

---

## AMEBÍASE

---

---

---

---

Thiago Guimarães Pires Cordeiro e Heloisa Werneck de Macedo <sup>1</sup>

### RESUMO

A amebíase é a segunda principal causa de morte por parasito em todo o mundo. O protozoário responsável, *Entamoeba histolytica*, apresenta elevada patogenicidade. É capaz de secretar proteases que dissolvem o tecido do hospedeiro, matar suas células por contato, fagocitar eritrócitos e invadir a mucosa intestinal causando a colite amebiana. Em alguns casos, este parasito é capaz de romper a barreira da mucosa intestinal e chegar ao fígado por meio da circulação porta, onde pode causar abscesso que cresce rapidamente e é quase sempre fatal. Evidências baseadas apenas na morfologia apontavam a existência de uma única espécie. No entanto, estudos mais modernos mostraram que, na realidade, há duas espécies geneticamente bem distintas, denominadas *Entamoeba histolytica* (patogênica) e *Entamoeba dispar* (não patogênica ou comensal).

**DESCRITORES:** *Entamoeba histolytica*. Amebíase. Colite intestinal. Abscesso hepático.

### INTRODUÇÃO

Amebíase é uma infecção causada no ser humano pelo protozoário parasito *E. histolytica*. É uma das formas mais primitivas de protozoário, sendo extremamente frágil, pleomórfica e sensível a mudanças de temperatura (Martinez-Palomo, 1988). Pertence a um grupo maior de amebas, da família Entamoebidae, que são parasitos comuns da nossa espécie. Integra o grupo das Entamoebas, ou amebas interiores, porque geralmente são encontradas no interior de animais vertebrados.

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

---

1 Departamento de Patologia, Universidade Federal Fluminense.

Endereço para correspondência: Thiago Guimarães Pires Cordeiro, Hospital Universitário Antônio Pedro, Rua Marquês do Paraná, 303, 4º andar, sala 1. Niterói, RJ, CEP 24.030-210, Brasil.

Recebido para publicação em: 23/8/2006. Revisto em: 28/3/2007. Aceito em: 9/4/2007.

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

A forma cística é uma estrutura esférica que apresenta 10 a 20 µm de diâmetro. Sua parede é rígida e resistente em virtude da presença de quitina e glicoproteínas. Contém de um a quatro núcleos com as mesmas características dos núcleos dos trofozoítos. No citoplasma dos cistos, observa-se a presença de vacúolos de glicogênio e de corpos cromatóides em forma de bastonetes com ponta arredondada. À medida que amadurecem, os corpos cromatóides e os vacúolos vão desaparecendo. Segundo Ravdin (1988), os corpos cromatóides são massas de ribossomas e estão envolvidos com a síntese de proteínas.

O presente trabalho apresenta uma breve revisão do parasito *E. histolytica*, destacando aspectos da sua virulência e sintomatologia.

## O PARASITO

Os trofozoítos de *E. histolytica* são considerados microaerófilos por não possuírem mitocôndrias e citocromos, embora executem a via metabólica clássica, apresentando o sistema de malato desidrogenase e álcool desidrogenase. Eles apresentam uma limitada capacidade de consumir oxigênio, sendo capazes de crescer em uma atmosfera com até 5% de oxigênio (Silva, 1997). Os parasitos fagocitam bactérias e partículas de alimento e se reproduzem por divisão binária.

*E. histolytica* encontra-se distribuída amplamente em todo o mundo. Sua prevalência é maior nos países das zonas tropicais e subtropicais, onde a população é carente e é baixo o nível de saneamento (Stauffer & Ravdin, 2003). Porém, a crescente migração de pessoas de países em desenvolvimento para países desenvolvidos favoreceu a disseminação do parasito por todo o mundo. Há grande quantidade de pessoas infectadas em regiões frias, como o Canadá, norte dos Estados Unidos e Europa. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde, mais de 100 mil indivíduos morrem anualmente vitimados pela doença, o que a torna a segunda principal causa de morte por infecção provocada por protozoário parasito (WHO, 1997; Stanley, 2003).

