamoeba histolytica* infection in an urban community in Northeastern, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **65**:268-271, 2001a.
- BRAGA, L.L., GOMES, M.L., SILVA, M.W., PAIVA, C., SALES, A., MANN, B.J. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by

- monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **34**:467-471, 2001b.
- BRAGA, L.L., MENDONÇA, Y., PAIVA, C.A., SALES, A., CAVALCANTE, A.L., MANN, B.J. Seropositivity for and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individual in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**:3044-3045, 1998.
- BRANDT, H., TAMAYO, R.P. Pathology of human amebiasis. **Human Pathology**, **1**:351-385, 1970.
- BRITTEN, D., WILSON, S.M., MCNERNEY, R., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L., ACKERS, J.P. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* using an improved colorimetric polymerase chain reaction method. **Archives of Medical Research**, **28**:S279-S281, 1997.
- BRUCHHAUS, I., ROEDER, T., LOTTER, H., SCHWERDTFEGER, M., TANNICH, E. Differential gene expression in *Entamoeba histolytica* isolated from amoebic liver abscess. **Molecular Microbiology**, **44**:1063-1072, 2002.
- BRUCHHAUS I., TANNICH E. A gene highly homologous to ACP1 encoding cysteine proteinase 3 in *Entamoeba histolytica* is present and expressed in *E. dispar*. **Parasitology Research**, **82**:189-192, 1996.
- CARDOSO, G.S., SANTANA, A.D.C., AGUIAR, C.P. Prevalência e aspectos epidemiológicos da giardíase em creches no Município de Aracajú, SE, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **28**:25-31, 1995.
- CARRADA-BRAVO, T. La amebiasis invasora como problema de salud pública.

- Boletín Médico Del Hospital Infantil de México**, **46**:139-148, 1989.
- CARVALHO, M.G., GUIMARÃES, S., SILVA, E.F. Antibodies against *Entamoeba histolytica* in individuals with intestinal amoebiasis presenting cysts and/or trophozoites in the feces. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **33**:379-383, 1991.
- CHADEE, K., PETRI, W.A., INNES, D.J., RAVDIN, J.I. Rat and human colonic mucins bind to and inhibit the adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Investigation**, **80**:1245-1254, 1987.
- CHAVES, C.L. **Abscesso amebiano do fígado**. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Gastroenterológica) - Rio de Janeiro Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1987.
- CLARK, C.G. Amoebic disease: *Entamoeba dispar*, an organism reborn. Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene Meeting at Manson House, London, 19 February 1998. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **92**:361-364, 1998.
- CLARK, C.G., DIAMOND, L.S. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**:329-341, 2002.
- CLARK, C.G., DIAMOND, L.S. Ribosomal RNA genes of pathogenic and non-pathogenic *Entamoeba histolytica* are distinct. **Molecular Biochemical Parasitology**, **49**:297, 1991.
- COSTA, O. R., AZEVEDO, M. C., MAROJA, R.S. Inquérito parasitológico realizado em seis municípios da zona Bragantina, estado do Pará, em 1950. **Revista do Serviço Especializado em Saúde Pública**, **8**:231-256, 1955.

- CUNHA, A. **Patogenia da amebíase**. Tese de Concurso para Professor Titular, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. 1975.
- CUNHA, A.S., CASTRO, L., ROCHA, P. Amebíase. *In: Tópicos em Gastroenterologia Tropical*. Rocha, P.R.S., Cunha, A.S. (eds.), Rio de Janeiro, 1991, p. 287-316.
- DANTAS, E., ROCHA, L.C., ODA, W.Y. Aspectos sociais associados as parasitoses intestinais em alunos e funcionários de uma escola de um bairro da Redenção, Manaus, Am. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 32 (Suplemento):309**, 1999.
- DAS, S., LOHIA, A. Delinking of S phase and cytokinesis in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Cellular Microbiology, 4:55-60**, 2002.
- DE LA GARZA, C.E., PEREZ, P.C., MENDONZA, E.C., LOPEZ, E.T., ESPINOSA, L.E.M. Serum cytokines of acute phase response in the amebic liver abscess. **Archives of Medical Research, 28:S250-S252**, 1997.
- DELIALIOGLU, N., ASLAN, G., SOZEN, M., BABUR, C., KANIK, A., EMEKDAS, G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99:769-72**, 2004.
- DIAMANTSTEIN, T., KLOS, M., GOLD, D., HAHN, H. Interaction between *Entamoeba histolytica* and the immune system. I. Mitogenicity of *Entamoeba histolytica* extracts for human peripheral T lymphocytes. **The Journal of Immunology, 126:2084-2086**, 1981.
- DIAMOND, L. Amebiasis: A problem solved. **Archives of Medical Research, 33:157-161**, 1992.

- DIAMOND, L. Axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. **Science**, **134**:336-337, 1961.
- DIAMOND, L. Techniques of axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *E. histolytica*-Like amebae. **The Journal of Parasitology**, **54**:1047-1056, 1968.
- DIAMOND, L., CLARK, C.G. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **Journal of Eucaryotic Microbiology**, **40**:340-344, 1993.
- DIAMOND, L., HARLOW, D.R., CUNNICK, C.C. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **72**:431, 1978.
- DIAMOND, L., PHILLIPS, B., BARTGIS, I. A comparison of the virulence of nine strains of axenically cultivated *Entamoeba histolytica* in hamster liver. **Archivos de Investigación Médica**, **5 (Suplemento)**:423, 1974.
- DODSON, J.M., LENKOWSKI, P.W., EUBANKS, A.C., JACKSON, T.F., NAPODANO, J., LYERLY, D.M., LOCKHART, L.A., MANN, B.J., PETRI JR, W.A. Infection and immunity mediated by the carbohydrate recognition domain of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. **The Journal of Infectious Diseases**, **179**:460-466, 1999.
- ECKMANN, L., REED, S.L., SMITH, J.R., KAGNOFF, M.F. *Entamoeba histolytica* trophozoites induces an inflammatory cytokine response by cultured human cell through the paracrine action of cytolytically released interleukin-1 alpha. **Journal of Clinical Investigation**, **96**:1269-1279, 1995.