Durante a década de 1990, o acúmulo de várias evidências sustentou a tese da separação de duas espécies de ameba morfologicamente idênticas. Uma seria a forma não patogênica (*E. dispar*) e a outra a forma patogênica (*E. histolytica*). A primeira seria responsável pela forma não invasiva da doença, ou seja, que não causa nenhum sinal da doença ou invasão da mucosa, mesmo em pacientes com AIDS (Moran, 2005). São atribuídos a ela 90% dos casos clínicos assintomáticos no mundo (Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000). Já a segunda é o agente causador da colite amebiana e de todas as formas da amebíase extra-intestinal, sendo responsável pelo acometimento de 10% da população mundial. (Braga, 1998). A *E. dispar* ocorre mais freqüentemente em indivíduos do sexo feminino, enquanto *E. histolytica* tem igual prevalência em ambos os sexos (Stauffer, 2003). Vários genes, como o da galactose, lectina, ameboporos, hemolisinas e cisteíno-protease, são expressos tanto em *E. histolytica* quanto em *E. dispar*, porém a diferença quantitativa e qualitativa da expressão entre ambas as espécies é o que torna uma invasiva e a outra não invasiva (Que, 2002).

Mesmo havendo, na literatura, vários argumentos a favor, além do reconhecimento da Organização Mundial de Saúde, estudos ainda mostram certas controvérsias e muitas dúvidas quanto à separação rígida do complexo *E. histolytica/E.dispar* em duas espécies distintas (Costa, 2000; Espinosa-Cantellano & Matínez-Palomo, 2000; Costa, 2006).

## CICLO EVOLUTIVO

O homem se infecta ingerindo a forma cística madura contida em alimentos, água ou por qualquer tipo de contato fecal-oral. Também são possíveis formas menos usuais de transmissão, incluindo o sexo anal e oral e equipamentos de lavagem intestinal contaminados.

O desencistamento ocorre no intestino delgado e os trofozoítos liberados migram para o intestino grosso. Os trofozoítos multiplicam-se por divisão binária e estes sofrem o processo de encistamento, originando novos cistos que são eliminados nas fezes. Por causa da proteção conferida por sua parede, os cistos podem sobreviver dias e até semanas no meio ambiente. Os trofozoítos podem ser eliminados em fezes diarréicas, mas são rapidamente destruídos no meio externo e, se ingeridos, não sobrevivem às enzimas digestivas.

Na forma não invasiva os trofozoítos permanecem confinados no lúmen intestinal dos portadores assintomáticos, que eliminam os cistos em suas fezes. Na forma invasiva os trofozoítos invadem a mucosa intestinal e através da corrente sangüínea atingem outros órgãos como fígado, pulmão e encéfalo, causando doença extra-intestinal (Espinosa-Cantellano & Martinez-Palomo, 2000).

Para serem eliminados pelas fezes em forma de cistos (forma de resistência), os trofozoítos se arredondam (pré-cisto), reduzem seu metabolismo e começam a sintetizar a parede cística. Aparecem no citoplasma os corpos cromatóides e os

vacúolos de glicogênio. O núcleo sofre divisões múltiplas, podendo dar origem a até quatro novos núcleos, que resultam de duas divisões sucessivas. Outros sinais de um cisto maduro são percebidos também pela diminuição do número de corpos cromatóides e do tamanho do vacúolo de glicogênio. O cisto eliminado é então capaz de resistir às condições desfavoráveis do meio ambiente externo, podendo, desse modo, infectar outro indivíduo que se torna um novo hospedeiro (Ravdin, 1988).

## VIRULÊNCIA

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

Os trofozoítos de *E. histolytica*, crescidos em associação com bactérias, alimentam-se ativamente delas por fagocitose. Entretanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos de fagocitose e de digestão das bactérias e de quais os benefícios nutricionais este tipo de alimentação traz para os trofozoítos. A natureza da relação trofozoíto-bactéria parece ser um fenômeno altamente específico, no qual intervêm componentes da superfície amebiana com atividade de lectina e resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina, presentes na superfície bacteriana (Bracha, 1982; Mann, 1998).

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

Enzimas, como as cisteíno-proteases e as metalo-proteases, são reconhecidamente capazes de destruir as células intestinais causando a invasão da mucosa intestinal (Singh, 2004; Bruchhaus, 2003). As proteases são consideradas um importante fator de virulência na patogenicidade de *E. histolytica* (Padilla-Vaca, 2000).