- EDMAN, U., MERAZ, M.A., RAUSSER, S., AGABIAN, N., MRZA, I. Characterization of an immuno-dominant variable surface antigen from pathogenic and non pathogenic *E. histolytica*. **Journal of Experimental Medicine**, 172:879-888, 1990.
- EDMAN, U., MEZA, I., AGABIAN, N. Genomic and cDNA actin sequences from a virulent strain of *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy Science, USA**, 84:3024-3028, 1987.
- ESPINOSA-CASTELLANO, M., GONZALES-ROBES, A., CHAVEZ, B., CASTON, G., ARGUELLO, C., LAZARO-HALLER, A., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure, surface properties and cytopathic effect. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, 45:265-272, 1998.
- ESPINOSA-CASTELLANO, M., GUTIERREZ, G.C., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *In vivo* pathogenesis of *Entamoeba dispar*. **Archives of Medical Research**, 28:S204-S206, 1997.
- ESPINOSA-CASTELLANO, M., MARTÍNEZ-PALOMO, A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. **Clinical Microbiology Reviews**, 13:318-331, 2000.
- EVANGELOPOULOS, A., LEGAKIS, N., VAKALIS, N. Microscopy, PCR and ELISA applied to the epidemiology of amoebiasis in Greece. **Parasitology International**, 50:185-189, 2001.
- EVANGELOPOULOS, A., SPANAKOS, G., PATSOULA, E., VAKALIS, N. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 94:233-240, 2000.

- FERRAZ, C.M.G., BEZERRA, E.C.M. **Amebíase: incidência com variáveis clínico-epidemiológicas da *Entamoeba histolytica* por métodos coproscópicos em estudantes de 7 a 15 anos, Belém-PA, 1993.** Trabalho de Conclusão de Curso(Curso de Medicina) - Belém, Universidade Estadual do Pará, 1994, 37p.
- FEITOSA, L.F.M. **Aspectos da amebíase intestinal e hepática no Hospital Universitário Getúlio Vargas (Manaus - AM).** Tese de Mestrado, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.
- FERIA-VELASCO, A., GONZALES DEL PIEGA, M., TADIA-ARIZMENDI, G. Comparative study of *Entamoeba histolytica* trophozoites by means of scanning electron microscopy and x-ray dispersive energy spectrometry. In: **Amibiasis.** Sepulveda, B. & Diamond, L.S. (eds.). Mexico. Instituto Mexicano del Seguro Social, 1976. p. 210-213.
- FURROWS, S.J., MOODY, A.H., CHIODINI, P.L. Comparison of PCR and antigen detection methods for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Pathology**, **57**:1264-1266, 2004.
- GALARZA, M., CUCCIA, V, SOSA, F.P., MONGES, J. Pediatric granulomatous cerebral amebiasis: a delayed diagnosis. **Pediatric Neurology**, **26**:153-156, 2002.
- GARCIA-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. **Archives of Medical Research**, **28**:S290-S292, 1997.
- GARFINKEL, L.I., GILADI M., HUBER, M., GITLER, C., MIRELMAN, D.,

- REVEL, M., ROZENBLATT, S. DNA probes specific for *Entamoeba histolytica* possessing pathogenic and nonpathogenic zymodemes. **Infection and Immunity**, **57**:926-931, 1989.
- GAYTAN, E.I.S. Amebiasis. **Infectologia**, **1**:25-35, 1987.
- GHOSH, S., FRISARDI, M., RAMIREZ-AVILA L., DESCOTEAUX, S., STURM-RAMIREZ, K., NEWTON-SANCHEZ, O.A., SANTOS-PRECIADO, J.I., GANGULY, C., LOHIA, A., REED, S., SAMUELSON, J. Molecular epidemiology of *Entamoeba* spp.: evidence of a bottleneck (Demographic sweep) and transcontinental spread of diploid parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**:3815-21, 2000.
- GHOSH, S., SATISH, S., TYAGI, A., BHATTACHARYA, A. Differential use of multiple replication origins in the ribosomal DNA episome of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Nucleic Acids Research**, **15**:2035-2044, 2003.
- GODBOLD, G.D., MANN, B.J. Involvement of the actin cytoskeleton and p21^{rho}-family GTPases in the pathogenesis of the human protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **31**:1049-1058, 1998.
- GOMES, M.A., SILVA, E.F., MACEDO, A.M., VAGO, A.R., MELO, M.N. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. **Parasitology**, **114**:517-520, 1997.
- GOMES, M.A., MELO, M.N., MACEDO, A.M., FURST, C., SILVA, E.F. RAPD in the analysis of the *Entamoeba histolytica*. **Acta Tropica**, **75**:71-77, 2000.
- 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**, **39**:65-69, 1997.
- GONÇALVES, J.F., TANABE, M., MEDEIROS, F.P.M., GONÇALVES, F.J., ACA, I.S., MOTTA, S.R.N., TATENO, S., TAKEUCHI, T. Parasitological and serological studies on amoebiasis and other intestinal parasitic infections in the rural sector around Recife, northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **32**:428-435, 1990.
- GONIN, P., TRUDEL, L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:237-41, 2003.
- GONZALES-RUIZ, A., HAQUE, R., AGUIRRE, A., CASTANON, 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**, **47**:236-239, 1994.
- GRUNDY, M.S. Preliminary observations using a multi-layer ELISA method for the detection of *Entamoeba histolytica* trophozoite antigens in stool sample. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **76**:396-400, 1982.
- HAGHIGHI, A., KOBAYASHI, S., TAKEUCHI, T., MASUDA, G., NOZAKI, T. Remarkable genetic polymorphism among *Entamoeba histolytica* isolates from a limited geographic area. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:4081-4090, 2002.
- HAGHIGHI, A, KOBAYASHI, S, TAKEUCHI, T, THAMMAPALERD, N, NOZAKI,

- T. Geographic diversity among genotypes of *Entamoeba histolytica* field isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**:3748-3756, 2003.
- HAQUE, R., MONDAL, D., KIRKPATRICK, B.D., AKTHER, S., FARR, B.M., SACK, R.B., PETRI, W.A. Epidemiologic and clinical characteristics of acute diarrhea with emphasis on *Entamoeba histolytica* infections in preschool children in an urban slum of Dhaka, Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **69**:398-405, 2003.
- HAQUE, R., ALI, I.K.M., AKTHER, S., PETRI JR., W.A. Comparison of PCR, isoenzyme analysis, and antigen detection for diagnosis of *Entamoeba histolytica* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, **36**:449-452, 1998.
- HAQUE, R., ALI, I.K.M., AKTHER, S., PETRI JR., W.A. Prevalence and immune response to *Entamoeba histolytica* infection in preschool children in Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **60**:1031-1034, 1999.
- 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**, **86**:547-552, 2002.
- HAQUE, R., FARUQUE, A.S.G., HAHN, P., LYERLY, D.M., PETRI, W.A. *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infection in children in Bangladesh. **The Journal of Infectious Disease**, **175**:734-736, 1997.
- HAQUE, R., KRESS, K., WOOD, S., JACKSON, T.F., LYERLY, D., WILKINS, T., PETRI, W.A. Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection

- using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. **The Journal of Infectious Disease**, **167**:247-249, 1993.
- HAQUE, R., MOLLAH, N.U., ALI, I.K., ALAM, K., EUBANKS, A., LYERLY, D., PETRI, W.A. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TechLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**:3235-3239, 2000.
- HAQUE, R., NEVILLE, L. M., HAHN, P., PETRI JR, W.A. Rapid diagnosis of *Entamoeba* infection by using *Entamoeba* and *Entamoeba histolytica* stool antigen detection kits. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**:2558-2561, 1995.
- HARA, A., HIROSE, Y., MORI, H., IWAO, H., KATO, T., KUSUHARA, Y. Cytopathologic and genetic diagnosis of pulmonary amebiasis: a case report. **Acta Cytologica**, **48**:547-550, 2004.
- HOOSHYAR, H., REZAIAN, M., KAZEMI, B., JEDDI-TEHRANI, M., SOLAYAMANI-MOHAMMADI, S. The distribution of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in northern, central and southern Iran. **Parasitology Research**, **94**:96-100, 2004.
- HUBER M., KOLLER, B., GITLER, C., MIRELAMN, D., REVEL, M., ROZENBLATT, S., GARFINKEL, L. *Entamoeba histolytica* ribosomal RNA genes are carried on palindromic circular DNA molecules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **32**:285-296, 1989.
- HUSTON, C.D., BOETTNER, D.R., MILLER-SIMS, V., PETRI JR., W.A. Apoptotic killing and phagocytosis of host cells by the parasite *Entamoeba histolytica*. **Infection and Immunity**, **71**:964-972, 2003.

- HUSTON, C.D., HAQUE, R., PETRI, W.A. Molecular-based diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, **22**:1-11, 1999.
- JACKSON, T.F.H.G., GATHIRAM, V., SUPARSAD, S., ANDERSON, C.A. Stability of the zymodemes of *Entamoeba histolytica* in culture. **Archives of Medical Research**, **23**:71, 1992.
- JACKSON, T.F.H.G., SUPARSAD, S. Zymodeme stability of the *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Archives of Medical Research (Supplement)**, **28**:304-305, 1997.
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LOSCHER, T., RINDER, H. Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **51**:115-118, 1994.
- KAUR, U., SHARMA, A.K., SHARMA, M., VOHRA, H. Distribution of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin-specific antibody response in an endemic area. **Scandinavian Journal of Immunology**, **60**:524-528, 2004.
- KEENE, W.E., HIDALGO, M.E., OROZCO, E., MCKERROW, J.H. *Entamoeba histolytica*: correlation of the cytopathic effect of virulent trophozoites with secretion of a cysteine proteinase. **Experimental Parasitology**, **71**:199-206, 1990.
- KEENE, W.E., PETITT, M.G., ALLEN, S., MCKERROW, J.H. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Experimental Medicine**, **163**:536-549, 1986.
- KELSALL, B.L., JACKSON, T.G.F.H., GATHIRAM, V., SALIG, S.B.,

- VAITHILINGUM, M., PEARSON, R.D., RAVDIN, J.I. Secretory immunoglobulin A antibodies to the galactose-inhibitable adherence protein in the saliva of patients with amebic liver disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 4:454-459, 1994.
- KRETSCHMER, R.R. Amebiasis: características de su comportamiento inmunológico. **Revista de Gastroenterología de México**, 54:157-161, 1989.
- KRUPP, I.M. Antibody response in intestinal and extraintestinal amebiasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 19:57-62, 1970.
- LAVENTHAL, R., CHEADLE, R. Protozoa. In: **Parasitología Médica: Texto e Atlas**. Laventhal, R., Cheadle, R (eds.), São Paulo (SP), Editorial Premier Ltda. 1997. p. 55-71.
- LAWFORD, R., SORRELL, T.C. Amebic abscess of the spleen complicated by metronidazole-induced neurotoxicity: case report. **Clinical Infectious Diseases**, 19:346-348, 1994.
- LEIPPE, M. Amoebapores. **Parasitology Today**, 13:178-183, 1997.
- LEIPPE, M., BRUHN, H., HECHT, O., GROTZINGER, J. Ancient weapons: the three-dimensional structure of amoebapore A. **Trends in Parasitology**, 21:5-7, 2005.
- LOFTUS, B., ANDERSON, I., DAVIES, R., ALSMARK, U.C., SAMUELSON, J., AMEDEO, P., RONCAGLIA, P., BERRIMAN, M., HIRT, R.P., MANN, B.J., NOZAKI, T., SUH, B., POP, M., DUCHENE, M., ACKERS, J., TANNICH, E., LEIPPE, M., HOFER, M., BRUCHHAUS, I., WILLHOEFT, U., BHATTACHARYA, A., CHILLINGWORTH, T., CHURCHER, C., HANCE, Z.,

- HARRIS, B., HARRIS, D., JAGELS, K., MOULE, S., MUNGALL, K., ORMOND, D., SQUARES, R., WHITEHEAD, S., QUAIL, M.A., RABBINOWITSCH, E., NORBERTCZAKM, H., PRICE, C., WANG, Z., GUILLEN, N., GILCHRIST, C., STROUP, S.E., BHATTACHARYA, S., LOHIA, A., FOSTER, P.G., SICHERITZ-PONTEN, T., WEBER, C., SINGH, U., MUKHERJEE, C., EL-SAYED, N.M., PETRI, W.A., CLARK, C.G., EMBLEY, T.M., BARRELL, B., FRASER, C.M., HALL, N. The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **Nature**, **433**:865-868, 2005.
- LOTTER, H., ZHANG, T., SEYDEL, K.B., STANLEY JR, S.L., TANNICH, E. Identification of an epitope on the *Entamoeba histolytica* 170-kDa lectin conferring antibody-mediated protection against invasive amebiasis. **The Journal of Experimental Medicine**, **185**:1793-1801, 1997.
- LONG-KRUG, S.A., FISCHER, K.J., HYSMITH, R.M., RAVDIN, J.I. Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. **The Journal of Infectious Diseases**, **152**:536-541, 1985.
- MACHADO, R.L.D., ARRUDA, J.E.G., MENDES, I.G., ESTEVES, P., PÓVOA, M.M. Prevalência de *Entamoeba histolytica* em uma amostra da população de Belém/PA, pela detecção de antígenos em teste de ELISA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32 (Suplemento)**:315, 1999.
- MACKENSTEDT, U., JOHNSON, A.M. Genetic differentiation of pathogenic and nonpathogenic strains of *Entamoeba histolytica* by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, **81**: 217-221, 1995.