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

Experimentos *in vitro* demonstraram que, quando os trofozoítos são associados com bactérias, podem causar modificações na expressão fenotípica da virulência amebiana e essas modificações dependem da cepa de *E. histolytica* e da espécie e cepa de bactérias utilizadas nesta associação (Anaya-Velázquez & Padilla-Vaca, 1992; Spice & Ackers, 1992; De Menezes, 1997).

## ASPECTOS CLÍNICOS

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

O início da doença ocorre quando trofozoítos de *E. histolytica* aderem às células epiteliais do cólon, provavelmente por meio de uma lectina específica, a galactose/N-acetilgalactosamina (Gal/GalNAc) que, estando na superfície dos trofozoítos, reconhece as moléculas destes açúcares presentes na superfície das células epiteliais. Células de mamíferos sem esses açúcares são resistentes à aderência do trofozoíto da ameba, mostrando o seu papel na adesão e a conhecida necessidade do contato parasito-célula para o processo de morte celular. As células epiteliais, quando aderidas pelos trofozoítos de *E. histolytica*, perdem suas funções em minutos. Perdem também seus grânulos citoplasmáticos, estruturas e, eventualmente, seus núcleos (Okada, 2006).

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

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

parasito e causa rearranjo na actina, que altera a aderência e a motilidade do parasito. Proteinases são secretadas pelos trofozoítos de *E. histolytica* e grandes quantidades de cisteíno-proteases são observadas extracelularmente no abscesso em animais. Trofozoítos de *E. histolytica* podem secretar de 10 a 1.000 vezes mais cisteíno-proteases que os de *E. dispar*. As cisteíno-proteases de *E. histolytica* digerem as proteínas da matriz extracelular, o que deve facilitar a invasão e a progressão dos trofozoítos na submucosa intestinal. Esta lesão pode apresentar uma extensão lateral na submucosa, dando lugar a ulcerações.

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

Pacientes com colite amebiana apresentam diarreia sanguinolenta e dor abdominal. O início é gradual, com pacientes relatando várias semanas de sintomas. São comuns pequenos e múltiplos volumes de fezes mucóides, porém pode ocorrer diarreia aquosa profusa. Como *E. histolytica* invade a mucosa do intestino, mesmo que o sangue não seja visível nas fezes, o exame de sangue oculto é positivo. Leucócitos podem estar presentes nas fezes, mas em quantidades inferiores à infecção bacteriana e em vários casos pode ser visualizado pus. Febre é observada em cerca de 40% dos pacientes, que podem apresentar anorexia e perda de peso. Ocasionalmente os indivíduos desenvolvem colite amebiana com diarreia sanguinolenta profusa, febre, leucocitose, dor abdominal freqüente com sinais peritoneais e extenso comprometimento do cólon. Pode ocorrer abscesso amebiano, mas a perfuração intestinal, em mais de 75% dos casos com colite amebiana fulminante, é a clínica dominante. Mulheres grávidas, indivíduos imunocomprometidos e pacientes que estejam recebendo corticóides são de alto risco para a doença fulminante, assim como a associação com diabetes e álcool.

A amebiose hepática é a forma invasiva que causa o maior número de mortes, cujo percentual varia nos diferentes estudos (Shamsuzzaman et al., 2000 a, b). É dez vezes mais comum em homens e rara em crianças (Haque et al., 2003). O exame parasitológico de fezes é geralmente negativo para cistos e/ou trofozoítos e os sintomas são agudos com menos de dez dias de duração, mas podem também ser crônicos, com anorexia, anemia e perda de peso (Stanley, 2003).

Haque e colaboradores (2001), por meio da microscopia e cultura, ou da junção de ambos os métodos, observaram, entre os pacientes diagnosticados

com amebíase por *E. histolytica*, um maior número de indivíduos com sangue visível nas fezes do que entre aqueles com diarreia de outra origem. Algum tempo depois, mostraram que estes pacientes adquiriram imunidade contra a colonização pela ameba graças à proteção da mucosa intestinal por anticorpos IgA anti-lectina (Haque et al., 2003).

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

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

Outros órgãos acometidos pela amebíase são os do sistema urinário, genital (podendo apresentar fistulas retovaginais), região perianal, pele e até osso, os quais são muito raramente observados.

## DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da colite amebiana pode ser feito pela microscopia de amostras de fezes e da mucosa do cólon de pacientes com diarreia. Esse tipo de método diagnóstico tem sido utilizado há muitos anos. Porém, os resultados dependem da habilidade dos técnicos que fazem a análise, pois a diferenciação de trofozoítos com leucócitos e outros protozoários intestinais pode ser um pouco difícil para um especialista não treinado. Com a descoberta do complexo *E. histolytica/E. dispar*, esse tipo de análise se tornou inapropriado e ineficiente, uma vez que ambas as espécies não podem ser distinguidas por sua morfologia. Alguns pesquisadores, depois de várias discussões, relataram que, dependendo da situação clínica do paciente (diarreia sanguinolenta) e das características morfológicas do parasito encontrado nas fezes (presença de eritrócitos fagocitados por *E. histolytica*), o diagnóstico pela microscopia é aceitável. Entretanto, este diagnóstico pode estar errado quando se tem um paciente com *E. dispar* associada com outro tipo de parasito, o que pode levar a um falso diagnóstico de colite amebiana (Aquino, 1998; Stanley, 2003).

Atualmente, existem testes de ELISA disponíveis no mercado cuja metodologia é baseada em anticorpos monoclonais específicos contra uma

lectina própria para resíduos de galactose e N-acetil galactosamina presentes na superfície do trofozoíto de *E. histolytica* (Haque, 2000; Solaymani-Mohammadi, 2006). Esses testes são bem mais sensíveis e específicos do que os exames de microscopia e também capazes de distinguir as duas espécies de amebas do complexo. Porém, não são usados com muita frequência em áreas endêmicas em razão de seu custo elevado.

A PCR também apresenta boa sensibilidade e especificidade. Trata-se de uma técnica que permite a amplificação de regiões específicas do DNA da *E. histolytica* e da *E. dispar*, sendo assim um instrumento para a diferenciação das espécies. Assim como o teste ELISA, também apresenta alto custo, sendo mais utilizado em pesquisa que no diagnóstico de rotina laboratorial (Gonin & Trudel, 2003; Solaymani-Mohammadi, 2006). Nos casos em que o parasito não é detectado nas fezes e que o paciente vem apresentando quadros de colite aguda, podem ser usadas técnicas como colonoscopia ou retosigmoidoscopia flexível.

O diagnóstico de abscessos hepáticos amebianos é feito por sorologia e por ultra-som. A sorologia é altamente sensível (>94%) e específica (>95%). Resultados falso-negativos podem ser obtidos quando se utiliza o teste sorológico em fases iniciais da infecção (até os primeiros 10 dias). Testes posteriores a esse período relataram o resultado correto do exame (Stanley, 2003), já que o paciente passa a apresentar elevados títulos de anticorpos. A HAI tem sido utilizada como teste sorológico padrão por apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade (Kraoul, 1997). Já o ultra-som não apresenta alta especificidade para lesões hepáticas causadas pelos trofozoítos.

Embora seja um parasito de enorme importância científica, *Entamoeba histolytica* ainda é pouco estudada. Vários foram os avanços feitos, porém pouco se sabe sobre sua maquinaria enzimática, virulência e interação com outros microorganismos. Um grande avanço seria obter uma vacina capaz de combater essa parasitose. Vários estudos acerca desse tema estão sendo realizados, mas muito ainda deve ser feito.

## CONCLUSÃO

Por ser um parasito que causa milhares de mortes anualmente, é necessário que mais atenção seja dada a ele, não somente por parte dos pesquisadores, mas principalmente pelas autoridades, já que o saneamento básico é a melhor forma de prevenir a doença. Muitos aspectos, principalmente os que aumentam a virulência do parasito, têm de ser objeto de melhores estudos para que uma possível vacina seja desenvolvida.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo apoio para a produção deste artigo.