- MATA, R.R., AVILA, E.E. Inhibition of proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* by human colostrum IgA antibodies. **Archives of Medical Research**, **28**:S256-S258, 1997.
- MARTÍNEZ, A.M. **Perfil isoenzimático de cepas de *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) provenientes das regiões Amazônica e sudeste do Brasil e mantidas sob diferentes condições de cultivo.** Dissertação de Mestrado, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1993.
- MARTÍNEZ, A.M., GOMES, M.A., VIANA, J.C., ROMANHA, A.J., SILVA, E.F. Isoenzyme profile as parameter to differentiate pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **38**:407-412, 1996.
- MARTÍNEZ-BAEZ, M. Introducción histórica. *In: Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (ed.). Editorial Medica Panamericana, Bogotá, 1989, p.:11-16.
- MARTÍNEZ-PALOMO, A. Biología de la *Entamoeba histolytica*. *In: Amibiasis*. Martínez-Palomo, A. (ed.). Editorial Medica Panamericana, Bogotá, 1989, p.:17-41.
- MARTINS, S.J., MENEZES, R.C. Parasitose intestinal entre os índios parakanã. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **27 (Suplemento)**: 332, 1994,
- MCCOY, J.J., MANN, B.J., PETRI JR., W.A. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. **Infection and Immunity**, **62**:3045-3050, 1994.
- MCMILLAN, A., MCNEILLAGE, G.J. Comparison of the sensitivity of microscopy and culture in the laboratory diagnosis of intestinal protozoal

- infection. **Journal of Clinical Pathology**, **37**:809-811, 1984.
- MIRANDA, R.A., XAVIER, F.B., MENEZES, R.C. Intestinal parasitism in a Parakana indigenous community in southwestern Para State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **14**:507-511, 1998.
- MIRELMAN, D., BRACHA, R., WEXLER, A., CHAYEN, A. Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. **Infection and Immunity**, **54**:827-832, 1986.
- MIRELMAN, D., NUCHAMOWITZ, Y., STOLARSKY, T. Comparison of use of enzyme-linked immunosorbent assay-based kits and PCR amplification of rRNA genes for simultaneous detection of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar*. **Journal of Clinical Microbiology**, **35**:2405-2407, 1997.
- MONCADA, D., KELLER, K., CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* cysteine proteinases disrupt the polymeric structure of colonic mucin and alter its protective function. **Infection and Immunity**, **71**:838-844, 2003.
- MONTFORT, I., OLIVOS, A., PEREZ-TAMAYO, R. Phagocytosis and proteinase activity are not related to pathogenicity of *E. histolytica*. **Parasitology Research**, **79**:160-162, 1993.
- MYJAK, P., KUR, J., PIETKIEWICZ, H., KOTLOWSKI, A., NAHORSKI, W., SZOSTAKOWSKI, B. Molecular differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* from stool and culture samples obtained from Polish Citizens infected in tropics and in Poland. **Acta Protozoologica**, **39**:217-224, 2000.
- MUNGUIA, B.C., ROBLES, A.G., ESPINOSA-CASTELLANO, M., RAMOS, A.R.C., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Entamoeba dispar*: ultrastructure and

- cytopathic effect. **Archives of Medical Research, 28 (Supplement):S116-S118, 1997.**
- NOHMI, N. **Parasitoses intestinais, contribuição ao seu estudo em Macapá, Território Federal do Amapá.** Tese de Livre Docência, Escola de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, 1974.
- NOZAKI, T., MOTTA, S.R.N., TAKEUCHI, T., KOBAYNOZAKI, T., DA SILVA ACA., I., OKUZAWA, E., TAKEUCHI, T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the northeast of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 84:387-388, 1990.**
- NUNEZ, Y.O., FERNANDEZ, M.A., TORRES-NUNEZ, D., SILVA, J.A., MONTANO, I., MAESTRE, J.L., FONTE, L. Multiplex polymerase chain reaction amplification and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* DNA from stool samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 64:293-297, 2001.**
- OCÁDIZ, R., OROZCO, E., CARRILLO, E., QUINTAS, L.I., ORTEGA-LOPEZ, J., GARCIA-PEREZ, R.M., SANCHEZ, T., CASTILLO-JUAREZ, B.A., GARCIA-RIVERA, G., RODRIGUEZ, M.A. EhCP112 is an *Entamoeba histolytica* secreted cysteine protease that may be involved in the parasite-virulence. **Cellular Microbiology, 7:221-32, 2005.**
- OROZCO, E., GUARNEROS, G., MARTÍNEZ-PALOMO, A., SANCHEZ, T. *Entamoeba histolytica*. Phagocytosis as a virulence factor. **Journal of Experimental Medicine, 158:1511-1521, 1983.**
- OROZCO, E., MARTINEZ-PALOMO, A., LOPEZ-REVILLA, R. An in vitro model

- for the quantitative study of *E. histolytica* virulence. **Archives of Investigation Medicine, 9 (Supplement):**257-260, 1978.
- OROZCO, E., SOLIS, F.J., DOMINGUEZ, J., CHAVEZ, B., HERNANDEZ, F. *Entamoeba histolytica*: cell cycle and nuclear division. **Experimental Parasitology, 67:**85-95, 1988.
- ORTIZ-ORTIZ, L., MORA, N., ZAMBRANO-VILLA, S.A., CARRERO, J.C., SANCHEZ-ZERPA, M., OSUNA, A., ROSALES-BORJAS, D.M. Secretory immune response in patients with intestinal amoebiasis. **Parasite Immunology, 20:**503-507, 1998.
- ORTNER, S., CLARK, C.G., SCHEINER, O., WIEDERMANN, G., DUCHENE, M. Molecular biology of hexokinase isoenzyme pattern that distinguishes pathogenic *Entamoeba histolytica* from nonpathogenic *Entamoeba dispar*. **Molecular and Biochemical Parasitology, 86:**85-94, 1997.
- PARDAL, P.P. Estudo epidemiológico, clínico e laboratorial do abscesso hepático amebiano no Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 24:**138. 1991.
- PARIJA, S.C., RAO, R.S.. Stool culture as a diagnostic aid in the detection of *Entamoeba histolytica* in the faecal specimens. **The Indian Journal of Pathology and Microbiology, 38:**359-363, 1995.
- PENA, S.D., BARRETO, G., VAGO, A.R., DE MARCO, L., REINACH, F.C., DIAS NETO, E., SIMPSON, A.J. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proceedings of the National Academy Science, USA, 91:**1946-1949, 1994.

- PETRI JR., W.A. Pathogenesis of amebiasis. **Current Opinion in Microbiology**, 5:443-447, 2002.
- PETRI JR, W.A. Subunit structure of the galactose and N-acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **Journal of Biological Chemistry**, 264:3007-3012, 1989.
- PIMENTA, P.F.P., DIAMOND, L.S. Comparative ultrastructural studies of the cell surface and endocytic vacuoles of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 and *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. **Archives of Medical Research**, 28:S113-S115, 1997.
- PINHEIRO, S.M.B., CARNEIRO, R.M., ACA, I.S., IRMÃO, J.I., MORAIS JR, M.A., COIMBRA, M.R.M., CARVALHO, L.B. Determination of the prevalence of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* in the Pernambuco state of northeastern Brazil by a polymerase chain reaction. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 70:221-224, 2004.
- PÓVOA, M.M., ARRUDA, J.E., SILVA, M.C., BICHARA, C.N., ESTEVES, P., GABBAY, Y.B., MACHADO, R.L. Diagnosis of intestinal amebiasis using coproscopic and immunological methods in a population sample in greater metropolitan Belem, Para, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 16:843-846, 2000.
- PRADO, M.S., BARRETO, M.L., STRINA, A., FARIA, A.S., NOBRE, A.A., JESUS, S.R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 34:99-101, 2001.
- PRAKASH, A., CHARKRABORTI, A., MAHAJAN, R.C., GANGULY, N.K. DNA

- polymorphism in North Indian isolates of *Entamoeba histolytica* detected by PCR fingerprint. **Parasitology Research**, **88**:126-129, 2002.
- PRATHAP, K., GILMAN, R. The histopathology of acute intestinal amebiasis. A rectal biopsy study. **American Journal of Pathology** , **60**:229-245, 1970.
- PROCTOR, E.M. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Laboratory Medicine**, **11**:829-859, 1991.
- QUE, X., KIM, S., SAJID, M., ECKMANN, L., DINARELLO, C.A., MCKERROW, J.H., REED, S.L. A surface amebic cysteine proteinase inactivates interleukin-18. **Infection and Immunity**, **71**:1274-1280, 2003.
- QUE, X., REED, S.L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of *Entamoeba histolytica* invasion. **Parasitology Today**, **13**:190-194, 1997.
- RAMOS, F., VALENZUELA, O., MORAN, P., GONZALES, E., RAMIRO, M., CEDILLO, R., MARTINEZ, M.C., GOMEZ, A., MUÑOZ, O., MELENDRO, E.I., XIMENEZ, C. Anti - *E. histolytica* IgA antibodies in saliva of *E. histolytica* or *E. dispar* infected individuals: Longitudinal study of cohorts. **Archives of Medical Research**, **28**:327-329, 1997.
- RAVDIN, J.I. Cell biology of *Entamoeba histolytica* and immunology of amebiasis. *In: Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica*. Ravdin, J.I. (ed). Editora Hardicover. New York, 1988, p:127-149.
- RAVDIN, J.I. *Entamoeba histolytica*: from adherence to enteropathy. **The Journal of Infectious Diseases**, **159**:420-429, 1989.
- RAVDIN, J.I., JACKSON, T.F.H.G., PETRI JR., W.A., MURPHY, C.F., UNGAR, B.L.P., GATHIRAM, V., SKILOGIANNIS, J., SIMJEE, A.E. Association of

- serum antibodies to adherence lectin with invasive amebiasis and asymptomatic infection with pathogenic *Entamoeba histolytica*. **The Journal of Infectious Diseases**, **162**:768-772, 1990.
- REED, S.L., RAVDIN, J.I. Amebiasis. *In: Infections of the Gastrointestinal Tract*. Blaser, M.I., Ravdin, J.I., Smith, D.P., Greenberg, H.B., Guerrant, R.L. (eds.). Raven Press, New York, 1995, p. 1065-1080.
- REED, S.L., BOUVIER, J., POLLACK, A.S., ENGEL, J.C., BROWN, M., HIRATA, K., QUE, X., EAKIN, A., HAGBLOM, P., GILLIN, F.D., MCKERROW, J.H. Cloning of a virulence factor of *Entamoeba histolytica* pathogenic strains posses a unique cysteine proetinase gene. **Journal of Clinical Investigation**, **91**:1532-1540, 1993.
- REY, L. Amebíase. *In: Parasitologia Médica*. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1991, p. 252-265.
- ROBINSON, G.L. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **62**:285-294, 1968.
- RODRIGUES, L.C.S. **Estudo morfológico e ultraestrutural de cepas brasileiras patogênicas e não patogênica de *Entamoeba histolityca***. Dissertação (Mestrado em Biofísica) - Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2000. 115p.
- RODRIGUES FILHO, A., LEITE, J.M., VIANNA, C., ARAÚJO, R., MANESCHY, L., SOARES, E.C. Abscesso amebiano do fígado: Estudo clínico e anátomo-patológico de 13 casos. **Revista de Ciências Biológicas de Belém**, **1**:163-176, 1963.