## ABSTRACT

### Amoebiasis. An update

Amoebiasis is the second leading cause of mortality from parasitic disease worldwide. The causative protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, is a potent pathogen. *E. histolytica* trophozoites secrete proteinases that dissolve host tissues, kill host cells and engulf red blood cells invading the intestinal mucosa and causing amoebic colitis. In some cases amoebas breach the mucosal barrier and travel through the portal circulation to the liver, where they cause abscesses. Amoebic liver abscesses grow inexorably and are almost always fatal. Evidences based on morphology pointed out for a single species in the past, but are, in fact, two genetically distinct species, termed *Entamoeba histolytica* (pathogenic) and *Entamoeba dispar* (non pathogenic or commensal).

**KEYWORDS:** *Entamoeba histolytica*. Amoebiasis. Amoebic colitis. Liver abscesses.

## REFERÊNCIAS

1. Alback RA. Nucleic acids of *Entamoeba histolytica*. *J Protozool* 36: 197-205, 1989.
2. Anaya-Velázquez F, Padilla-Vaca F. Effect of intestinal bacteria on the virulence of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 23: 183-185, 1992.
3. Aquino JL. Estudo comparativo entre o método imunológico Prospect e métodos tradicionais para o diagnóstico laboratorial da *Entamoeba histolytica*. *Rev Bras Anal Clin* 30: 147-150, 1998.
4. Bracha R, Kobiler D, Mirelman D. Attachment and ingestion of bacteria by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 36: 396-406, 1982.
5. Bracha R, Mirelman D. Adherence and ingestion of *Escherichia coli* serotype 055 by trophozoites of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 40: 882-887, 1983.
6. Braga LL, Mendonca Y, Paiva CA, Sales A, Cavalcante AL, Mann BJ. Seropositivity for/and intestinal colonization with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in individuals in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 36: 3044-3045, 1998.
7. Bruchhaus I, Lofius BJ, Hall N, Tannich E. The intestinal protozoan parasite *Entamoeba histolytica* contains 20 cysteine protease genes, of which only a small subset is expressed during in vitro cultivation. *Eukariot Cell* 2: 501-509, 2003.
8. Chavez-Munguia B, Hernandez-Ramirez V, Angel A, Rios A, Talamas-Rohana P, Gonzalez-Robles A, Gonzalez-Lazaro M, Martinez-Palomo A. *Entamoeba histolytica*: ultrastructure of trophozoites recovered from experimental liver lesions. *Exp Parasitol* 107: 39-46, 2004.
9. Costa AO, Viana JC, Assis D, Rocha OA, Silva EF. Comparison of xenic and monoxenic *Entamoeba dispar* cultures using hepatic inoculation in hamster. *Arch Med Res* 31: S247-S248, 2000.
10. Costa AO, Gomes MA, Rocha OA, Silva EF. Pathogenicity of *Entamoeba dispar* under xenic and monoxenic cultivation compared to a virulent *E. histolytica*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 48: 245-250, 2006.
11. De Menezes LF, Rodriguez MA, Vargas MA, Salgado LM, Orozco E. Effect of bacterial association on the phenotype and genotype of an *Entamoeba histolytica* clonal population. *Invasion metastasis* 17: 176-188, 1997.
12. De Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An Acad Bras Cienc* 78: 271-291, 2006.
13. Espinosa-Cantellano M, Martínez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. *Clin Microbiol Rev* 13: 318-331, 2000.
14. Gonin P, Trudel L. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* isolates in clinical samples by PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 41: 237-241, 2003.