- RODRIGUEZ, C.F. Epidemiología de la amebiasis en Colombia. **Revista de La Universidad Industrial de Santander**, **13**:83-100, 1985.
- ROMERO, J.L., DESCOTEAUX, S., REED, S., OROZCO, E., SANTOS, J., SAMEULSON, J. Use of polymerase chain reaction and nonradioactive DNA probes to diagnose *Entamoeba histolytica* in clinical samples. **Archives of Medical Research**, **23**:277-279, 1992.
- SALATA, R.A., RAVDIN, J.I. N-Acetyl-D-galactosamine-inhibitable adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. II. Mitogenic activity for human lymphocytes. **The Journal of Infectious Diseases**, **151**:816-822, 1985.
- SALLES, J.M., MORAES, L.A., SALLES, M.C. Hepatic amebiasis. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, **7**:96-110, 2003.
- SALLES, J.M.C., SALLES, M.J.C., SALLES, J.M.C. **Amebíase**. Salles, J. M. C., Salles, M. J. C., Salles, J. M. C. (eds.). Belém, 1998, 28 pp.
- SAMUELSON, J., ACUNA-SOTO, R., REED, S., BIAGI, F., WIRTH, D. DNA hybridization probe for clinical diagnosis of *Entamoeba histolytica*. **Journal Clinical Microbiology**, **27**:671-676, 1989.
- SARGEAUNT, P. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosos. **Parasitology Today**, **3**:40-43, 1987.
- SARGEAUNT, P. A survey of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (Brumpt) infections on Mahé, the Seychelles. **Archives of Medical Research**, **23**:265-267, 1992.
- SARGEAUNT, P.G., JACKSON, T.F.H.G., SIMJEE, A. Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. **The Lancet**, **19**:1386-1388, 1982.

- SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E. Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **73**:225-227, 1979.
- SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E., GREENE, J.D. The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme eletrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **72**:519-521, 1978.
- SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E., KUMATE, J., JIMENEZ, E. The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico City. A pilot survey. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **74**:653-656, 1980b.
- SARGEAUNT, P.G., WILLIAMS, J.E., NEAL, R.A. A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH:200, HK9, etc.), "*E. histolytica*-like" and other morfologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **74**:469-474, 1980a.
- SCHNACK, F.J., FONTANA, L.M., BARBOSA, P.R., SILVA, L.S., BAILLARGEON, C.M., BARICHELLO, T., PÓVOA, M.M., CAVASINI, C.E., MACHADO, R.L. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants (< 5 years old) in a population sample in Greater Metropolitan Criciúma, Santa Catarina State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **19**:1205-1208, 2003.
- SEOBO, S.I.M., KIM, K.A., YONG, T., PARK, S., IM, K., SHIN, M.H. Ultrastructural observation of human neutrophils during apoptotic cell death

- triggered by *Entamoeba histolytica*. **The Korean Journal of Parasitology**, **42**: 205-208, 2004.
- SHARMA, M.P., DASARATHY, S., SUSHMA, S., VERMA, N. Variants of amebic liver abscess. **Archives of Medical Research**, **28**:S272-S273, 1997.
- SHIBAYAMA, M., CAMPOS-RODRIGUEZ, R., RAMIREZ-ROSALES, A., MARTINEZ-PALOMO, A., TSUTSUMI, V. Morphological analysis of amebic liver abscess produced by intraperitoneal inoculation of *Entamoeba histolytica* trophozoites in hamster. **Archives of Medical Research**, **28**:S207-S210, 1997.
- SILVA, E.F. *Entamoeba moscovskii*, 1941: Novos focos na América do Sul, aspectos da morfologia e biologia em comparação com *E. histolytica* Shaudinn, 1903 e a *R. ranarum* (Grassi, 1879). Tese de Mestrado, Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1972.
- SILVA, M.C.S., MALHEIRO, D.M.L., ESTEVES, P., PÓVOA, M.M. Prevalência da amebíase por anticorpos IgG através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em uma amostra da população de Belém (PA). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32 (Suplemento)**:316, 1999.
- SILVA, E.B., NETO, L.C., GUERRA, A.L.S., GOMES, G.A.R. Estudo clínico de abscesso hepático em crianças. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31 (Suplemento)**: 141, 1988.
- SPENCER, H.C., MUCHNICK, C., SEXTON, D.J., DODSON, P., WALLS, K.W. Endemic amebiasis in an extended family. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **26**:628-635, 1977.
- STANLEY JR, S.L. Pathophysiology of amoebiasis. **Trends in Parasitology**,

- 17:280-285, 2001.
- TACHIBANA, H., KOBAYASHI, S., PAZ, K.C., ACA, I.S., TATENO, S., IHARA, S. Analysis of pathogenicity by restriction-endonuclease digestion of amplified genomic DNA of *Entamoeba histolytica* isolated in Pernambuco, Brazil. **Parasitology Research**, **78**:433-436, 1992.
- TANNICH, E., BURCHARD, G.D. Differentiation of pathogenic from non pathogenic *Entamoeba histolytica* by restriction fragment analysis gene amplified in vitro. **Journal Clinical of Microbiology**, **28**:250-255, 1991.
- TANNICH, E., EBERT, F. HORSTMANN, R.D. Primary structure of the 170-kDa surface lectin of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy Science, USA**, **88**:1849-1853, 1991.
- TANNICH, E., HORSTMANN, R.D., KNOBLOCH, J., ARNOLD, H.H. Genomic DNA differences between pathogenic and non-pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica*. **Proceedings of the National Academy Science, USA**, **86**:5118, 1989.
- TANYUKSEL, M., PETRI, W.A. Laboratory diagnosis of amebiasis. **Clinical Microbiology**, **16**:713-729, 2003.
- TAVARES, P., RIGOTHIER, M.C., KHUN, H., ROUX, P., HUERRE, M., GUILLEN N. Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: a delicate balance. **Infection and Immunity**, **73**:1771-1778, 2005.
- TAVARES-DIAS, M., GRANDINI, A.G. Prevalência e aspectos epidemiológicos de enteroparasitoses na população de São José da Bela Vista, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **32**:63-65, 1999.

- TORIAN, B.E., REED, S.L., FLORES, B.M., CREELY, C.M., COWARD, J.E., VIAL, K., STAMM, W.E. The 96-kilodalton antigen as an integral membrane protein in pathogenic *Entamoeba histolytica*: potential differences in pathogenic and nonpathogenic isolates. **Infection and Immunity**, **58**:753-760, 1990.
- TORIAN, B.E., REED, S.L., FLORES, B.M., FLORDE, J., STAMM, W.E. Serologic response to the 96,000-Da surface antigen of pathogenic *Entamoeba histolytica*. **Journal of Infectious Diseases**, **159**:794-797, 1989.
- TOVAR, J., FISCHER, A., CLARK, C.G. The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. **Molecular Microbiology**, **32**:1013-1021, 1999.
- TRISSEL, D., MARTÍNEZ-PALOMO, A., DE LA TORRE, M., DE LA HOZ, R., PEREZ DE SUAREZ, E. Phagocytosis of human erythrocytes by *Entamoeba histolytica*. Quantitative study. **Archives of Investigation Medicine**, **9(Supplement)**:219-222, 1978a.
- TRISSEL, D., MARTÍNEZ-PALOMO, A., DE LA TORRE, M., DE LA HOZ, R., PEREZ DE SUAREZ, E. Surface properties of *Entamoeba*: increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. **Journal of Experimental Medicine**, **148**:1137-1143, 1978b.
- TSUTSUMI, V. Los modelos experimentales *in vivo* en la amibiasis. **Gaceta Médica de México**, **130**:450-453, 1994.
- TSUTSUMI, V., RAMIREZ-ROSALES, A., LANZ-MENDOZA, H., SHIBAYAMA, M., CHAVEZ, B., RANGEL-LOPEZ, E., MARTÍNEZ-PALOMO, A. *Entamoeba histolytica*: erythrophagocytosis, collagenolysis, and liver abscess

- production as virulence markers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **86**:170-172, 1992.
- VALLE, P.R., SOUZA, M.B.G., PIRES, E.M., SILVA, E.F., GOMES, M.A. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA and DNA in *Entamoeba histolytica*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **42**:249-253, 2000.
- VARGAS, M., ISIBASI, A., KUMATE, J., OROZCO, E. Diferencias moleculares entre amibas patógenas y no patógenas de *Entamoeba histolytica*. *Archivos of Investigación Médica*, **21**:217-221, 1990.
- VIANNA, E.N., BENNETON, M.L.F.N., SILVA, M.C.M., FREITAS, M.A.R., SILVA, E.F., GOMES, M.A. Standardization to identify cysts of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* from fecal specimens. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45(Suplemento 13)**:168, 2003.
- VINAYAK, V.K., SHANDIL, R.K., BANSAL, V., SINGH, K., BHASIN, D.K. Uses and limitations in the demonstration of specific circulating immune complexes in patients with amoebiasis. **Journal of Medical Microbiology**, **32**:87-91, 1990.
- VINES, R.R., RAMAKRISHNAN, G., ROGERS, J.B., LOCKHART, L.A., MANN, B.J., PETRI JR, W.A. Regulation of adherence and virulence by the *Entamoeba histolytica* lectin cytoplasmic domain, which contains a β 2 integrin motif. **Molecular Biology of the Cell**, **9**:2069-2079, 1998.
- VOHRA, H., MAHAJAN, R.C., GANGUKY, N.K. Role of serum in regulating the *Entamoeba histolytica* cell cycle: a flowcytometric analysis. **Parasitology Research**, **84**:835-838, 1998.

- VOIGT, H., GUILLEN, N. New insights into the role of the cytoskeleton in phagocytosis of *Entamoeba histolytica*. **Cellular Microbiology**, 1:195-204, 1999.
- WALSH, J.A. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis, estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. **Revised Infection Disease**, 8:228, 1986.
- WILHOFERT, U., CAMPOS-GONGORA, E., TOUZNI, S., BRUCHHAUS, I., TANNICH E. Introns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Protist**, 152:149-156, 2001.
- WILLHOFERT, U., HAMANN, L., TANNICH, E. A DNA sequence corresponding to the gene encoding cysteine proteinase 5 in *Entamoeba histolytica* is present and positionally conserved but highly degenerated in *Entamoeba dispar*. **Infection and Immunity**, 67:5925-5929, 1999.
- WILLHOFERT, U., TANNICH, E. The electrophoretic karyotype of *Entamoeba histolytica*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 99:41-53, 1999.
- WITTNER, M. Role of bacteria in modifying the virulence of *Entamoeba histolytica* studies of amoeba from axenic cultures. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 19:755-761, 1970.
- WHO/PAHO/UNESCO report. A consultation of experts on amoebiasis. Proceeding of the XIII Seminar on Amebiasis. **Archives of Medical Research**, 28 (*Special Issue*). 1997.
- YU, Y., CHADEE, K. *Entamoeba histolytica* stimulates interleukin 8 from human colonic epithelial cell without parasite-enterocyte contact. **Gastroenterology**, 112:1536-1547, 1997.

- ZAKI, M., CLARK, C.G. Isolation and characterization of polymorphic DNA from *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Microbiology**, **39**:897-905, 2001.
- ZAKI, M., MEELU, P., SUN, W., CLARK, C.G. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. **Journal of Clinical Microbiology**, **40**:1271-1276, 2002.
- ZAKI, M., REDDY, S.G., JACKSON, T.F., RAVDIN, J.I., CLARK, C.G. Genotyping of *Entamoeba* species in South Africa: diversity, stability, and transmission patterns within families. **Journal of Infectious Disease**, **187**:1860-1869, 2003.
- ZENGZHU, G., BRACHA, R., NUCHAMOWITZ, Y., CHENG, W., MIRELMAN, D. Analysis by enzyme-linked immunosorbent assay and PCR of human liver abscess aspirates from patients in China for *Entamoeba histolytica*. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**:3034-3036, 1999.

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____ RG: _____
 Idade: _____ Local onde nasceu: _____
 Endereço: _____ Tel: _____
 Cidade: _____ Estado: _____

2. DADOS SOBRE O ESTUDO

Título: **EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Entamoeba histolytica* E *E. dispar* DA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.** Responsáveis pelo projeto: Dra. Mônica Silva e Dra. Marinete Póvoa

3. CARTA INFORMATIVA AO PACIENTE

A amebíase é uma doença que ataca muitas pessoas. A ameba é o “bichinho” que causa a doença e os principais sintomas são dor de barriga e diarreia. Este “bichinho” pode ir para o seu fígado e causar doença grave. A gente pega a doença comendo alimentos ou bebendo água contaminados com o “bichinho”. Para você saber se está com este “bichinho”, precisa fazer exame nas fezes e algumas vezes no sangue e no fígado. As instituições de saúde estão interessadas em saber como está a situação da doença nas pessoas desta cidade, e por isso a nossa equipe vai fazer este trabalho. Pedimos a sua ajuda para dar um pouco de suas fezes e de seu sangue para nós fazermos os exames. Os exames não custarão nada e em caso de resultados positivos, será feito o seu tratamento. Sua participação será muito importante no estudo da doença e será garantido que só você saberá o resultado do seu exame.

4. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE

Fui esclarecido(a) dos objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos?

() SIM () NÃO

Fui esclarecido(a) sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto a continuidade do meu tratamento?