15. Haque R, Mollah NU, Ali IK, Alam K, Eubanks A, Lysterly D, Petri WA Jr. Diagnosis of amebic liver abscess and intestinal infection with the TecLab *Entamoeba histolytica* II antigen detection and antibody tests. *J Clin Microbiol* 38: 3235-3239, 2000.
16. Haque R, Ali IM, Sack RB, Farr BM, Ramakrishnan G, Petri WA Jr. Amebiasis and mucosal IgA antibody against the *Entamoeba histolytica* adherence lectin in Bangladeshi children. *J Infect Dis* 183: 1787-1793, 2001.
17. Haque R, Huston CD, Hughes M, Houpt E, Petri WA Jr. Amebiasis. *N Engl J Med* 348: 1565-1573, 2003.
18. Kraoul L, Adjmi H, Lavarde V, Pays JF, Tourte-Schaefer C, Hennequin C. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for diagnosis of hepatic amoebiasis. *J Clin Microbiol* 35: 1530-1532, 1997.
19. Mann BJ, Lockhart LA. Molecular analysis of the Gal/GalNac adhesin of *Entamoeba histolytica*. *J Euk Microbiol* 45: 13S-16S, 1998.
20. Martinez-Palomo A. Biology of amoebiasis: progress and perspectives. *Biol Parasitism* 43: 61-73, 1988.
21. Mirelman D. Amoeba-bacterium relationship in amoebiasis. *Microbiol Rev* 51: 272-284, 1987.
22. Moran P, Ramos F, Ramiro M, Curiel O, Gonzalez E, Valadez A, Gomez A, Garcia G, Melendro EI, Ximenez C. *Entamoeba histolytica* and/or *Entamoeba dispar*: infection frequency in HIV+/AIDS patients in Mexico city. *Exp Parasitol* 110: 331-334, 2005.
23. Okada M, Nozaki T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res* 37: 244-252, 2006.
24. Padilla-Vaca F, Martinez-Gallardo N, Blanco-Labra A, Shmueli H, Mirelman D. Novel thermostable serine-metallo proteinase of *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 31: S221-S223, 2000.
25. Pacheco J, Shibayama M, Campos R, Beck DL, Houpt E, Petri WA Jr, Tsutsumi V. *In vitro* and *in vivo* interaction of *Entamoeba histolytica* Gal/GalNac lectin with various target cells: an immunocytochemical analysis. *Parasitol Int* 53: 35-47, 2004.
26. Que X, Brinen LS, Perkins P, Herdman S, Hirata K, Torian BE, Rubin H, McKerrow JH, Reed SL. Cysteine proteinases from distinct cellular compartments are recruited to phagocytic vesicles by *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 119: 23-32, 2002.
27. Ravdin JI. *Amebiasis human infection by Entamoeba histolytica*. Churchill Livingstone, New York, 1988. p. 126-149.
28. Silva EF. *Entamoeba histolytica*: isolamento, axenização e caracterização de diferentes cepas através de parâmetros morfológicos, bioquímicos, biológicos e de patogenicidade *in vivo* e *in vitro*. Belo Horizonte [Tese de doutorado em Parasitologia – ICB/UFMG], 1997.
29. Singh D, Naik SR, Naik S. Role of cysteine proteinase of *Entamoeba histolytica* in target cell death. *Parasitol* 129: 1-9, 2004.
30. Solaymani-Mohammadi S, Rezaian M, Babaei Z, Rajabpour A, Meamar AR, Pourbabai AA, Petri WA Jr. Comparison of a stool antigen detection kit and PCR for diagnosis of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections in asymptomatic cyst passers in Iran. *J Clin Microbiol* 44: 2258-2261, 2006.
31. Spice WM, Ackers JP. The effect of axenic versus xenic culture conditions on the total and secreted proteolytic activity of *Entamoeba histolytica* stains. *Arch Med Res* 23: 91-93, 1992.
32. Spice WM, Ackers JP. Influence of bacteria on electrophoretic proteinase patterns of *Entamoeba histolytica* isolates. *Int J Parasitol* 23: 671-674, 1993.
33. Stanley SL. Amoebiasis. *Lancet* 361: 1025-1034, 2003.
34. Stauffer W, Ravdin JI. *Entamoeba histolytica*: an update. *Curr Opin Infect Dis* 16: 479-485, 2003.
35. Shamsuzzaman SM, Haque R, Hasin SK, Petri WA Jr, Hashiguchi Y. Socioeconomic status, clinical features, laboratory and parasitological findings of hepatic amebiasis patients – a hospital based prospective study in Bangladesh. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 31: 399-404, 2000(a).
36. Shamsuzzaman SM, Haque R, Hasin SK, Hashiguchi Y. Evaluation of indirect fluorescent antibody test as enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of hepatic amebiasis in Bangladesh. *J Parasitol* 86: 611-615, 2000(b).
37. Wittner M, Rosenbaum RM. Role of bacteria in modifying virulence of *Entamoeba histolytica*. Studies of amoeba from axenic cultures. *Am J Trop Med Hyg* 19: 755-761, 1970.
38. WHO/PAHO/UNESCO Report. A consultation with experts on amoebiasis. Mexico City, Mexico, 1997. *Epidemiol Bull* 18: 13-14, 1997