() SIM () NÃO

Fui esclarecido(a) de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo?

() SIM () NÃO

Fui esclarecido(a) de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão?

() SIM () NÃO

Fui esclarecido(a) sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?

() SIM () NÃO

5. CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Eu, abaixo assinado, declaro que após ter sido esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, concordo em participar do mesmo, na qualidade de paciente.

Belém, ____ de _____ de _____

Assinatura do paciente ou responsável legal
 RG _____

Assinatura de um membro do projeto

OBS: em caso de dúvidas entre em contato com a Dra. Mônica ou a Dra. Marinete na Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas pelos telefones 214-2148 ou 214-2143.

ANEXO 2

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS / SERVIÇO DE PARASITOLOGIA

Fone: (091) 214-2148 - 214-2143

PROJETO: EPIDEMIOLOGIA DA AMEBÍASE E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Entamoeba histolytica* E *E. dispar* DA CIDADE DE BELÉM, PARÁ.

Ficha Epidemiológica

No da amostra:.....Data:.....
 Nome:..... Sexo: () F () M
 Idade:..... Local de Nascimento:.....
 Endereço:.....Tel.:.....
 Quanto tempo mora neste endereço?

Como são seus hábitos alimentares e de higiene:

Bebe água: () mineral () fervida () torneira () filtrada () rio () coada () poço

Consome alimento cru?() Sim () Não. Quais?.....

Lava os alimentos antes de comer? () Sim () Não

Lava as mãos antes de consumir alimento? () Sim () Não

Lava as mãos após o uso do banheiro?() Sim () Não

Consome frequentemente alimentos: () rua () casa () restaurante

Consome alimento de: () feira () supermercado () outros

Ingere bebida alcoólica?() Sim () Não. Há quanto tempo?

Já teve amebíase?() Sim () Não. Há quanto tempo?.....

Quais os sintomas?.....

Sintomas atuais:

Náuseas? () Sim () Não

Vômito? () Sim () Não

Diarréia? () Sim () Não. Com sangue? () Sim () Não.

Quantos episódios ao dia?.....

Dores abdominais? () Sim () Não

Constipação intestinal? () Sim () Não

Febre? () Sim () Não

OBS:

ANEXO 3**Meio de Cultura para Isolamento de *E. histolytica*/*E. dispar***Preparo dos Reagentes:**1 - Caldo Básico:**

Na ₂ HPO ₄	-----	1,25 g
KH ₂ PO ₄	-----	0,42 g
NaCl	-----	7,27 g
Extrato de levedura	-----	1,45 g
H ₂ O destilada q.s.p.	-----	1.000 mL

Dissolver os reagentes em 1.000 mL de água destilada e ajustar o pH para 7,2-7,4 com NaOH 1N (4 g/100 mL de água destilada). Transferir para um frasco de vidro com tampa. Esterilizar por 20-30 min a 120°C (autoclave). Após esfriar acondicionar no freezer até sua utilização.

Obs: o caldo básico deve ser esterelizado logo após o seu preparo.

2 - Soro Bovino ou Equino:

Para cada 1.000 mL de caldo básico utilizar 50 mL de soro bovino (ou equino) adulto que deve estar estéril e inativado em banho maria a 56°C por 30-50 min.

Obs: O soro deve ser esterilizado por filtração e nunca por calor.

3 - Amido:

Diluir 1 g de amido de arroz estéril em 5 mL de água destilada (ou caldo básico) estéril para cada 1.000 mL de caldo básico.

Obs: esterilizar o grama de amido por 3 h em estufa a 120°C em um vidro com tampa de rosca.

4 - Penicilina G (Benzylpenicillin-Potassium Salt. 10.000.000 units. SIGMA) e Estreptomicina (Streptomycin Sulfate. SIGMA):

Diluir 0,6 g de cada reagente em 5 mL de água destilada e esterilizar por filtração. Utilizar 5 mL de cada para 1.000 mL de caldo básico.

Para obtenção do meio Pavlova completo utilizar:

1.000 m L de caldo básico

50 mL de soro bovino ou equino adulto

5 mL de amido

5 mL de penicilina

5 mL de estreptomicina

Aliquotar 5 mL em tubos de vidro estéreis com tampa de algodão e gase. Fazer a prova de esterilidade (24 h/37°C) e guardar os tubos em geladeira.

OBS: preparar e aliquotar o meio sob condições de esterilidade.

ANEXO 4

Preparo do Estabilizador Enzimático (pH 7,0):

1 - Solução de EDTA.Na₂ 200 mM

Acertar o pH para 7,0 com NaOH 10 N.

2 - Solução estoque:

a) Solução A = Dissolver o Ditioneitol (DTT) em Etilenodiaminotetracetato bissódico (EDTA) 200 mM na proporção indicada abaixo,

b) Solução B = Dissolver o Ácido E-amino capróico (ACA) em EDTA 200 mM na solução acima, de acordo com a proporção indicada abaixo:

EDTA 200 mM	1 mL	2 mL	3 mL	5 mL
Sol. A (DTT)	0,03086 g	0,06172 g	0,09258 g	0,01543 g
Sol. B (ACA)	0,02624 g	0,05248 g	0,07872 g	0,01312 g

c) A solução estoque terá 200 mM de cada substância e deverá ser aliqüotada a cada 5 µL ou 10 µL.

3 - Solução estabilizadora para uso:

Diluir a solução estoque 100 vezes:

a) adicionar 495 µL de água deionizada para cada alíquota de 5 µL;

b) adicionar 990 µL de água deionizada para cada alíquota de 10 µL.

ANEXO 5**Soluções Tampão Utilizadas na Eletroforese****1 - Tampão de corrida (Peptidase pH 8,6)**

Tris 0,33 M -----	40,03 g
Ác. cítrico 0,0415 M -----	8,72 g
H ₂ O destilada q.s.p. -----	1.000 mL

Misturar os reagentes acima em 1.000 mL de H₂O destilada q.s.p. até completa diluição. Caso necessário, ajustar o pH para 8,6 com NaOH 1N. Guardar em a geladeira até o seu uso.

2 - Tampão de revelação (Tris/HCl pH 7,4)

Tris -----	40,0 g
H ₂ O destilada q.s.p. -----	1.000 mL

Misturar o Tris em 1.000 mL de H₂O destilada q.s.p. até completa diluição. Caso necessário, ajustar o pH para 7,4 utilizando HCl concentrado.